

京都大学	博士 (工学)	氏名	Jin Jianqiang
論文題目	Studies on lipoic acid biosynthesis in hyperthermophilic archaea (超好熱性アーキアにおけるリポ酸生合成に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、超好熱性アーキアにおける補酵素リポ酸の生合成および 1 炭素単位の代謝に関連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、アーキアと超好熱菌の分類および特性、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の性質、リポ酸の生合成経路とそれが機能する 1 炭素単位 (C₁) の代謝、鉄-硫黄クラスターの形成機構、C₁代謝に関連する他の補酵素の生合成経路、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、<i>T. kodakarensis</i> を含む多くのアーキアにおいて不明であった lipoyl synthase の同定を目指した。リポ酸は硫黄を含む脂肪酸で、1 炭素単位を様々な化合物に供与するグリシン開裂経路 (GCS) において補酵素として機能する。リポ酸は GCS を構成する H-protein などのタンパク質上でリポイル基として生合成される。一般的に、acyl carrier protein 上のオクタノイル基が H-protein 上に転移され、次に lipoyl synthase (LipA) によって硫黄が挿入されてリポイル基が生成される。<i>T. kodakarensis</i> は GCS を有しリポ酸も生合成していると考えられたが、既知の lipoyl synthase と相同性を示す遺伝子はゲノム上に存在しなかった。<i>T. kodakarensis</i> において biotin synthase と推定されていた TK2109 および TK2248 の遺伝子を破壊するとリポ酸要求性を示すことがこれまでに分かっていた。よって、これらの遺伝子がリポ酸生合成に関与することは予測されていたが、それらがコードするタンパク質が触媒する反応は不明であった。</p> <p>そこで、TK2109 および TK2248 タンパク質を、大腸菌を用いて調製した後、熱処理および各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。硫化ナトリウムと鉄イオンの存在下で精製タンパク質を静置することにより鉄-硫黄クラスターの再構成処理を行った。オクタノイル基で修飾されたオクタペプチドを基質として化学合成し、lipoyl synthase 反応を行い、反応産物を HPLC および LC-MS により解析した。その結果、これら 2 つのタンパク質を同時に添加した際に lipoyl synthase 活性を示すことが明らかとなった。TK2109 および TK2248 は、既知の LipA とは相同性をほとんど示さないため、構造上新規な lipoyl synthase であることが明らかとなった。</p> <p>第 2 章では、<i>T. kodakarensis</i> における lipoate-protein ligase (Lpl) の機能解明を目指した。Lpl は遊離のリポ酸を H-protein などに直接結合してリポイル化タンパク質を生成し、リポ酸サルベージ経路で機能しているとされている。既知の Lpl の N 末端および C 末端と相同性を示す遺伝子、TK1234 および TK1908 の機能解明を進めた。</p> <p>TK1234 および TK1908 タンパク質を、大腸菌を用いて調製した後、熱処理および各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、精製組換え型タンパク質の解析を進めた。まず、ゲル濾過クロマトグラフィーを利用した高次構造解析を行った結果、TK1234 および TK1908 組換え型タンパク質はヘテロダイマーを形成することが明らかとなった。次に、脂肪酸修飾のないオクタペプチドと遊離のリポ酸を基質として、lipoate-protein ligase 反応を行い、HPLC および LC-MS によって反応産物を解析した。その結果、lipoate-protein ligase 活性を示すことが明らかとなった。また、TK1908 が ligase 活性を示し、</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	Jin Jianqiang
<p>TK1234 はその活性を高めることが示唆された。一方、リポ酸の代わりにオクタン酸を基質にした際も、リポ酸を用いた場合と同程度の <i>ligase</i> 活性を示した。次にこれらの遺伝子の生理的機能を検討するため、各遺伝子の破壊株を作製した。<i>T. kodakarensis</i> においては GCS による C₁ 付加によりグリシンからセリンが生合成されることから、GCS が機能しないとリポ酸を生合成できずセリン要求性を示すことになる。Lpl はリポ酸のサルベージに機能していると考えられていたため、<i>lipoyl synthase</i> が構成する <i>de novo</i> 合成系がある限りは、<i>lpl</i> 遺伝子破壊株はセリン要求性を示さないと考えられた。しかし意外なことに、TK1908 遺伝子破壊株はセリン要求性を示した。これにより、Lpl はリポ酸のサルベージだけでなく、リポイル化タンパク質の <i>de novo</i> 生合成にも寄与していることを明らかにした。何らかの経路で生合成した遊離オクタン酸を、Lpl が H-protein に転移し、<i>lipoyl synthase</i> により硫黄を挿入してリポイル化 H-protein を生合成する経路の存在が示唆された。</p> <p>第 3 章では、鉄-硫黄クラスターを形成する足場タンパク質の同定を目指した。上記の <i>lipoyl synthase</i> は硫黄ドナーおよび補酵素として鉄-硫黄クラスターを必要とするが、アーキアにおける鉄-硫黄クラスター形成機構の詳細は不明であった。</p> <p>大腸菌において足場を形成する 3 種のタンパク質と相同性を示すタンパク質を探索したところ、2 種のタンパク質をコードする遺伝子のみがゲノム上に存在した。これらのタンパク質のみで足場を形成している可能性を考え、各精製組換え型タンパク質を調製した。これらの組換え型タンパク質を硫化ナトリウムと鉄イオンの存在下で静置したところ、鉄-硫黄クラスターの形成を示唆する 420 nm の吸光を示した。一方、システイン由来の硫黄を足場へ転移する <i>cysteine desulfurase</i> の組換え型タンパク質も調製し、足場タンパク質、システイン、鉄イオンと混合して静置した。その結果、この場合も鉄-硫黄クラスターの形成が示唆された。さらに、これらの鉄-硫黄クラスター含有足場タンパク質と鉄-硫黄クラスターの再構成処理を行っていない <i>lipoyl synthase</i> を混合したところ、<i>lipoyl synthase</i> が硫黄挿入活性を示すようになった。これらの実験から、本菌における鉄-硫黄クラスター形成の足場となるタンパク質を明らかにした。</p> <p>第 4 章では、C₁ 代謝で機能する補酵素メタノプテリン様化合物の生合成に関わる還元酵素の同定を行った。本菌を含む複数のアーキアは C₁ 代謝の補酵素として 5,6,7,8-テトラヒドロメタノプテリン (THMPT) 様化合物を用いていると考えられるが、その生合成で機能する還元酵素の相同遺伝子がゲノム上には存在しなかった。</p> <p>還元酵素と推定されているものの、基質や真の機能が不明であった遺伝子の破壊株を作製した。表現型の解析を行ったところ、リポ酸要求性は示さない一方でセリン要求性を示した。また、細菌や真核生物において C₁ 代謝の補酵素として機能しているテトラヒドロ葉酸を添加すると増殖が部分的に相補された。これらは本遺伝子が C₁ 代謝で機能する補酵素の生合成に寄与していることを示唆する。また、これまでにメタン生成アーキアにおいて、THMPT を生合成するための還元酵素をコードする別の遺伝子が同定されていたが、本論文で解析した遺伝子を有するほとんどのアーキアはその遺伝子を持っていなかった。これらのことから、<i>T. kodakarensis</i> において C₁ 代謝に寄与する補酵素を生合成するための還元酵素を同定できたことが示唆された。</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>			

