

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Asri Peni Wulandari

これまで、全ての細菌においてリジンはアスパラギン酸からジアミノピメリン酸経路によって合成されると考えられてきたが、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 は、 α -アミノアジピン酸を経て合成されることが明らかになってきている。その生合成は、2-オキソグルタル酸とアセチル CoA からホモクエン酸の合成で開始し、 α -アミノアジピン酸までの合成は、ロイシン生合成や TCA サイクルの一部と類似した経路で、その後はアルギニン生合成と類似した経路で進行する。また、異なる生合成（代謝）系に属するものの、これらの対応する反応を担う酵素間でアミノ酸配列の類似性がみられることから、これらの生合成（代謝）経路の間に進化的な関連性が示唆されている。アミノ酸生合成は、過剰量の最終産物によりフィードバック阻害を受け、経路全体の流量調節が行われることが知られているが、そのターゲットとなるのが多くの場合、経路の初発酵素である。本論文は、こうした背景の下、*T. thermophilus* HB27 のリジン生合成の初発酵素ホモクエン酸合成酵素について、そのフィードバック阻害をはじめとする酵素学的諸性質の解析、タンパク質工学的的手法によって作製した改変体の種々の基質を用いた特性解析、およびX線結晶構造解析を目指したタンパク質結晶化の試みについて述べたもので、5章より構成される。

第一章では、*T. thermophilus* HB27 における新規なリジン生合成の全体像について簡単に解説した後、論文の概略について述べてある。

第二章では、同菌のホモクエン酸合成酵素を大腸菌の発現系を用いて大量生産・精製し、その酵素学的諸性質を解析した結果について述べている。同酵素の至適温度は 60°C 付近に存在し、 70°C 以上では失活が認められた。フィードバック阻害について調べるため、生合成系の最終産物であるリジンと構造的に類縁の幾つかの化合物を反応液に添加して、酵素活性への影響を調べた結果、予想通りリジンによる阻害が観察され、その阻害定数 K_i は $9.4\ \mu\text{M}$ と決定された。その他、リジンより炭素鎖が1つ短い構造アナログであり、アルギニンの生合成中間体であるオルニチンは全く阻害を示さなかったが、アルギニンに弱いながらも阻害活性が認められた。このことから同菌のリジン生合成がアルギニン生合成と進化的な関連があることを示すと同時に、機能的にも依然として関連があるものと考えられた。ホモクエン酸合成酵素は、ロイシン生合成の初発酵素である 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素とアミノ酸配列の類似性を示すが、TCA サイクルのクエン酸合成酵素とは類似性を全く示さない。そこで、基質特異性を調べたところ、2-イソプロピルリンゴ酸の合成活性は認められなかったが、顕著なクエン酸合成活性が見いだされ、その活性発現には K^+ の添加が必要であった。このことから、ホモクエン酸合成酵素がクエン酸合成酵素の機能を代替する、または補助する可能性が示された。

第三章では、部位特異的変異法により作製した改変型ホモクエン酸合成酵素の酵素機能の解析について述べられている。ホモイソクエン酸合成酵素と 2-イソプロピルリンゴ酸合

成酵素の間でアミノ酸配列の相同性がみられることから、両者の間で特異的に異なるアミノ酸残基に注目し、そのアミノ酸残基が 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素型に置換されたホモクエン酸合成酵素改変体を作製している。その結果、ホモクエン酸合成酵素で保存されている R160 と H105 のそれぞれ T、L への置換によって、2-オキソ酸を添加しなくてもアセチル CoA の加水分解を起こすことが見いだされた。クエン酸合成酵素では、オキザロ酢酸、アセチル CoA の順に基質が結合し反応が行われ、オキザロ酢酸の結合によって酵素のコンフォメーションが変化し、アセチル CoA が結合できる構造をとると考えられている。ホモクエン酸合成酵素においても、同様な順番で基質が結合すると仮定すると、2 種のアミノ酸置換体は 2-オキソ酸を結合した構造に類似した構造をとっているものと想像された。H67、P156、G162 の改変により、 K_m 及び k_{cat} の両パラメータがともに低下していることが明らかになった。これらの事実から、これらの改変残基は、基質結合部位、活性中心近傍に位置するものと予想された。

第四章では、野生型酵素、および R160T を用いた X 線結晶構造解析を目指したタンパク質結晶化の試みについて述べられている。種々の条件検討の結果、結晶がまだ小さく X 線解析を行うには至っていないが、20° C、ポリエチレングリコール 6000 の存在下、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、bi-pyramidal な結晶が得られている。

第五章では、研究のまとめと将来の展望について述べられている。

以上、本論文は、*T. thermophilus* HB27 のホモクエン酸合成酵素の構造と機能の解析について述べたもので、アミノ酸生合成系などの生命システムの進化の解明、および新しいリジン生産システムの構築のための重要な知見を与えるものであり、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。