

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程入学
氏名 安 光得
指導教官名 横田 明

論文題目 アミノアジピン酸還元酵素に基づく菌類の 系統進化に関する研究

分子系統学の解析により、菌類は植物よりも動物に近縁であることが示されている。しかし、細胞レベルにおいて動物と菌類の相違点は少ない。菌類学の教科書によると、細胞壁にキチンを有することやアミノアジピン酸経路でオキシグルタル酸とアセチル CoA からリジンを生合成することなどが挙げられている。本研究においては菌類の特徴とされているアミノアジピン酸経路リジン生合成から菌類の系統進化を研究した。

1) 菌類型と原核生物型のアミノアジピン酸経路リジン生合成経路の比較

オキシグルタル酸とアセチル CoA よりアミノアジピン酸を経由しリジンを生合成する経路は長く菌類の特徴とされてきたが、近年、種々の原核生物がアミノアジピン酸を経由しリジンを生合成することが報告されている。しかし、両者の生合成経路には違いが見られ、アミノアジピン酸からリジンまでの経路がまったく異なっている。特に、アミノアジピン酸還元反応が菌類特有のものであり、その反応を触媒するアミノアジピン酸還元酵素は菌類のみが有し、動物や植物は持っていないことがゲノムの比較より明らかになった⁽¹⁾。アミノアジピン酸の還元に関与する酵素は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては LYS2 (1392aa) と呼ばれ、アデニル化ドメイン、ペプチジルキャリアドメイン、還元化ドメインの 3 つのドメインからなる。

2) アミノアジピン酸還元酵素の分子進化

既知の7つの LYS2 はいずれも子囊菌類からのものであった。そこでこれらの配列のアライメントより、アデニル化ドメインを増幅できる PCR プライマーを作成した⁽¹⁾。このプライマーを用いて PCR を行ったところ、子囊菌類以外の菌類構成グループである担子菌類、接合菌類、ツボカビ類からも目的産物を得ることができた。相同性検索より、タンパク質立体構造が明らかにされている *Bacillus brevis* のグラミシジン S 合成酵素には、それぞれのアミノ酸結合領域を有したアデニル化ドメインとペプチジルキャリアドメインが近接して存在し、LYS2 の対応する2つの相当ドメインとよく似た構造を有していることがわかった。グラミシジン S 合成酵素には AMP 結合領域にバクテリアのアデニル化ドメインにはないシステインが存在し、重要な機能を担っていると考えられた。LYS2 のアデニル化ドメインが、どの細菌の非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインと構造的に最もよく似ているかを最尤法により解析した。その結果、菌類の LYS2 のアデニル化ドメインはアグロバクテリウム由来のタンパク質と近縁であることが示されたが、そのブーツストラップ確率は17%と低く、信頼に堪えうるものではない。このことは、このドメインの起源が極めて古く、度重なる重複置換が生じたことを意味し、現存タンパク質の構造比較からはその祖先を推定できないと考えられる⁽²⁾。

3) アミノアジピン酸還元酵素に基づく菌類の系統解析

子囊菌類 30 株、担子菌類 13 株、接合菌類 2 株、ツボカビ類 4 株から LYS2 アデニル化ドメインをコードしている領域の塩基配列を決定した。塩基置換頻度を rDNA や ITS 領域のそれらと比較したところ、*lys2* は塩基の挿入・欠失の頻度が低く、同義的置換頻度が極めて高いことがわかり、本領域が分子系統学および分子生態学に、より適したものであると言える。また、担子菌類 *Bullera*、*Rhodotorula*、*Mixia* についてはリジンを含まない最少培地で発現している RNA を取り、RT-PCR を行ったところ、*lys2* が確かに発現していることを確認した。その RT-PCR 産物の塩基配列と、ゲノムからの PCR 産物の塩基配列を比較したところ、*Bullera* と *Mixia* には同じ位置にイントロンが存在し、また *Rhodotorula* はそれらとは異なる位置にイントロンが存在していた。しかし、生物系統やリボソーム RNA 比較、さらに LYS2 のアミノ酸配

列比較によると、*Mixia* は *Bullera* とより *Rhodotorula* に近縁であった。すなわち、これらのイントロンの挿入位置は生物系統と相関がないことを示す。他方、**LYS2** 比較に基づく菌類の系統樹を最尤法で作成した結果、**LYS2** の多様化は菌類の系統進化を反映していた (図 1)。

4) 環境における菌類の検出への応用

lys2 を指標にし、環境中における菌類を調べた。サンプルはミャンマーの大豆食品を用いた。18S rDNA と *lys2* 領域に対し PCR し、その産物をクローニングして得られたクローン各 20 個の塩基配列を決め、相同性検索にかけた。結果は、18S rDNA では真正子囊菌類、半子囊菌類が検出され、*lys2* では真正子囊菌類、古生子囊菌類、担子菌類が検出された。18S rDNA はゲノム当たり数百コピー存在することを考えると優勢分類群だけがよく検出され、環境中の菌類の多様性分布を反映していないと考えられる。一方、*lys2* はゲノム当たり 1 コピーであることから rDNA よりも菌類系統解析及び菌類生態解析を調べるのに有効である。

