

京都大学	博士 (工学)	氏名	下 坂 天 洋
論文題目	Studies on coenzyme A biosynthesis and its regulation in hyperthermophiles (超好熱菌における coenzyme A 生合成およびその制御に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、超好熱菌における coenzyme A (CoA) の生合成及びその制御に関する課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て未同定であった生命機構を解明した結果をまとめたものである。その構成は、序論、本編4章、結論から成る。</p> <p>序論では、アーキアの種類、超好熱菌の分布及びその特性、超好熱性細菌 <i>Thermotoga maritima</i> と超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の性質、CoA の生合成経路とその制御機構、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、真核生物や細菌において CoA 生合成が pantothenate kinase (PanK) に対するフィードバック阻害により制御されるものの、type III PanK に分類される PanK が CoA による阻害を受けないことに着目し、type III PanK のみを有する <i>T. maritima</i> を研究対象とし、本菌における CoA 生合成の制御機構の解明を目的とした。<i>T. kodakarensis</i> において阻害の対象となる ketopantoate reductase (KPR)、type III に分類されるものの阻害の対象となる可能性がある PanK、また KPR と PanK の間の反応を触媒する pantothenate synthetase (PS) の三つを本菌におけるフィードバック阻害の対象となる可能性がある酵素と予想し、解析を行った。本菌は、従来型の KPR 遺伝子ホモログを有しておらず、KPR 活性を有することが報告されている ketol-acid reductoisomerase (KARI) 遺伝子ホモログ (TM0550) のみを有している。まず、TM0550 タンパク質が KPR 活性を有しており、<i>T. maritima</i> において主要な KPR として機能していることを確認した。PS (TM1077) 及び PanK (TM0883) についてもそれぞれ活性を有することが確認された。そして KPR、PS、PanK について、活性が CoA により阻害を受けるか検討を行った。その結果、KPR 活性および PS 活性は CoA による阻害を受けないことが確認された。一方、CoA による阻害を受けないと考えられていた type III PanK が、400 <math>\mu</math>M 以上の CoA 添加で PanK 活性を失った。これにより本菌において PanK 反応がフィードバック阻害の対象となることが示唆された。</p> <p>第2章では、アーキアにおいて唯一同定されていない CoA 生合成酵素である dephospho-CoA kinase (DPCK) を <i>T. kodakarensis</i> において同定し、アーキアにおける CoA 生合成の全容解明を目指した。<i>T. kodakarensis</i> は、細菌由来 DPCK に相同性を示す2つの推定 DPCK 遺伝子を有する。まず、これら2つの組換え型タンパク質を精製し、DPCK 活性測定を行ったところ、これらのタンパク質は DPCK 活性を示さなかった。そこで、<i>T. kodakarensis</i> が新規 DPCK を有すると予想し、探索を行った。メタゲノム解析により、数種のアーキア由来配列において arCOG04076 というグループに属する遺伝子と phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) 遺伝子が融合していることが見出された。PPAT は CoA 生合成経路において、DPCK が触媒する一段階前の反応を触媒する酵素であることから、arCOG04076 に属する遺伝子が新規 DPCK 遺伝子である可能性が示唆された。<i>T. kodakarensis</i> においては、TK1697 が arCOG04076 に属しており、</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	下 坂 天 洋
<p>本遺伝子は PPAT 遺伝子とは融合していない。組換え型 TK1697 タンパク質を用いて DPCK 活性測定を行ったところ、GTP 依存的な DPCK 活性が確認された。続いて TK1697 遺伝子破壊株を作製し、TK1697 遺伝子の <i>T. kodakarensis</i> 生体内における役割を解析した。遺伝子破壊株は CoA 要求性を示し、TK1697 遺伝子の CoA 生合成への寄与が示唆された。さらに、従来型酵素と相同性を示すものの、解析が行われていなかった bifunctional phosphopantothenoylcysteine synthetase-phosphopantothenoylcysteine decarboxylase (PPCS-PPCDC) と PPAT についても、その遺伝子破壊株が CoA 要求性を示すことを明らかにした。本研究により <i>T. kodakarensis</i> における CoA 生合成の全容が明らかとなった。</p> <p>第 3 章では、第 2 章において同定された新規 DPCK について変異体の解析により、DPCK 反応に重要なアミノ酸残基の同定及びその役割の解明を目指した。アーキアにおいて保存されている 163 種の DPCK ホモログタンパク質の配列をもとに配列のアライメントを作製し、その結果 13 個のアミノ酸残基が広く保存されていることが明らかとなった。そこで <i>T. kodakarensis</i> 由来 DPCK について、これらの保存残基の中から機能性側鎖を有する残基について、それぞれアラニン残基へと置換した変異体を、大腸菌を用いて調製し、精製した。精製タンパク質を用いて DPCK 活性測定を行ったところ、野生型と比較して、全ての変異体において活性の低下が確認され、活性が完全に消失した変異体も確認された。活性が確認された変異体については速度論的解析を行い、それぞれの保存残基が有する役割の解明を行った。</p> <p>第 4 章では、第 2 章において DPCK 活性を示さないことが明らかとなった二つの推定 DPCK 遺伝子について、それらの本来の機能の解明を目指した。比較ゲノム解析などから、これらの遺伝子がそれぞれ隣接する遺伝子とともに機能し、何らかの分子を基質とするリン酸化酵素であると予想した。大腸菌により調製し、精製した各組換え型タンパク質を用いた解析の結果、これらのタンパク質が基質とする分子が明らかとなり、その機能解明が行われた。</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>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱菌を研究題材とし、coenzyme A (CoA) の生合成及びその制御における種々の未同定の課題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通りである。

1. 超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* において、これまで CoA による阻害を受けないと考えられていた type III pantothenate kinase (PanK) が、CoA による阻害を受けることを明らかにした。これにより本菌において PanK 反応がフィードバック阻害の対象となることが示唆された。
2. アーキアにおいて唯一未同定であった CoA 生合成酵素である dephospho-CoA kinase (DPCK) を超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において探索し、真核生物や細菌が有する DPCK とは構造上異なる新規の DPCK を同定し、本菌における CoA 生合成の全容を解明した。
3. *T. kodakarensis* において同定された新規 DPCK について、ホモログとの配列比較により、高く保存されているアミノ酸残基を同定した。それらの一部について、それらを置換した変異体を調製し、活性評価を進めることにより、DPCK 反応に重要なアミノ酸残基を同定し、DPCK 活性におけるそれらの役割を明らかにした。
4. *T. kodakarensis* において DPCK と予想されていたものの DPCK 活性を有さないことが明らかとなった二つの遺伝子について、組換え型タンパク質を調製し、それらが有する酵素活性を明らかにした。

以上のように、本論文は超好熱菌に分類される微生物における CoA の生合成及びその制御機構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、令和3年2月17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：令和3年6月23日以降