

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 坪内 泰志

必須アミノ酸であるリジンには 2 種類の生合成経路が知られている。1 つは真正細菌や植物にみられる diaminopimelate (DAP) を経由する DAP 経路であり、他方は酵母やカビにおいてみられる α -amino adipate (AAA) を経由する AAA 経路である。70°C で至適に生育する *Thermus thermophilus* は真正細菌に属するにもかかわらず、この AAA を経てリジンを生合成していることが見出されている。加えて、全生合成遺伝子をクローニングした結果、AAA 以前のリジン生合成は酵母及びカビの生合成と同様にロイシン生合成及び TCA 回路の一部と類似していること、そして AAA 以降の生合成は酵母やカビで見られるようなサッカロピンを中間体とする生合成とは異なり、アルギニン生合成と類似していることが明らかとなっている。このことから、同リジン生合成系は関連する生合成・代謝系の進化を解明する鍵となるものと考えられた。アミノ酸の生合成は通常、その経路の最終産物による、経路の初発酵素をターゲットとした酵素活性を抑制する feedback inhibition と遺伝子発現を抑制する feedback repression によって流量調節がなされているが、*T. thermophilus* のリジン生合成も最終産物であるリジンによって経路の初発酵素が feedback inhibition を受けることが示されている。同菌のリジン生合成酵素遺伝子をクローニングし、その酵素特性を解析することで酵素活性の調節を含めて酵素レベルでの本リジン生合成の全体像が明らかになりつつあるが、転写レベルでの調節機構に関しては未だ如何なる知見も得られていなかった。

本論文は、このような背景のもと、本リジン生合成に関与する酵素遺伝子の多くを含む遺伝子クラスター (Lys クラスター) および *lysJ-lysK* クラスターの転写調節機構を解明することを目的として行われた研究について述べたもので六章からなる。

序章では研究の背景について述べられている。

第一章では Lys クラスターの転写単位と発現調節に必要な領域の特定について述べられている。RT-PCR により Lys クラスター内に位置する酵素遺伝子はオペロンを形成していること、そしてこれら全遺伝子の発現調節はクラスター最上流に位置するホモクエン酸合成酵素遺伝子 (*hcs*) のプロモーターによる発現調節に依存することが示された。次いで S1-nuclease mapping により *hcs* の転写開始点を同定し、同時にリジン存在下で転写量が減少することが明らかになった。転写開始点から *hcs* 翻訳開始コドンまでの 111 bp の領域には複雑な二次構造を形成し得る配列、および leader peptide 様 ORF (*hcs*-leader) をコードしている可能性のある配列が含まれており、この領域が転写抑制機構に関与していることが推察された。この結果を受けて、同菌における転写制御機構の解析のためのレポーターアッセイ系を構築し、同領域を解析した。その結果、*hcs* 上流配列が、そしてとりわけ *hcs*-leader をコードする領域の [AAA AAA] というリジンコドンが、リジンによる発現調節

に関与していることが明らかになり、*leader peptide* を介する *attenuation* の存在が示唆された。

第二章では、前章の結果から予想された仮説を裏付けるために、*hcs-leader* がタンパク質として生産されていることを証明する実験について述べられている。*hcs-leader* と α -galactosidase の融合タンパク質発現系を構築し、そのタンパク質を精製した後、二種のペプチダーゼ消化した断片を TOF-MS 解析した。その結果、*hcs-leader* に由来する配列が見出されたことから *hcs-leader* が実際に生産されていることが示された。この結果より、Lys クラスタは翻訳と共役した *attenuation* によって発現調節されていることが明らかになった。

第三章では *lysJ-lysK* クラスタの発現調節機構に関する解析について述べられている。本リジン生合成に必須である酵素をコードしている *lysJ* は、S1-nuclease mapping による転写開始点の同定、およびその転写量の解析より、最終産物であるリジンではなく類似経路の最終産物であるアルギニンによって転写調節を受けていることが明らかとなった。

第四章では同菌のアルギニン生合成の転写因子である *argR* 遺伝子のクローニングについて述べられている。

第五章では当該研究の総括が述べられている。

以上、本論文は *T. thermophilus* を対象として、必須アミノ酸として有用であるリジンの生合成遺伝子の発現調節機構について解析し、その発現調節モデルを提唱したものであって、学術上、応用上貢献する処が少なくない。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。