

京都大学	博士 (工学)	氏名	富田 宏 矢
論文題目	Studies on the mechanisms of coenzyme A biosynthesis in the Archaea (アーキアにおける coenzyme A 生合成機構に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、アーキアにおける補酵素 A (coenzyme A, CoA) 生合成機構に関する諸問題の解決を目標とし、様々な酵素の遺伝学的・生化学的な解析を通じた生命システムの解明をまとめたものであり、序論、本編 4 章、結論から構成されている。</p> <p>序論では、アーキアの分類、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の性質、<i>T. kodakarensis</i> における遺伝子組換え技術、CoA 生合成経路の全景およびその制御機構について、および本論文の意義等がまとめられている。</p> <p>第 1 章では、アーキア特有の新規酵素である pantoate kinase (PoK) に関する生化学的解析について述べている。バクテリアや真核生物は、pantoate から 4'-phosphopantothenate への変換において pantothenate synthetase (PS), pantothenate kinase (PanK) の 2 つの酵素を利用するが、ほぼ全てのアーキアはこれらのホモログ遺伝子を持たず、代わりに新規に発見された酵素である pantoate kinase (PoK), phosphopantothenate synthetase (PPS) を利用する。PoK, PPS はこれまで知られていなかった酵素活性を持つので、それらの解析を進めることで新たな物質認識・変換機構の発見が期待され、本章では PoK に対する解析を進めている。野生型酵素を用いた解析の結果、PoK は pantoate による基質阻害を受け、また ATP のみならず GTP, CTP, UTP も利用できるヌクレオチド特異性の低いキナーゼであることが明らかにされた。加えて、CoA 生合成の制御機構にも着目している。CoA 合成は多大なエネルギーを消費するため、過剰な CoA 合成を回避するための制御機構の存在が期待される。真核生物およびバクテリアにおいては既に研究が行われ、PanK に対する CoA によるフィードバック阻害を介した制御の存在が知られている。しかしながらほぼ全てのアーキアは PanK を持たないので、その制御機構は不明であった。本研究では PoK に対する CoA や acetyl-CoA の影響を調べ、PoK はそれらによって影響を全く受けないことが述べられている。さらに、活性中心残基を同定するため、様々なアーキアの持つ PoK ホモログのアミノ酸配列を比較した。これらのタンパク質に高度に保存されていて、反応性の高いアミノ酸残基に対する点変異の導入と変異型タンパク質を使った解析を行い、PoK の酵素活性に重要な 7 個のアミノ酸残基が同定されている。以上のように、新規酵素 PoK に関する様々な酵素学的特性が解明され、酵素反応機構に関する新たな知見が述べられている。</p> <p>第 2 章では、もう一つの新規酵素である PPS の生化学的解析について述べている。本研究の結果、PPS は 4-phosphopantoate および ATP による基質阻害を受け、ATP および β-alanine に対する厳密な基質特異性を示すことが明らかにされた。また PoK と同様、PPS に関しても CoA および acetyl-CoA の影響が調べられ、PPS もそれらによって影響を受けないことが述べられている。以上のように、本章では新規酵素 PPS に関する酵素学的な諸性質を明らかにしている。またこれに加え、PoK に対する生成物阻害の検証を行い、PoK は 4-phosphopantoate による生成物阻害を受けることを示している。</p> <p>第 3 章では、CoA 生合成の制御機構に着目し、CoA 生合成経路の第一および第二の反応を触媒する ketopantoate hydroxymethyltransferase (KPHMT), ketopantoate reductase (KPR) の解析を述べている。KPHMT に対する解析の結果、<i>T. kodakarensis</i> の KPHMT</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	富田 宏矢
<p>は N^5, N^{10}-methylene tetrahydrofolate の有無に依らず酵素活性を示すことが明らかにされた。また CoA による阻害効果の検証を行い、PoK や PPS と同様、CoA による阻害を受けないことが示されている。続いて KPR に関する解析を進めたところ、バクテリアや真核生物の KPR は NADPH 依存型であるのに対し、本菌の KPR は NADH 依存型酵素であることが明らかにされた。また KPR は CoA や acetyl-CoA の添加によって酵素活性が著しく低下し、KPR は CoA によるフィードバック阻害を受けることを述べている。さらに CoA 存在下での NADH に対する速度論的解析より、CoA は NADH と競争的に KPR を阻害することが明らかにされた。以上のように、<i>T. kodakarensis</i> における CoA 合成の制御機構は、既に知られているバクテリアや真核生物の機構とは異なっていることが証明されている。</p> <p>第4章では、CoA 分子の構成成分である β-alanine のアーキアにおける生合成機構に着目し、TK1814 遺伝子の解析について述べている。バクテリアや真核生物において、β-alanine は aspartate decarboxylase (ADC) による aspartate の脱炭酸反応、uracil または spermine からの酵素変換によって合成されることが明らかになっているが、<i>T. kodakarensis</i> を含む多くのアーキアのゲノム上にはそれらのホモログ遺伝子が存在せず、β-alanine の合成機構は不明であった。TK1814 は glutamate decarboxylase (GAD) のホモログ遺伝子であるが、アーキアにおける GAD およびその反応産物である γ-aminobutyrate (GABA) の生理的役割は未解明であったことから、TK1814 が GAD ではなく ADC として機能し、β-alanine の合成に関わる可能性が検証された。まず TK1814 の生化学的解析を行い、TK1814 は glutamate よりも aspartate に対してはるかに高い反応性を示すことが明らかにされた。この結果より、生化学的に TK1814 は ADC として機能することが示唆されている。また TK1814 遺伝子破壊株 (ΔTK1814) の生育特性を調べた結果、ΔTK1814 株の明確な増殖は見られなかったが、β-alanine または CoA の添加によってその生育が回復したことから、TK1814 は <i>T. kodakarensis</i> における ADC として機能し、β-alanine, CoA の合成に重要であることが遺伝学的に示されている。一方で、GAD 反応の生成物である GABA を加えても生育は回復しなかったことから、TK1814 の GAD 活性は <i>T. kodakarensis</i> の生育に重要ではないことが示されている。以上のように、<i>T. kodakarensis</i> において、β-alanine は GAD ホモログである TK1814 が ADC として機能することによって合成されることを生化学的・遺伝学的に証明している。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

氏名	富田宏矢
----	------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用い、アーキアの CoA 生合成機構における種々の未解決な問題点の解決を目標とした研究であり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. アーキア特有の新規酵素である pantoate kinase は CoA による阻害を受けず、またその酵素活性に重要な 7 個のアミノ酸残基を同定した。
2. もう一つのアーキア特有の新規酵素である phosphopantothenate synthetase は、4-phosphopantoate および ATP による基質阻害を受け、一方で CoA による阻害を受けないこと等、酵素学的な諸性質を明らかにした。
3. *T. kodakarensis* の ketopantoate hydroxymethyltransferase は N^5 , N^{10} -methylenetetrahydrofolate の有無によらず酵素活性を示し、また CoA による阻害を受けないことを明らかにした。また *T. kodakarensis* の ketopantoate reductase は NADH 依存型であり、さらに CoA によるフィードバック阻害を受けることを発見し、アーキアにおける新規な CoA 生合成の制御機構を明らかにした。
4. *T. kodakarensis* の glutamate decarboxylase ホモログは aspartate に対して高い反応性を示し、 β -alanine および CoA の生合成に重要であることを遺伝学的・生化学的な手法によって証明した。

以上のように、本論文は微生物の生命システムにおける基盤的知見を著しく向上させたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：平成26年 5月 1日以降