

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 彩子

リジンはヒトや家畜などの高等動物では自ら生合成できない必須アミノ酸の一つであり、近年の人口増加に伴う食肉需要の増大により、家畜飼料用のリジン生産量が年々増加している。飼料用等に用いられるリジンは、グルタミン酸発酵に用いられることでよく知られている *Corynebacterium glutamicum* による発酵法によって工業的に生産されており、その生産にはこの細菌が本来持つリジン生産量を調節するための制御が解除された変異株が用いられている。*C. glutamicum* のリジン生合成経路の初発酵素であるアスパラギン酸キナーゼ (AK) は、最終産物のリジンとスレオニンの共存下でフィードバック阻害を受け、これらの生産量を調節している。リジン生産には *C. glutamicum* 由来の AK (CgAK) のフィードバック阻害耐性変異株が用いられているが、その制御機構はリジン発酵系の確立以来 50 年以上の間解明されていない。また、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* では *C. glutamicum* とは異なる AK の関与しない経路でリジンを生合成している。この新規経路では α -アミノアジピン酸 (AAA) を経由してリジンを生合成するが、この経路の AAA 以降の後半の経路では AAA の α -アミノ基の保護基として LysW という小さなタンパク質を用い、この LysW がリジン生合成を効率よく進めるためのキャリアタンパク質としての性質をもつことが申請者の所属する研究室において明らかにされている。本研究では、二つの異なるリジン生合成経路中の生合成酵素について、構造生物学的手法を中心として解析を行ない、これらの酵素の制御機構、及び構造や機能を解明することを目的としている。

第一章で研究の背景、目的を述べた後、第二章においては、CgAK の活性制御サブユニットである β サブユニット (CgAK β) の結晶構造を決定し、その Thr の結合による影響を明らかにしている。CgAK は Lys と Thr によって制御を受け、 $\alpha_2\beta_2$ ヘテロテトラマー構造を持つ。この α サブユニットの C 末側と β サブユニットは同一アミノ酸配列を持ち、活性制御ドメインとしての機能が知られている。本章では、この活性制御サブユニットである β サブユニットの Thr 結合型の結晶構造を決定するとともに、 β サブユニットが Thr の結合によってダイマー構造を安定化することを分子量解析により示し、この活性制御ドメインの Thr 結合によるダイマー形成が CgAK の活性制御に必須であることを明らかにした。

続いて第三章において、CgAK の $\alpha_2\beta_2$ 全体での結晶構造を Lys・Thr が結合した阻害型、Thr のみが結合した活性型、またフィードバック阻害耐性変異体である CgAK-S301F の Lys・Thr 結合型の結晶構造を決定している。これらの構造に比較から、CgAK では Lys・Thr の結合による二段階の構造変化により閉じた阻害型構造が安定化されることを示している。こ

の閉じた阻害型構造は、Lys の結合によって生じる α サブユニットの触媒ドメインと β サブユニットとの間の相互作用によって安定化している。阻害型構造の基質 Asp 結合部位では Asp 結合残基がイオン結合を形成し、閉じた構造をより安定化するとともに Asp 結合を阻害することを示唆している。また、この Asp 結合部位に Lys が代わりに結合することで阻害型構造を安定化するという CgAK の活性制御機構を提示している。これらの研究結果により、長年の謎であったリジン発酵の鍵酵素である CgAK の制御機構を初めて分子レベルで解明することに成功した。

第四章では、CgAK と同じく $\alpha_2\beta_2$ 構造を持ち、Thr によって制御を受ける *T. thermophilus* のアスパラギン酸キナーゼの活性制御を担う β サブユニット (TtAK β) の結晶構造を決定し、その Thr による制御機構の一部を明らかにしている。さらに、この TtAK β が高い熱安定性を持つことを示し、CgAK β の結晶構造の比較から、その安定性の要因が分子内部の疎水性の密なパッキングによることを明らかにした。

第五章においては、*T. thermophilus* の新規リジン生合成経路に関わるアミノ酸キナーゼ LysZ とキャリアタンパク質 LysW の複合体の結晶構造や、LysW に AAA が付加した LysW- γ -AAA の構造を決定している。複合体構造の表面電荷の計算などから、LysW が大部分を負電荷表面に覆われた酸性タンパク質であり、LysZ の正電荷表面と静電相互作用で結合していることが明らかにされ、LysW が AAA の α -アミノ基の保護基として働くキャリアタンパク質であることを示している。本章の成果から、全く新しいシステムでのリジン生合成システムの一部を明らかにすることに成功した。

以上本研究では、*C. glutamicum* 由来の AK の結晶構造解析や *T. thermophilus* の新規リジン生合成経路の酵素の結晶構造解析を通じ、リジン生合成における長年の謎であった制御機構や新規な機能を分子レベルで明らかにすることに成功している。これらの成果は、さらなる効率的なリジン生産系の開発に向けての酵素デザインなどの基盤となると考えられ、学術的・応用的に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。