

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 橋 信 行

Aspartate kinase (AK) はスレオニン、メチオニン、リジンなど、複数のアミノ酸の生合成経路における共通の初発酵素としてアスパラギン酸をリン酸化する反応を触媒する酵素である。AKはアミノ酸発酵に関わるなど、応用上の重要性があるとともに、生物の基本要素の一つ、アミノ酸生産に関わることから学術上の重要性も高い。本論文は *Thermus flavus* 及び *Bacillus subtilis* 由来の AK を対象として、その活性発現及び機能調節のメカニズムを明らかにするとともに、その過程で発見した *Thermus* 属細菌における新規リジン生合成系に関して述べている。本論文は四章と総括により構成される。

第一章では、AK の学術的及び産業上の重要性を述べるとともに、その概要について説明を行っている。

第二章では、*T. flavus* 由来 AK のタンパク質工学的手法を用いた解析について述べている。まず、生産、精製の方法を確立するとともに、サブユニットの構成を明らかにした。加えて、部位特異的変異により変異体を作製し、これら変異体 AK の酵素学的解析を行うことで、Thr47 はアスパラギン酸の結合に、Lys7 及び Glu74 は活性発現に、Ser41、Thr47、Asp154、Asp182 の各残基が活性発現に必要なマグネシウムイオンの結合に関与することを示唆した。

第三章では、*B. subtilis* AK III の解析について述べている。*B. subtilis* においてその詳細が不明であった AK III の遺伝子が、ゲノムプロジェクトで報告された *yclM* であることを明らかにした。加えて、AK III のサブユニット構成を明らかにするため、ゲルろ過による分子量推定を行い、分子量が約 50k のモノマーであることを示唆した。さらに、精製酵素を用いた酵素学的解析も行った。

第四章では、*T. Thermophilus* におけるリジン生合成系に関する研究について述べている。原核生物において、AK はリジン、スレオニン、メチオニン、イソロイシンなどの生合成に関わっており、その活性がリジン、スレオニンによって制御されていることが知られている。ところが、AK 欠損の *T. thermophilus* AK001 株は最小培地においてスレオニンとメチオニンの添加により生育が回復し、リジンは生育にまったく影響を与えなかった。このことより、*T. thermophilus* においてはリジンが他の原核生物と別の経路で生合成されることが示唆された。加えて、ランダム変異により作製したリジン要求変異株は全て原核生物におけるリジン前駆体 DAP では回復しなかった。ところが、カビ・酵母のリジン生合成経路である α -アミノアジピン酸 (AAA) 経路の中間体である AAA を添加してみたところ一部の変異株において生育の回復が観察された。さらに、リジン要求性変異株の欠損を相補する 4.35 kbp の *Bam*HI ゲノム断片には AAA 経路の酵素と相同性の高い ORF が見出された。以上より、*T.*

*thermophilus*においてはAAA経路によってリジンが生合成されることが示唆された。しかしながらカビ酵母のAAA経路におけるリジン前駆体のサッカロピンによるリジン要求株の生育の回復が観察されなかった。また、リジン要求を相補するDNA断片にはアルギニン生合成に関わる酵素群と非常に高い相同性を持つORFが含まれていた。以上の事実と、リジンとアルギニンの前駆体であるオルニチンが炭素鎖が1鎖長違うだけの類似化合物であること、及びリジンの前駆体となるアセチルリジンにより、リジン要求株の生育が回復したことから *Thermus*におけるAAA経路の後半部分はアルギニン生合成系と類似している可能性が強く示唆された。

総括においては本論文から得られた知見を要約し、今後の展望を述べている。

以上、本論文はAKの活性発現制御機構に関する新知見をもたらすとともに *Thermus*属細菌において新規のリジン生合成系を発見し、それがアルギニン生合成系と類似していることなど、アミノ酸生合成系の進化を考える上で興味深い知見を提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文としての価値あるものと認めた。