

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 イン ルル

我々人間を含む生物の共通の祖先は、現在よりも単純な遺伝子や酵素のセットを持っており、それらを用いて自らの生命活動を維持していたと考えられている。酵素の機能の進化の理論としてパッチワーク仮説が広く信じられている。この仮説によれば、原始生命に含まれている酵素は基質特異性が寛容であり、複数の化合物を基質とした反応を行い各種の必要な反応を行っていたとされている。そうした基質特異性の寛容な酵素をコードする遺伝子が重複を起こすとともに、変異が蓄積し特定の基質に対する高い特異性を獲得することにより、現在多岐に分かれた代謝・物質変換系が構成されていったとされている。しかしながら、それを直接的に証明した研究は存在していない。本論文は、 β 脱炭酸型脱水素酵素を対象として、酵素機能の進化の解明を目的として行ったもので、4章より構成される。

まず、序論で進化仮説や β 脱炭酸型脱水素酵素の概略が述べられた後、第1章では、 β 脱炭酸型脱水素として共通の祖先を持つと考えられている 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH)、isocitrate dehydrogenase (ICDH)、homoisocitrate dehydrogenase (HICDH)を系統樹解析した上で、*Escherichia coli* および *Thermus thermophilus* 由来の IPMDH と ICDH について基質特異性解析を行っている。IPMDH と ICDH が本来の基質に高い親和性をもつと同時に、予想外なことに弱いながらも HICDH 活性を有することが明らかにされている。

第2章では、まず 183 種類の β 脱炭酸型脱水素酵素のアミノ酸配列を用いて、IPMDH 祖先型、ICDH 祖先型、 β 脱炭酸型脱水素酵素全ての祖先型（全祖先型）のアミノ酸配列が推定された。ついで、それらを祖先型酵素をコードする遺伝子を大腸菌において発現、精製し、遺伝子産物である酵素の熱安定性と基質特異性が調べられた。IPMDH 祖先型酵素は不溶性タンパク質生産したため、その後の解析は行われなかったが、ICDH 祖先型酵素と全祖先型酵素は可溶性タンパク質として生産された。現存する生物の共通祖先は超好熱性であるという考えが支持されているが、ICDH 祖先型酵素と全祖先型酵素は中温域で変性したことから、今回設計したアミノ酸配列には安定を低下させるものが含まれている可能性が考えられた。これら 2 つの祖先型酵素のうち、ICDH 祖先型酵素は活性を示さなかったため、全祖先型酵素について活性を検討した結果、全祖先型酵素は IPMDH 活性だけでなく、弱いながらも ICDH 活性を有することが反応産物の超高度 HPLC-MS/MS 解析によって示されている。

第3章では、超好熱性古細菌である *Thermococcus kodakarensis* の TK0280 の基質特性について調べられている。TK0280 は、 β 脱炭酸型脱水素酵素の系統解析により、 β 脱炭酸型脱水

素酵素ファミリーの進化の初期段階から分岐している。このことから、TK0280 が β 脱炭酸型脱水素酵素ホモログの中で、最も古いタイプの酵素の性質を有していると考えられた。そこで TK0280 遺伝子を *E. coli* において発現、精製し、遺伝子産物である酵素の活性を測定したところ、3つの基質 homoisocitrate、isocitrate と 3-isopropylmalate に対する明瞭な活性が検出された。第2章および第3章の結果は、 β 脱炭酸型脱水素酵素がかつて多機能であり、それが基質特異性を狭くすることで現在の酵素へと進化したことを示すものと考えられた。

第4章では、TK0280 において基質認識に関わるアミノ酸残基を推定し、そのアミノ酸残基の改変体について基質特異性を調べている。*T. thermophilus* の HICDH の基質特異性決定基の一つである Arg85 に相当する TK0280 の残基 Leu83 の Ser 置換は、3-isopropylmalate に対する活性を失わせると同時に isocitrate に対する活性を 1/5 程度に低下させた。その一方で、同改変は homoisocitrate に対する活性を 2.5 倍程度上昇させた。複数のアミノ酸置換の蓄積により酵素の基質特異性が徐々に変化する場合、オリジナルな基質に対する特異性を残したまま新しい基質に対する特異性が生じる中間状態を経ることがこれまでに行われた分子進化工学的研究で明らかになってきている。この事実は、基質特異性が寛容な酵素は、基質特異性が狭い酵素に比べて比較的少数のアミノ酸置換で基質特異性を変化させうることを示唆している。第5章の結果は、基質特異性が寛容な TK0280 においても、同様に数少ないアミノ酸置換で基質特異性が容易に変化することを示したもので、TK0280 が進化を受け入れる能力が高い祖先型の性質を保持した酵素であることを示している。

以上、本論文は、 β 脱炭酸型脱水素酵素の機能および進化の解明を目指し祖先型酵素の設計及び祖先型に近い酵素の性質を明らかにしたものであり、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。