

氏 名	森 英 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	論 理 博 第 1344 号
学位授与の日付	平 成 10 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	核酸・アミノ酸代謝経路の新規酵素探索と機能解明を通じた生物の多様性に関する分子遺伝学的研究

(主査)

論文調査委員 教授 梅園和彦 教授 西田栄介 教授 宮田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

生物の多様化と遺伝子レベルの多様化をいかに結び付けるかは生物学の大命題の一つである。生物の形態や形質が多様化する背景にある遺伝子レベルの変化は大きく言って二種類あると考えられる。一つは新たな遺伝子の出現であり、その遺伝子により新しい形態・形質が生じる場合である。二つ目は既存の遺伝子の発現パターンの変化であり、ホメオ蛋白の発現パターン変化により動物の形態が変化するような場合である。二つ目の変化は多細胞生物の成立以降に多く生じた現象であると考えられるが、一つ目の新たな遺伝子の出現については単細胞生物においても生じていた比較的古い現象であると考えられる。しかしながら、どのような遺伝子がどのように出現して、特定の生物種に独自の形質や形態が付与されて多様化が進むのかについて具体的な解析事例は少なく、解明すべき点が多い。本論文では原核生物が材料として取り上げられ、特定の微生物種に限定される代謝酵素が二種類発見され、独自形質の進化過程解析の材料として提供された。申請者はその構造遺伝子を解析することにより、発見した酵素が司る独自の代謝系がどのようにして進化・発生してきたかを考察し、報告している。

第一章では、その存在が不明確であったプリンヌクレオシドサルベージ酵素の一つであるグアノシンイノシンキナーゼ (GIKase) を取り上げて解析を行った結果を報告している。申請者はまず大腸菌SΦ609株のプリンヌクレオチド代謝系を詳細に解析し、SΦ609株がヌクレオシダーゼと考えられる強いイノシン分解活性を保有していることを明らかにした。SΦ609株はイノシンをサルベージして生育することができず、表面的にはイノシンキナーゼ活性を持たないようであったが、SΦ609株を親株とするイノシン分解活性微弱化変異株HM1は、遅いながらもイノシンをサルベージして生育することが示された。この結果から、大腸菌においては微弱なイノシンキナーゼ活性が確かに存在するが、競合するイノシン分解活性のために、見かけ上ではイノシンキナーゼを検出することが困難であることが明らかになった。そこで申請者はHM1株のイノシン依存的生育を促進する遺伝子をクローン化した。クローン化遺伝子産物酵素の精製にも成功し、その生化学的解析から本酵素がグアノシンおよびイノシンをリン酸基受容基質とするキナーゼであり、リン酸基供与基質としてはATP以外にもdATPを利用できることを明らかにし、クローン化した遺伝子がグアノシンイノシンキナーゼ構造遺伝子 (gsk) であることを証明した。GIKaseのアミノ酸配列の相同性解析結果から、本遺伝子は大腸菌内におけるPrkBファミリーパラログの一員ではあるが他のPfkBファミリー酵素との相同性が低く、比較的高い独自の配列をコードしていることを示した。申請者がgskの塩基配列を登録して以降、いくつかのgskホモログが報告されているが、その存在は腸内細菌群を中心とした微生物種に限定されていることが示された。ここまでの検討から、特定の生物種に限定されるグアノシンおよびイノシンのサルベージ能力という形質が、gskという独自の高い配列を持つ遺伝子により発現していると結論された。

第二章では、これまでに報告の全くない立体選択性を持つ遊離L-プロリン3位水酸化酵素 (P3Hase) の発見と、その解析結果を報告している。申請者は培養微生物菌体が持つプロリン修飾活性を高感度に検出するプロトコールを独自に考案し、広く微生物をスクリーニングした。その結果2株のStreptomyces属細菌と2株のBacillus属細菌に未知の遊離プロリン

修飾活性を見いだした。最も活性の強かった *Streptomyces* sp. TH 1 株より反応産物を精製し、その構造解析を行ったところ、cis-3-ヒドロキシ-L-プロリンであることが判明した。さらに申請者はTH 1 株からP 3 Haseを精製し、その構造遺伝子をクローン化するとともに、TH 1 株がCis-3-ヒドロキシ-L-プロリンを含むペプチド性物質を生産することを見出し、P 3 Haseが放線菌の二次代謝産物生産に関与する酵素である可能性を示した。酵素学的な解析からは、P 3 HaseがFe²⁺と2-オキソグルタル酸(2-OG)に依存するジオキシゲナーゼ反応を司る酵素であることが示された。しかしながらP 3 Haseは、互いに相同性を有する既知の2-OG依存性ジオキシゲナーゼ群(IPNSファミリー)とはアミノ酸配列上で明確な相同性を示さなかった。P 3 HaseとIPNSファミリーとの共通点は [His x, Aspx+2, His x+50~70] というFe²⁺結合部位モチーフのみ(P 3 Haseではx=107, IPNSではx=214)であり、P 3 Haseが比較的独自性の高いアミノ酸配列よりなる酵素であることが示された。

