

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	秀 瀬 涼 太
論文題目	Studies on Bacterial Dihydropyrimidine Dehydrogenases (細菌型ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>鉄硫黄クラスターは、種々の酸化還元反応における電子伝達体や、化学反応における触媒として機能する重要なコファクターである。<i>Escherichia coli</i> では、L-システインからの硫黄脱離を触媒するシステインデスルフラナーゼ IscS が、鉄硫黄クラスター生合成における硫黄の供給に関与すると報告されている。しかし、<i>E. coli</i> に 100 種以上存在すると推測される鉄硫黄タンパク質のうち、いずれの鉄硫黄タンパク質が IscS に依存して生合成されるのか、全容は不明である。本論文は、IscS 依存的に生合成される新規鉄硫黄タンパク質としてジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) を同定し、本酵素の酵素学的特性・生理的性質を明らかにするとともに、本酵素の <i>in vivo</i> での活性を指標として鉄硫黄クラスター生合成機構を解析したものである。また、本酵素のホモログである <i>Pseudomonas putida</i> 由来 DPD の酵素学的特性・生理的性質・発現調節機構も明らかにした。それらの成果は以下のように要約される。</p>			
<p>1. <i>E. coli</i> DPD の同定と諸性質の解明</p> <p>IscS に依存して成熟する鉄硫黄タンパク質を探索するため、<i>E. coli</i> K12 の野生株と <i>iscS</i> 欠損株とで鉄含有量に顕著な違いのあるタンパク質を探索した。その結果、機能未知タンパク質であった PreT と PreA を見いだした。PreT と PreA はオペロン様構造をなす 2 つの ORF (<i>preT-preA</i>) にコードされており、ブタ由来 DPD の N 末端領域と C 末端領域に対してそれぞれ 30% 程度の相同性を有していた。PreT と PreA は [Fe₄S₄] 型鉄硫黄クラスターをもつ $\alpha_2\beta_2$ 型ヘテロ四量体の鉄硫黄フラボタンパク質を構成し、ウラシルおよびチミンを NADH 依存的に還元してそれぞれ 5,6-ジヒドロウラシル (DHU) および 5,6-ジヒドロチミンを生成する活性を示した。ほ乳類の DPD はウラシルおよびチミンから β-アミノ酸を生成するピリミジン還元的分解経路の初発酵素として機能することが知られているが、<i>E. coli</i> は本代謝経路をもたず、DPD の生理的役割は不明であった。解析の結果、<i>E. coli</i> DPD は、対数増殖期ではウラシルから DHU への変換、定常期以降では DHU からウラシルへの変換に寄与していることを示した。</p>			
<p>2. <i>P. putida</i> DPD の同定と諸性質の解明</p> <p><i>P. putida</i> の DPD ホモログである PydX と PydA が $\alpha_2\beta_2$ 型ヘテロ四量体の鉄硫黄フラボタンパク質を構成し、ウラシルおよびチミンを NADPH 依存的に還元してそれぞれ DHU および 5,6-ジヒドロチミンをあたえることを見いだした。本菌の DPD 欠損株はウラシルおよびチミンを資化できなかったことから、本菌の DPD がピリミジン還元的分解経路の初発酵素であることを示した。さらに、<i>P. putida</i> におけ</p>			

る DPD 遺伝子の転写が、*E. coli* のピリミジン分解経路である Rut 経路遺伝子群の転写制御因子 RutR のホモログによって制御されていることを明らかにした。

3. *E. coli* DPD の *in vivo* 活性発現を指標とした鉄硫黄クラスター生合成機構の解析

E. coli 野生株を [2-¹⁴C] DHU 含有培地で生育させた際、菌体の放射能が増加する現象を見いだした。[2-¹⁴C] DHU は DPD によって [2-¹⁴C] ウラシルへと変換され、これに由来する放射性のヌクレオチドが DNA や RNA に取り込まれることが、菌体放射能増加の原因であると推測した。実際、遺伝子破壊によって DPD を欠損させると、[2-¹⁴C] DHU 含有培地生育菌体の放射能増加が顕著に抑制された。この現象に着目し、鉄硫黄クラスター生合成に関わる新規因子の探索と、鉄硫黄クラスター生合成機構の解析を行った。3985 の *E. coli* 全非必須遺伝子欠損株について、[2-¹⁴C] DHU 含有培地生育時の放射能増加が顕著に抑制されたものを選抜することにより、DPD 活性に影響をあたえる遺伝子として 47 遺伝子を同定した。これらは、鉄硫黄クラスター生合成に関わると推定される鉄代謝関連遺伝子を含む。また、同様の手法により、鉄硫黄クラスター生合成の足場となる IscU の機能に必須なアミノ酸残基を同定した。IscU への変異導入が DPD 活性におよぼす影響を解析することにより、Cys37、Cys63、His105、Cys106 が IscU の *in vivo* での機能に必須であることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DPD は、ほ乳類や植物においてピリミジン還元的分解経路の初発酵素として機能することが知られているが、真正細菌における DPD の酵素学的特性や生理的役割の詳細は長らく不明であった。本論文は、*E. coli* と *P. putida* の DPD を同定し、諸性質を明らかにするとともに、*E. coli* DPD の *in vivo* での活性を指標として本酵素のコファクターである鉄硫黄クラスターの生合成機構を解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. *E. coli* の機能未知タンパク質 PreT と PreA が $\alpha_2\beta_2$ 型ヘテロ四量体を形成して DPD として機能することや、本酵素のコファクターである鉄硫黄クラスターが、システインデスルフラゼ IscS 依存的に生合成されることを明らかにした。ほ乳類 DPD が 1 種類のポリペプチド鎖からなる NADPH 依存的な酵素であるのに対し、*E. coli* の DPD が 2 種類のポリペプチド鎖からなる NADH 依存的な酵素であることを示した。さらに、ピリミジン還元的分解経路をもたない *E. coli* における DPD の生理機能を解析し、本酵素が対数増殖期ではウラシルから DHU への変換、定常期以降では DHU からウラシルへの変換を担っていることを見いだした。細菌型 DPD の成熟化機構やユニークな酵素学的・生理学的特性を明らかにしたもので高く評価される。

2. *P. putida* の PydX と PydA が $\alpha_2\beta_2$ 型ヘテロ四量体を形成し、DPD として機能することを明らかにした。また、本酵素が NADPH 依存的な還元反応を触媒することや、ピリミジン還元的分解経路の初発酵素として機能することなど、*E. coli* DPD とは明確に異なる特性をもつことを明らかにした。さらに、*E. coli* のピリミジン分解経路である Rut 経路の遺伝子転写制御因子 RutR のホモログが、*P. putida* では DPD 遺伝子の発現を制御することを見いだした。混沌としていた細菌のピリミジン分解経路を総括的、系統的に理解することを可能にした意義深い研究成果である。

3. *E. coli* DPD が DHU の核酸への取り込みに関与することを見いだした。[2-¹⁴C] DHU 含有培地での生育に伴う菌体の放射能増加が DPD 活性に依存することに着目し、本酵素のコファクターである鉄硫黄クラスターの生合成に関与する因子の網羅的解析と、生合成機構の解析を行った。鉄硫黄クラスター形成機構を *in vivo* で解析する新しい方法を確立したもので特筆に値する。

以上のように本論文は細菌型 DPD の酵素学的諸性質と生理的役割を明らかにするとともに、本酵素のコファクターである鉄硫黄クラスターの生合成機構の一端を解き明かしたものであり、分子微生物学、酵素化学、生物無機化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 23 年 2 月 14 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降