

論文審査の結果の要旨

氏名 臼田 佳弘

学位申請者臼田佳弘は、*Exiguobacterium* 属におけるグアノシンキナーゼの同定、酵素学的性格づけと遺伝子の分子生物学的解析を行い、3章からなる学位申請論文一篇にその内容をまとめている。

多くの生物はプリンヌクレオチドの生合成経路として *de novo* 生合成経路とともにサルベージ経路と呼ばれる既存のプリンを利用する経路を有している。プリンヌクレオシドからプリンヌクレオチドへのサルベージ経路としては2つの経路が知られている。1つはプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNPase) の作用によりプリンヌクレオシドから生じたベースを対応するヌクレオチドに変換する経路であり、もう1つの経路はヌクレオシドキナーゼのにより直接リン酸化する経路である。グアノシンキナーゼ (GKase) はグアノシンから5'-GMPへのリン酸化反応を触媒する酵素であるが、その微弱な活性をヌクレオベース経由の経路と区別して無細胞抽出液中に検出することは従来困難とされていた。唯一、大腸菌 *Escherichia coli* においてはGKaseをコードする遺伝子 *gsk* が単離され解析されたが、その他の生物では部分精製の報告が数例あるのみであり、酵素の存在自体が不明であった。

本論文は第1章において、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953株からのグアノシンキナーゼの同定、精製、およびその酵素学的諸性質の解明を記述している。学位申請者はまず、非ラベルのベースを過剰添加するラベル基質の反応系を用いることにより、GKaseのリン酸化活性をベース経由の反応と区別することを可能にした。GKase活性は *Brevibacterium* 属細菌では *B. acetylicum* にのみ認められ、精製によってサブユニット分子量が36 kDaのダイマー酵素であることが明らかとなった。この酵素ではグアノシン、イノシン、2'-デオキシグアノシンがリン酸受容基質となったが、速度論的解析からグアノシンが生理的な基質と推定された。リン酸供与体としては、ATP、dATP、GTP、dGTPが良好な基質となった。ヌクレオチドの影響として、低濃度の添加ではCMP、CTPによる顕著な活性化が、いっぽう高濃度添加ではAMP、ADP、GMPによる阻害効果が明らかになった。

第2章では上述のグアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングと解析が述べられている。N末端アミノ酸配列を基に単離した *gsk* 遺伝子は303アミノ酸からなるタンパク質

をコードし、産物はリボキナーゼファミリーに属する糖リン酸化酵素と相同性を示したが、大腸菌Gskとは低い部分的な相同性しかなかった。転写解析からgskが下流の遺伝子とオペロンを構成することが明らかとなった。ともにグアノシンを基質とするGKaseとPNPase両酵素の比活性を測定したところ、GKase活性は増殖初期に上昇したが、PNPase活性は増殖後期から上昇する対照的なパターンを示した。転写レベルでも増殖初期に活発なgsk遺伝子の転写が認められた。以上の解析結果およびGKase活性に対するヌクレオチドの阻害と活性化から、GKaseがDNA、RNA合成が盛んな増殖期にグアノシンを効率的かつ積極的に利用し、ヌクレオシドモノリン酸のレベルを調節する役割を担っていることが示唆された。サルベージ経路としては、キナーゼによる直接のリン酸化の方がベース経由の経路よりもエネルギー的に有利であるため、増殖期に利用されていると考えられた。他方、細胞が増殖期から定常期に入ると過剰のヌクレオシドはPNPaseによってベースとリボースに分解され、エネルギー源として利用される方が有利であると推定された。

第3章では、*Exiguobacterium* 属類縁菌株におけるグアノシンキナーゼ活性の検索と*Exiguobacterium aurantiacum* ATCC 35652株由来のグアノシンキナーゼ遺伝子の解析が述べられている。*B. acetylicum* が分子系統学的研究から近時*Exiguobacterium* 属に再分類されたことから、類縁菌株におけるGKase活性の分布を検討した。類縁12種のうち*B. acetylicum* と同レベルの活性を示す株は同属の通性好アルカリ菌*Ex. aurantiacum* のみであった。同株のgsk遺伝子を単離し、両gsk遺伝子の構造と産物の酵素学的な特性がよく類似していることを示した。*Ex. aurantiacum* gskも増殖初期に転写されていたが、オペロンは構成していなかった。

以上、学位申請者臼田佳弘は、*E. coli* 以外には知られていなかったGKase活性を新たな測定法により*Exiguobacterium* 属より同定、性格づけし、限局された活性分布ならびに生物種間の遺伝子構成の差異を明らかにした。この成果は、グアノシンーリン酸の発酵工業的生産に学術的基盤を与えるものであるのみならず、酵素学、分子遺伝学的にグアノシン代謝系についての重要な知見をもたらしており、博士（理学）の称号を受けるにふさわしい業績であると審査員全員が判定した。なお本論文は川崎寿、島岡恵、宇多川隆との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、臼田佳弘に博士（理学）の学位を授与できると認める。