

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮崎 淳一

アミノ酸であるリジンの生合成経路は現在までに、多くの真正細菌や植物にみられるジアミノピリン酸(DAP)を経由するDAP経路と酵母・カビにみられる α -アミノアジピン酸(AAA)を経由するAAA経路の2つの経路が知られている。ところが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、真正細菌に属するにもかかわらず、リジンをAAA経路によって生合成することがみいだされた。*T. thermophilus* のリジン生合成に関わる遺伝子クラスターがクローン化され、その塩基配列解析の結果、AAA以前のリジン生合成はロイシン及びTCA回路と、AAA以降のリジン生合成はアルギニン生合成と類似しているものと推定された。したがって、*T. thermophilus* のリジン生合成系は、生合成酵素の基質特異性がどのように獲得されていったのか、そして生合成経路がどのように進化していったのかを明らかにするための最適な材料であると考えられた。*T. thermophilus* のリジン生合成は9つの酵素反応によって行われていることが推測されたが、クローン化した遺伝子クラスターにはこのうち5つの反応を触媒すると思われる酵素の遺伝子しかみいだされていなかった。さらに、リジン生合成に関わる酵素の特性解析に関しては全く行われておらず、それがどのような特性を有しているのかについてはまったく不明であった。

本論文は、まだ未同定の四つの酵素のうちで、リジン生合成の3番目及び最終2段階の反応を触媒する三つの酵素について、遺伝子のクローニング、酵素特性解析、X線結晶構造解析、進化系統解析などを行うことを通して、当リジン生合成及び他の類似生合成が進化的にどのように形成されていったのかを解析したもので五章よりなる。

第一章では、生命の起源や酵素の進化モデル、及び *T. thermophilus* のリジン生合成系について概説している。

第二章では、最終2段階の反応を触媒する酵素及び遺伝子に関するものである。リジン生合成8番目の酵素はアルギニン生合成における ArgD と高い相同性を有すると予想された。この推測をもとにリジン生合成に必須である *lysJ* のクローン化し、さらに *lysJ* の下流にリジン生合成最終段階をコードする ArgE の paralog、*lysK* を見いだした。それら2つの遺伝子をそれぞれ、大腸菌を用いて発現、精製した後、得られた酵素の反応速度論的な解析を行ったところ、本来の基質であるリジン生合成の生合成中間体だけでなく、アルギニン生合成の生合成中間体をも基質として触媒することがわかった。このことから、*T. thermophilus* におけるリジン生合成は、アルギニン生合成と1つの共通の起源を有し、なおかつ現在においてもその機能が維持されていることが示唆された。

第三章では、リジン生合成第3番目の酵素、ホモイソクエン酸脱水素酵素(HICDH)について、その遺伝子のクローン化、および酵素特性解析、X線結晶構造解析などについて述べている。HICDH はロイシン生合成における3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)及びTCA回路におけるイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)と反応機構及び基質が類似し、それらとアミノ酸配列におい

て高い相同性を示すことが推測された。そこで、この推測をもとに酵素間のホモロジーを利用して *T. thermophilus* から HICDH (TtHICDH)をコードする遺伝子をクローン化した。同遺伝子を破壊した株は、明らかなりジン要求性を示したことからクローン化した遺伝子がリジン生合成に必須であることがわかった。また大腸菌を用いて発現、精製したタンパク質について活性測定を行い、同タンパク質が実際にホモイソクエン酸の脱炭酸脱水素反応を触媒することが確認されたことから、クローン化した遺伝子がリジン生合成第3番目の酵素、HICDH をコードすることが明らかとなった。しかしながら、の反応速度論的解析の結果、TtHICDH は、本来の基質であるホモイソクエン酸よりも ICDH の基質であるイソクエン酸に対して20倍も効率よく反応を触媒した。このことから、TtHICDH が *T. thermophilus* においてリジン生合成だけでなく TCA 回路においても機能している可能性が示された。

次いで、TtHICDH の基質認識機構を解明するために、部位特異的変異導入実験について述べられている。78番目から86番目を酵母の HICDH (ScHICDH)において相当する部位にあるアミノ酸配列に置換した TtHICDH の変異体 7ScHICDH は、ScHICDH と同様にホモイソクエン酸のみを基質として認識するようになることを見いだした。さらに、85番目のアルギニンをバリンに置換することによって、イソクエン酸を基質として認識しなくなり、代わりに IPMDH の基質である3-イソプロピルリンゴ酸を基質として認識するようになった。このことから、TtHICDH において85番目のアルギニンは TtHICDH の基質特異性を方向付ける最も重要な残基であることが示された。さらに引き続き変異体の作製を通じて、7ScHICDH において80番目のチロシンがホモイソクエン酸を認識するのに必要であることが示された。TtHICDH の基質認識機構をさらに詳細に解明するために、TtHICDH 及び7ScHICDH の X線結晶構造解析を行い、TtHICDH の基質認識機構の概略を明らかにした。これは HICDH として初めて三次元立体構造が決定された事例となっただけでなく、 β -decarboxylating dehydrogenase としても、初めて四量体として存在する酵素の立体構造決定となった。

第四章では、進化系統解析などを用いて AAA を経由するリジン生合成系がどのように進化してきたのかについて解析している。

第五章では、総括と今後の展望について述べている。

以上、本論文はまだ解明されていない点が多い *T. thermophilus* のリジン生合成の全貌を明らかにすることを目指し、関連する遺伝子のクローン化、酵素機能特性解析、X線結晶構造解析、進化系統解析などを行ったもので、学術上応用上寄与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。