従来の研究は生物に普遍的に存在しているものを比較することが中心であった。菌類特異的な遺伝情報を菌類の系統進化解析に用いた本格的な研究はこれが初めてである。本研究により、アミノアジピン酸還元酵素が菌類のリジン生合成における鍵酵素であり、その分子進化は菌類の多様化と一致することを示した。よって、この遺伝情報が菌類の指標として使うことができ、菌類の系統進化学および生態学研究のツールとして現在最強のものであることを示した。

- (1) An KD, Nishida H, Miura Y, Yokota A. (2002) Amino adipate reductase gene: a new fungal-specific gene for comparative evolutionary analyses. *BMC Evol. Biol.* 2:6
- (2) An KD, Nishida H, Miura Y, Yokota A. (2003) Molecular evolution of adenylating domain of amino adipate reductase. *BMC Evol. Biol.* 3:9

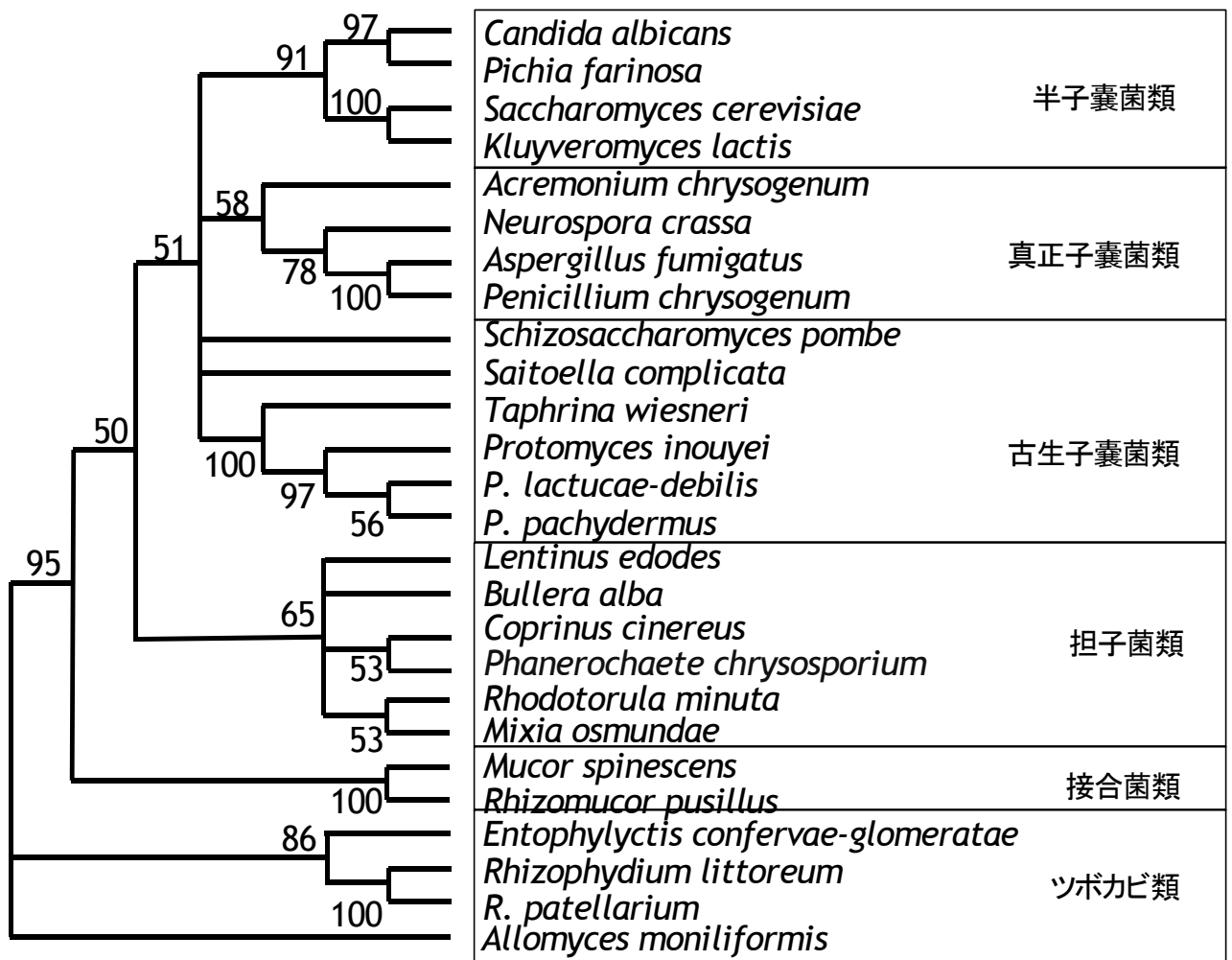


図1. Lys2比較に基づく系統樹