

[ 別紙 2 ]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 安 光 得

---

分子系統学的解析から、菌類は植物および動物と異なることが示されているが、細胞レベルでの相違点は少ない。菌類は細胞壁にキチンを有すること、アミノアジピン酸経路でオキソグルタル酸とアセチル CoA からリジンを生合成する点が植物、動物と異なる。本研究では菌類に特徴的なリジン生合成系の酵素、アミノアジピン酸還元酵素遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行い、菌類の系統進化を研究した。

第1章では本研究の背景について述べている。第2章では菌類と原核生物のアミノアジピン酸経路リジン生合成経路について比較した。オキソ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てリジンを生合成する経路は菌類の特徴とされてきたが、近年、種々の原核生物でアミノアジピン酸を経由してリジンを生合成することが見い出された。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。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 (1392 アミノ酸残基) 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つのドメインから成る。

第3章ではアミノアジピン酸還元酵素の分子進化について述べた。既知の7つの子囊菌類の LYS2 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て PCR 反応を行い、子囊菌類、担子菌類、接合菌類、ツボカビ類の何れからも目的産物を得ることができた。塩基配列を決定し、相同性検索を行った結果、原核生物のリボソーム非依存性ペプチド合成酵素と相同性を示すことがわかった。タンパク質の立体構造が明らかにされている *Bacillus brevis* のグラミシジン S 合成酵素では、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。LYS2 のアデニル化ドメインは細菌のなかで *Agrobacterium* 属細菌由来のタンパク質と最も類縁性を示した。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

領域の遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った。本遺伝子と rDNA、ITS 領域の遺伝子の塩基置換頻度を比較したところ、*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研究により適したものであると言える。

第4章では担子菌類の *lys2* に存在するイントロンについて考察した。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 mRNA を得、RT-PCR を行って、*lys2* が発現され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* ではそれらとは異なる位置に存在していた。rRNA の塩基配列と LYS2 のアミノ酸配列に基づく系統解析では、*Mixia* は *Bullera* より *Rhodotorula* により近縁であるので、イントロンの挿入位置は生物系統と相関がないことがわかった。

第5章では *lys2* を指標とした環境中の菌類の検出への応用について述べた。菌類を多く含む大豆食品から DNA を抽出し、18S rDNA と *lys2* 遺伝子について PCR 反応を行い、その産物をクローニングして菌相を調べた。18S rDNA はゲノム当たり数百コピー存在するため、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ものと考えられる。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ものと考えられた。従来の研究は生物に普遍的に存在する遺伝子について比較することが中心であったが、菌類に特異的な遺伝子を用いて菌類の系統進化の解析を行ったのはこれが初めてである。

第6章では今後の展望について考察した。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から、菌類の系統研究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強力なツールと成り得ることを示した。

以上、本論文はアミノアジピン酸還元酵素遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行い、菌類の系統進化を明らかにしたもので、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。