GIKaseおよびP 3 Haseの両酵素の解へからは「特定の生物種にのみ存在する代謝酵素をコードする遺伝子群は独自性の高い配列を有している」という結果得られた。この結果を踏まえ申請者は「生物の多様化が進展する要因の一つとして、独自性の高い遺伝子の発生による独自形質の獲得という現象が存在する」と提唱している。本論文で明らかにされたGIKaseおよびP 3 Haseのアミノ酸配列の独自性の高さから考えて、これらの構造遺伝子が単なるgene duplicationと変異の蓄積で成立した以外の可能性も考えられた。そこで申請者は、遺伝子の水平移動とそれに続くgene shufflingによる新規遺伝子発生の可能性も考察している。

参考論文は申請者が京都大学大学院理学部生物物理学専攻の修士課程在学中に行った大腸菌転写終結因子 ρ の機能解析研究を英文学術誌に報告したものである。

論文審査の結果の要旨

生物の多様化がどの様に進展してきたかについて、形態学的観察からの系統樹は作成されているものの、その系統樹の背後に存在する遺伝子レベルの変化を具体的に記述することは困難であり、生物学の大きな課題である。多様化とは独自性の増大と同義語である。申請者は、各生物種に独特な形質がどの様に発展してきたかを遺伝子レベルで記述することを試みている。

申請者は本論文において、特定の微生物種に限定される代謝酵素を二種類発見し、独自形質の進化過程解析の材料として使用した。特定の生物種に限定される形質の研究は、特殊な形質を博物学的に提示するだけに陥りやすく、他者との比較議論が十分なされないことが多い。しかしながら本論文で提示された二つの新規酵素は、生物間で共通性が高く解析の進んでいる核酸・アミノ酸代謝系より見いだされたものであり、比較対象となる情報量が多い。申請者が見いだした二つの酵素とその構造遺伝子は、独自形質の発展過程解析の材料として有用性が高いといえる。しかしながら、核酸・アミノ酸代謝系は解析が非常に進んでおり、その中から新規酵素を発見することはかなり困難なことである。新規酵素探索のため申請者は様々な工夫をしているが、それらは正確な生化学的知識の七に緻密に構成されたものであり、申請者の研究遂行能力の高さを示すと同時に、当該分野に新たな知見をもたらすものであった。解析の進んでいる核酸・アミノ酸代謝系から新規酵素が発見できたという申請者の成果は、生物の多様性化がこれまで一般に予期されていた以上に進展していることを示唆するものであり、非常に興味深い結果である。

GIKaseに関する研究においては、イノシン分解活性弱化変異株の作成方法を独自に考案しており、作成した変異株のイノシンサルベージ能力を比較することで、大腸菌に存在するイノシンヌクレオシダーゼ活性がイノシンキナーゼ活性の阻害因子となることを生育実験で明確に示した。そしてその阻害因子を排除した株(イノシン分解活性弱化変異株)をホストとすることで、GIKase構造遺伝子の取得に成功している。この一連の研究は多様性研究に材料を提供したのみならず、大腸菌プリンサルベージ系の解明に大きく寄与するものであった。

P 3 Haseに関する研究においては、3000株強もの土壌微生物がスクリーニングされている。申請者はイミノ酸特異的な高感度検出法を考案し、それを利用して効率的なプロリン修飾体スクリーニング方法を独自に作成した。P 3 Haseは当初、L-プロリンを修飾し未知産物を与える活性として発見されたものであるが、修飾体の精製と構造決定、酵素の精製と諸性質の解析を通して、P 3 Haseが遊離L-プロリンの3位をcis型に水酸化する2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであ

ることが明らかにされた。また構造遺伝子のクローニングと組換え系による機能確認も行っている。この一連の研究により、生物界に多様なL-プロリン水酸化酵素が存在することが明らかとなり、多様性の解析研究にとって重要な知見が提示されたといえる。

本論文で示されたGIKaseならびにP 3 Hase構造遺伝子の微生物界における遍在性と両遺伝子の進化的位置づけの解析結果をもとに、申請者は「生物の多様化が進展する要因の一つとして、独自性の高い遺伝子の発生による独自形質の獲得という現象が存在する」と提唱している。今回提示されたGIKaseならびにP 3 Haseの解析結果は申請者の提言に沿うものであった。この提言を確証するには、さらなる例の積み重ねと比較が必要であるが、少なくとも2つの新たな具体例を提示できた点は評価できる。

以上に述べたように、申請者は生物の多様性を解析するために、特定の微生物群にのみ存在する新規代謝酵素を独創的な方法で発見し、その生化学的および遺伝学的解析を行った。その結果、独自性の高い形質を司る遺伝子の配列自体も独自性が高いという結果を得ている。これは、生物の多様化の進展の背後に存在する遺伝子レベルの変化を考察するための重要な知見であると考えられる。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成6月24日主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた