

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	出 口 賢 児
論文題目	Physiological and biochemical studies on microbial 2'-deoxyribonucleotide biosynthesis and oxidative pyrimidine metabolism (微生物の 2'-デオキシリボヌクレオチド生合成および酸化的ピリミジン代謝に関する生理学的ならびに生化学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>核酸 (DNA および RNA) は、塩基、糖、およびリン酸で構成されるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって重合した生体高分子である。核酸は遺伝情報の保存、転写、翻訳において重要な役割を果たしており、生命の基本原理であるセントラルドグマに不可欠である。さらに、核酸関連化合物は医療などの産業分野においても重要な物質である。例えば、ヌクレオシドアナログであるトリフルリジンは、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ラブドウイルス、オルソポックスウイルス感染症の抗ウイルス分子として利用されている。また、転移性大腸がんや消化器腫瘍の抗がん剤としても利用されている。</p> <p>これまでに、微生物の核酸代謝経路の解明から見いだされた微生物酵素を用いて、産業利用を目的とする新たな合成系の開発が行われてきた。例えば、2-デオキシリボース 5-リン酸アルドラーゼ経路 (DERA 経路) による 2'-デオキシリボヌクレオシド (dNS) 合成系の開発や、ピリミジン代謝経路の活用と塩基置換によるプリンヌクレオシド合成法の開発などである。DERA 経路は産業利用以外にも、2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドから合成するリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) 経路を代替しうる経路として、生命分子進化の観点からも注目されている。また、ピリミジン代謝の一つである酸化経路の酵素学的研究は進んでいない。本論文では、第一章において大腸菌の RNR 欠損株 (ΔRNR 株) を構築し、その生育特性の解明を通して RNR 経路を代替しうる経路を提案することで、生命分子進化の新たな論点を提案している。第二章ではピリミジン酸化経路の未解明酵素の機能を明らかにしている。</p> <p>第一章では大腸菌の RNR 欠損株 (ΔRNR 株) が構築され、その栄養特性が明らかにされた。現在、生命の分子起源に関する仮説として、RNA ワールド仮説が最も有力とされている。RNA ワールド仮説では原初の生命はタンパク質や DNA を持っておらず、これらは後になって獲得されたものとされている。特に DNA に関しては、生合成が確認されている全ての生物が RNR 経路を用いて 2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドから生合成していることから、原始地球においても DNA は RNA に由来したとされている。しかし、先行研究において DERA 経路の酵素群を活用することでグルコースやアセトアルデヒドなど原始地球に存在しうる物質から dNS が酵素合成されることが示された。</p> <p>そこで、DERA 経路によって DNA を合成する大腸菌を構築することで、DNA が RNA からではなく別の物質からも合成されうることを検証するために、以下の3段階の実験がデザインされた。まず、大腸菌 BW38029 株の RNR 欠損株 (ΔRNR 株) の構築と RNR 欠損の生育への影響の評価、次に DERA 経路による dNS 合成系の構築、最後に DERA 経路を介して DNA を合成する大腸菌の構築である。本論文では、本検証の基盤を成す第2段階までの実験が遂行されている。</p> <p>大腸菌 BW38029 株の三組の RNR 遺伝子を破壊することで、ΔRNR 株が構築された。この株の栄養要求性を評価した結果、完全合成培地である MOPS 培地において dNS のうち 2'-デオキシシチジン (dC) のみを生育に要求することが見いだされた。さらに、この株がビタミンの一つであるニコチンアミドを要求することが判明した。これにより、ΔRNR 株の完全合成培地の構築に成功している。続いて、DERA 経路に</p>			

よる dC 合成系を構築するために、 Δ RNR 株に DERA 経路の酵素を高発現させるベクターが導入された。そして、この株を用いてグルコース、ピルビン酸ナトリウム、シトシンを基質とした休止菌体反応が行われた結果、dC ではなく 2'-デオキシウリジン (dU) の生成が確認された。これらの結果に基づき、dC の効率的な合成系の構築には DERA 経路だけでなく、ヌクレオシドデオキシリボシルトランスフェラーゼ-II (NdtII) の発現、シトシン/イソグアニンデアミナーゼ (CodA) ならびにシチジン/デオキシシチジンデアミナーゼ (Cdd) の欠損が必要という代謝デザイン指針を提案するに至っている。

