

氏 名	かた 片	やま 山	たか 高	ね 嶺
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 1063 号			
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻			
学位論文題目	Studies on Expression of Tyrosine Phenol-Lyase Gene in <i>Erwinia herbicola</i> (<i>Erwinia herbicola</i> チロシンフェノールリアーゼ遺伝子の発現調節に関する研究)			
	(主査)			
論文調査委員	教 授 熊 谷 英 彦	教 授 清 水 昌	教 授 江 崎 信 芳	

論 文 内 容 の 要 旨

バクテリア *Erwinia herbicola* のチロシンフェノールリアーゼ (TPL) はピリドキサルリン酸を補酵素とする多機能酵素であり、パーキンソン病の治療薬L-DOPAの工業生産に利用されている。*E. herbicola* は、培地に加えたL-チロシンによる誘導によりTPLを生合成する。また、このTPLの生合成はグルコースによる抑制を受ける。

本論文は、*E. herbicola*におけるTPL遺伝子 (*tpl*) の発現調節機構を解析し、その結果を取りまとめたものであり、その内容は以下のように要約できる。

1) *E. herbicola* は、チロシン添加誘導培地で生育したときのみ*tpl*のmRNAを大量に生成した。また、誘導培地にグルコースを添加すると、そのmRNA量が10分の1程度にまで減少した。しかしこの転写抑制は、cAMPの添加によって若干回復した。これらの結果から著者は、TPLの発現が主に転写レベルでの調節によって行われていること、またグルコースによる転写抑制はcAMP receptor protein (CRP) を介したものであると判断した。さらに著者は、*tpl*の転写開始点が、翻訳開始点から121塩基上流のグアニンであることを明らかにした。

2) *tpl* 上流域の塩基配列を翻訳開始点から630塩基上流まで解析し、その中に転写調節因子TyrRが結合すると考えられる配列を3カ所確認した。また、CRPが結合すると考えられる配列も確認した。TyrRは、芳香族アミノ酸をエフェクターとして芳香族アミノ酸の生合成や輸送に関わる遺伝子群の転写調節因子であることが大腸菌で明らかにされている。そこで、様々な長さの*tpl* 上流域を保持する*tpl*'-*lac* フュージョンを作製し、大腸菌ゲノム上にシングルコピーで導入し、発現様式を検討した。その結果、転写開始点から350塩基までの上流域が*tpl* の完全な誘導発現に必須であることを示した。また、大腸菌の*tyrR*⁻株では、チロシンによる誘導が全くなくなることで、*crp*⁻株では、割合は低下するがチロシンによる誘導があることを確認した。

3) *E. herbicola* ゲノムライブラリーから*tpl*の転写活性化因子をクローニングすることを試み、2段階のスクリーニングにより、*tpl*'-*lac* フュージョンの発現を活性化する因子の遺伝子を保持するクローン株を得た。これらの遺伝子を保持するクローン株は、宿主大腸菌が*tyrR*⁻であったにもかかわらず*TyrR*⁺の表現型を示した。このことは、*tpl*の転写活性化因子をコードする遺伝子として*E. herbicola*の*tyrR*をクローニングしたことを示す。塩基配列より推定したアミノ酸配列は既知の3種の細菌由来のTyrRと約70%程度の相同性を示した。

4) TyrRを介した*tpl*の転写調節機構を解明するために、TyrRの結合サイト3カ所のそれぞれに、あるいはその全てに変異を導入した*tpl*'-*lac* フュージョンを作製した。そして*E. herbicola*の*tyrR*を低コピー数プラスミド上に組み込んで形質転換した大腸菌内でこれらフュージョンの発現およびチロシンによる誘導を調べた。また、グリセロールまたはグルコースのいずれかを炭素源として使用して、CRPによる調節についても検討した。その結果、TyrR結合サイトのどれか一つだけに変異を導入しても、誘導の低下が見られたことから、TyrR結合サイトの3カ所全てが、チロシンによる誘導に重要である

ことを明らかにした。また、TyrR結合サイトすべてに変異をかけたものについては、チロシンによる誘導もグルコースによる抑制も見られなくなることを明らかにした。この結果に基づいて、TyrRおよびCRPによるTPL発現調節のモデルを提案した。

論文審査の結果の要旨

バクテリア *Erwinia herbicola* は、培地中にチロシンが多量に存在するとチロシンフェノールリアーゼ (TPL) を誘導発現し、チロシンをピルビン酸、アンモニアおよびフェノールに分解する。また、この逆反応を利用して、ピルビン酸、アンモニアおよびピロカテコールからパーキンソン病の治療薬L-DOPAを合成することが可能であり、*E. herbicola* TPLはその工業的生産に利用されている。しかしながら、チロシンによるTPLの誘導生成機構の詳細は、いまだ明らかではない。そこで、著者は、TPL遺伝子 (*tpl*) の発現調節機構を解明することを目的として本研究を行い、関与する転写調節因子を解明するとともにその調節機構のモデルを提唱した。

評価すべき主な点は以下のとおりである。

- 1) *E. herbicola* TPLのチロシンによる誘導は主に転写段階で行われていること、またcAMP依存性のカタボライトリプレッションをうけることを明らかにした。また、転写開始点を決定した。
- 2) 大腸菌内において *tpl* の転写が、調節因子TyrRおよびCRPによって制御されることを明らかにした。また *tpl* の転写活性化においてTyrRが直接的な役割を担っているのに対しCRPは二次的な作用をしていることを示唆した。
- 3) *lac* レポーターシステムを利用することにより *E. herbicola* ゲノムライブラリーより *tpl* の転写活性化因子をコードする遺伝子を直接クローニングした。その塩基配列を決定し、これが *tyrR* であることを明らかにした。
- 4) *tpl* の上流域に変異を導入してその発現様式を検討することによりTyrRを介した *tpl* の転写活性化メカニズムを提唱した。すなわち、チロシンの結合によってTyrRがダイマーからヘキサマーへと構造転換し、DNAがループ構造をとることが重要なプロセスであること、CRPはこの際、DNAの折れ曲がりを引き起こすことでその構造転換を補助しているというモデルを提案した。

以上のように本論文は、従来、大腸菌において芳香族アミノ酸の生合成系酵素などの発現調節因子として知られていたTyrRが、分解系の酵素であるTPLの発現調節も行っていることを始めて解明すると共に、その転写調節の詳細な機構を明らかにしたものであり、分子生物学、応用微生物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11年2月12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。