氏名	Jin Jianqiang
----	---------------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究題材とし、超好熱性アーキアにおける補酵素リポ酸の生合成および1炭素単位の代謝に関連する種々の未同定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. 多くのアーキアにおいて未同定であった lipoyl synthase 遺伝子の探索を行い、biotin synthase と推定されていた酵素が一次構造上新規な lipoyl synthase であることを組換え型タンパク質の解析により明らかにした。
2. Lipoate-protein ligase と推定されていた酵素の組換え型タンパク質の解析により、本酵素がリポ酸に加えオクタン酸のタンパク質への結合活性も示すことを明らかにした。また遺伝学的解析により、遊離リポ酸をサルベージしてタンパク質に結合するのが役割だと考えられてきた本酵素が、オクタン酸-タンパク質結合活性によりリポイル基の *de novo* 合成にも関与していることを明らかにした。
3. 上記の lipoyl synthase が硫黄ドナーおよび補酵素として必要とする鉄-硫黄クラスターを形成するための足場として機能するタンパク質を、組換え型タンパク質の解析により明らかにした。細菌における既知の足場は3種類のタンパク質から構成されるのに対し、本菌では2種類のタンパク質が足場を形成していることを明らかにした。
4. 脂肪酸生合成に関与する還元酵素の遺伝子と相同性を示す遺伝子の遺伝学的解析を行い、1単位炭素のキャリアーとして機能する補酵素の生合成に寄与する還元酵素をコードする遺伝子である可能性を示した。

以上のように、本論文は超好熱性アーキアに分類される微生物の生命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5年2月20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： R5 年 6 月 23 日以降