第二章では、*Rhodococcus erythropolis* JCM3132 のピリミジン酸化代謝に関わるウラシル-チミンデヒドロゲナーゼ (UTDH) とウレイドマロナーゼの機能が明らかにされた。ピリミジン塩基の代謝経路としては現在、酸化経路、還元経路、rut 経路、URC 経路の 4 つが報告されている。このうち酸化経路に関わる酵素群の機能については知見が乏しい。これまでに、ピリミジン塩基分解を介して塩基交換反応によるプリンヌクレオシド合成を効率化する *R. erythropolis* JCM3132 について、酸化経路上で機能するバルビチュラーゼが報告されている。本論文では、本菌の UTDH とウレイドマロナーゼの精製と機能解析が行われた。

UTDH は *R. erythropolis* JCM3132 から調製した無細胞抽出液 (CFE) から精製された。UTDH は高アルカリ条件かつ NADP(H) 存在下で安定となり、この条件下で UTDH の精製に成功している。精製酵素を用いて、UTDH が 3 つの異なるサブユニットからなることや、メチレンブルー、フェナジンメト硫酸、ベンゾキノン、 α -ナフトキノンなどを電子受容体とするウラシルのバルビツール酸への酸化反応を触媒することを明らかにした。さらに、本酵素がウラシルとチミンだけではなく、5-ハロゲン置換ウラシルやヒドロキシピリミジンにも作用することを見いだした。加えて、UTDH 触媒反応がセリウムイオンによって促進されることを見いだした。

ウレイドマロナーゼは、C 末端側に His-tag を付加した *R. erythropolis* JCM3132 由来のウレイドマロナーゼ遺伝子を高発現する大腸菌形質転換株の CFE から精製された。精製酵素を用いて、本酵素がウレイドマロン酸のマロン酸と尿素へのアミド加水分解反応を触媒することが示された。また、本酵素がウレイドマロン酸に対して厳密な基質特異性を示すことを見いだされた。

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)

核酸は遺伝情報の保存、転写、翻訳において重要な役割を果たしており、生命の分子起源においても非常に重要な立ち位置にある。さらに、核酸関連化合物は産業分野においても重要な物質である。このような生命の分子起源の理解や核酸関連化合物の合成系の構築には、微生物における核酸関連化合物の代謝経路の理解が不可欠である。本論文は、これまで唯一のデオキシリボヌクレオチド合成経路だと考えられていた RNR 経路の代替経路を提案するとともに、知見が乏しいピリミジン酸化代謝に関わる酵素の機能を明らかにしている。評価すべき点として、以下の 3 点があげられる。

1. 大腸菌 BW38029 株の Δ RNR 株を構築し、本株が dNS のうち dC のみを要求することを明らかにした。さらに、本株がニコチンアミドを生育に必須とすることを明らかにした。これにより、 Δ RNR 株の合成培地の構築に成功した。また、DERA 経路による RNR 経路の代替には、CodA や Cdd の欠損、NdtII との共役などが付加的に必要であることを明らかにし、RNR の代替経路構築に向けた代謝デザインを提案した。
2. *R. erythropolis* JCM3132 株由来の UTDH が高アルカリ条件下かつ NADP(H)存在下で安定化することを明らかにし、これにより本酵素の精製法を確立した。得られた精製酵素を用いて、UTDH がメチレンブルーなどを電子受容体とするウラシルのバルビツール酸への酸化反応を触媒することを見いだした。さらに、本酵素がウラシルとチミンだけでなく、5-ハロゲン置換ウラシルやヒドロキシピリミジンにも作用することを見いだした。加えて、UTDH 触媒反応がセリウムイオンによって促進されることを見いだした。
3. C 末端側に His-tag を付加した *R. erythropolis* JCM3132 由来のウレイドマロンナーゼ遺伝子を大腸菌で異種発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、精製酵素を用いて、本酵素がウレイドマロン酸のマロン酸と尿素へのアミド加水分解反応を触媒することを明らかにした。また、本酵素がウレイドマロン酸に対して厳密な基質特異性を示すことを見いだした。

以上のように、本論文は微生物の核酸関連化合物代謝における未解明領域を理解することを通して、生命の分子起源に関する新たな知見を提供するとともに、産業上有用な核酸代謝酵素の詳細な機能を明らかにしたものであり、発酵生理学、応用微生物学、分子微生物科学、生体高分子化学の発展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、令和 6 年 1 月 17 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) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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（学位授与日から 3 ヶ月以内）