

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

清水 知宏

本研究は、原核生物におけるイソプレノイド生合成に関して、生合成経路の解明と特異的阻害剤の発見をめざして行ったものであり、序論に続く 3 章からなる。

序論では、研究の背景、ならびに本研究の目的と意義について述べている。

第 1 章では、イソプレノイド生合成における 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) 経路の阻害剤を探索した。ヒトを含めた高等動物はイソプレノイド生合成にメバロン酸 (MVA) 経路のみを利用している。したがって、MEP 経路の阻害剤は安全な抗菌剤や除草剤のリード化合物になり得ると期待される。まず、特徴的な抗菌スペクトルを指標に MEP 経路特異的阻害剤の候補として、これまで標的未知であった fosmidomycin (FMM) を見出した。その作用について検討したところ、FMM は MEP 経路の第二段階の酵素である DXP reductoisomerase (DXR) に対して、強い阻害活性を持つことが判明した。次いでその K_i 値を 9.4 nM と決定し、拮抗型の阻害型式であることを明らかにした。また、FMM は実際に大腸菌の野生株の生育を阻止したが、この生育阻害は DXR の反応生成物 MEP のアルコール体、2-C-methyl-D-erythritol の添加によって消失し、生育が回復した。さらに FMM は、*dxr* 遺伝子を破壊した大腸菌に対しては全く阻害活性を示さなかった。これらの結果から、FMM は DXR の反応を特異的に阻害すると結論づけた。

第 2 章では、放線菌のメバロン酸経路生合成遺伝子クラスターの解析を行った。当研究室では放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株のメバロン酸経路生合成遺伝子クラスターのクローニングに成功しており、このクラスター内には、アミノ酸配列の相同性検索から IPP isomerase (IDI) を除くメバロン酸経路の全ての酵素、すなわち 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase、HMG-CoA reductase、MVA kinase (MVAK)、phosphomevalonate kinase (PMVAK)、diphosphomevalonate decarboxylase (DPMVAD) が含まれていることが示唆されていた。さらに、同クラスター内に新しいタイプ (type2) の IDI が存在することが当研究室にて明らかにされた。そこで、これまで原核生物においては詳細な解析が行われていなかった MVAK、PMVAK、DPMVAD について、まず大量発現系の構築を行い、酵素学的諸性質を明らかにした。その結果、これらの酵素の酵素学的性質は真核生物の酵素と比較すると、最大反応速度は小さく、また、 K_m 値は大きいことが判明した。次いで、これらのメバロン酸経路の遺伝子を利用して MEP 経路特異的阻害剤の探索系を構築した。この系の有効性について先述した FMM を用いて確認したところ、MEP 経路特異的な抗菌活性を極めて高い感度で検出できることが判明した。

第 3 章では、MEP 経路の未知段階の解明をめざして経路の解析を行った。当研究室では、既に DXP の生成に続く 4 段階の反応によって 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) が生成するまでを明らかにしていたが、最終生成物である IPP および DMAPP に至るまでの後半部分の反応については依然として不明であった。また MECDP からは少

なくとも 2 段階以上の反応が残されていることが予想されたが、これまで候補遺伝子として取得していたのは *gcpE* 遺伝子のみであり、関与する反応についても不明であった。一方、MEP 経路の後半部分は IPP と DMAPP のそれぞれを生成する経路に分岐することが示唆されていた。そこで分岐以降の反応に関与する新しい遺伝子を取得するため、大腸菌の IDI をコードしている *idi* 遺伝子の破壊株 (DK310) を作製し、さらに MVAK、PMVAK、DPMVAD 遺伝子を導入した。本菌において、MVA の添加時のみメバロン酸経路により、IPP の供給が可能になる。この探索系を用いて、変異処理後の MVA 要求性を指標に、分岐以降の IPP に至る経路に関与する遺伝子の探索を行った。探索の結果、機能未知の *lytB* 遺伝子が候補として得られた。ゲノムプロジェクトが終了した生物を対象に *lytB* 遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子の分布を調べたところ、MEP 経路を利用することが判明している生物種の分布に一致した。また、取得した *lytB* 変異株に IDI を導入した菌株は、MVA 要求性が消失したが、これは分岐後の DMAPP への経路から IPP isomerase を経て迂回した IPP の供給によるものだと考えられた。以上の理由から、*lytB* 遺伝子が MEP 経路の分岐後の IPP への経路に関与することが強く示唆された。

一方、他の研究グループによって、*gcpE* 遺伝子産物が MECDP を (E)-4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl diphosphate (HMBDP) に変換する反応に関与することが示され、次いで、*lytB* 遺伝子産物が HMBDP を IPP と DMAPP のそれぞれに変換することが示唆された。一方、HMBDP がヒト免疫系の $\gamma\delta$ T 細胞の増殖を強く刺激することが報告されたため、先述した *lytB* 変異株について $\gamma\delta$ T 細胞に対する増殖促進活性を測定したところ、野生株と比較して約 300 倍強い活性を持つことが判明し、*lytB* 遺伝子産物の反応が阻害されることによって菌体内に HMBDP が蓄積していることが示唆された。この結果に基づき、Morita らは *lytB* 変異株における $\gamma\delta$ T 細胞の増殖刺激の消失を指標に、MEP 経路変異株として新たに *fldA* 遺伝子破壊株を取得した。大腸菌において *fldA* 遺伝子がコードする flavodoxin I は、種々の酵素反応において電子伝達体として作用し、*fpr* 遺伝子がコードする flavodoxin reductase に対になって生体内の還元反応に関与することが知られている。そこで、MEP 経路に関与することが判明した *gcpE*、*lytB*、*fldA* および *fpr* の各遺伝子産物を大量発現させて得た組換え蛋白質と、予想される種々の補酵素とを組み合わせ、MECDP や HMBDP を基質とした酵素反応について検討したが、反応の進行は検出されなかった。

以上、本研究は、重要な代謝経路でありながら今まで未解明領域の多かったイソプレノイド生合成に関して、特異的阻害剤の発見と生合成遺伝子および酵素の解析を行ったものであり、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) の学位論文として価値あるものと認めた。