

氏 名	こ やなぎ たかし 小 柳 喬
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 125 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	バクテリアの芳香族アミノ酸代謝関連タンパク質群の機能解析および その応用

論文調査委員	(主 査) 教 授 山 本 憲 二	教 授 小 堤 保 則	教 授 佐 藤 文 彦
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、バクテリアの芳香族アミノ酸代謝に関連するタンパク質群の機能解析を通して新規知見を得ること、また得られた知見を芳香族アミノ酸の実用生産等にも役立て、応用面においても貢献することを目的として行った。

分岐鎖アミノ酸インポーターとして知られる LIV-I/LS システムは多くのバクテリアに存在し、ロイシン、イソロイシン、およびバリンを取り込む LIV-I システムおよびロイシンのみを取り込む LS システムから構成される ABC トランスポーターである。本研究では既知の芳香族アミノ酸トランスポーターを全て欠損させた大腸菌株にフェニルアラニンの取り込み活性が残存することを見出し、この LIV-I/LS システムが AroP (フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンのトランスポーター)、PheP (フェニルアラニンおよびチロシンのトランスポーター) に次ぐ第3のフェニルアラニントランスポーターであることを明らかにした。フェニルアラニン以外にも、新たに LIV-I システムがチロシンを、さらにこれまでロイシン特異的とされてきた LS システムがイソロイシンおよびバリンを細胞内に取り込むことも明らかにし、本システムが過去に報告されていたよりも広い基質特異性を保持することを証明した。また、LIV-I/LS によるフェニルアラニンの取り込みは AroP および PheP に比べると通常低いが、チロシンもしくはトリプトファンの存在下、すなわち AroP および PheP がフェニルアラニンの取り込みを阻害されるような環境下においては、LIV-I/LS が最も多量のフェニルアラニンを細胞内に取り込む主要なトランスポーターとして機能することを明らかにした。さらに、LIV-I/LS システムが抗生物質アザセリンに対する大腸菌の感受性に関与することも解明した。

続いて、芳香族アミノ酸代謝系遺伝子群の転写調節因子 TyrR について機能解析を行った。TyrR は、プロモーター領域を覆い隠すことによる負の調節、および遺伝子上流側からの RNA ポリメラーゼへの作用による正の調節等、様々な様式にて転写調節を行う。正負両方の調節において重要なプロセスとなるのが、ATP および芳香族アミノ酸の存在下における 2 量体から 6 量体へのオリゴマー化である。本研究では、オリゴマー化能が著しく低下した *Erwinia herbicola* 由来変異型 TyrR (TyrR^{E275Q}_{*E. herbicola*}) のサプレッサー変異体を取得し、オリゴマー化に重要なアミノ酸残基 (N324) を新たに同定することに成功した。大腸菌 TyrR において N324 の該当残基 (N316) を様々なアミノ酸で置換した変異体を作製し転写調節機能解析を行ったところ、本残基を酸性アミノ酸で置換するとオリゴマー化能が上昇し、塩基性アミノ酸で置換するとオリゴマー化能が低下することが示唆された。最も際だった転写調節能の変化が見られた TyrR^{N316D} および TyrR^{N316R} を精製し *in vitro* で機能解析を行ったところ、オリゴマー化能の上昇および低下だけでなく、ATP のみの存在下でのオリゴマー化 (TyrR^{N316D}) や、通常リガンドとならない ADP の存在下におけるオリゴマー化 (TyrR^{N316D}) といった野生型 TyrR では見られない現象が観察され、さらに ATP 加水分解活性も変化していた。TyrR と同ファミリーに属する NtrC1 の構造解析結果より推測すると、これらの機能変化は、N316 へのアミノ酸置換の導入に伴い核酸リガンドのセンサーとして働く sensor II 残基 (R417) の状態が変化したことに関与するのではないかと考えられた。

また、上記のオリゴマー化を促進するアミノ酸置換を含む 5 つのアミノ酸置換を重ね合わせた変異型 TyrR (TyrR^{V67A})

を作製して *E. herbicola* 株に導入し、パーキンソン氏病の対症療法薬 L-DOPA の工業生産を担う酵素チロシンフェノールリアーゼ (Tpl) の発現量を飛躍的に高めた株を作製した。本株を L-DOPA 生産に用いたところ生産効率がこれまで利用されてきた株に比べて大幅に改善しただけでなく、Tpl の発現誘導に不可欠であったチロシンの培地への添加も不要となった。これにより、かねてから問題となっていた L-DOPA 合成後のチロシンとの分離精製の困難さも解決されると考えられた。

続いて、変異型 TyrR の持つ高い *tpl* 転写活性化能を利用し、*tpl* プロモーターを利用した新規タンパク質大量発現系 (*tpl*-expression system) を大腸菌内において構築した。本システムにより β -ガラクトシダーゼを発現させ、既存の大量発現系である *tac* システムおよび T7 システムと比較したところ、*tac* システムの2倍以上の発現量を示した。T7 システムには発現量では及ばなかったが、多くの β -ガラクトシダーゼが不溶性画分に見られた T7 システムに対して、*tpl*-expression system においては全てのタンパク質を可溶体として発現させることに成功した。

論文審査の結果の要旨

本論文の著者は、バクテリアの芳香族アミノ酸代謝に関わるタンパク質群のうちトランスポーター (LIV-I/LS) および転写調節因子 (TyrR) に着目し、詳細な性状解析を行った。

大腸菌においては2つのフェニルアラニンインポーターが知られていたが、本論文の著者は3つ目のフェニルアラニンインポーターが存在することを発見し、それがこれまで分岐鎖アミノ酸のトランスポーターとして知られていた LIV-I/LS システムであることを解明した。本システムによるフェニルアラニンの取り込みは他の2つのシステムに比べると低かったが、低濃度のフェニルアラニンの存在下でフェニルアラニン要求性株の生育を可能にするレベルであり、生理的にも意義を有するフェニルアラニン取り込み系であることが示された。また、LIV-I/LS がこれまでに知られていたよりも広い範囲のアミノ酸基質を取り込むこと、抗生物質アザセリンに対する感受性にも関与することも証明し、フェニルアラニントランスポーターとしての機能解明だけでなく本システムの多面的な機能を明らかにした。

さらに著者は転写調節因子 TyrR のオリゴマー化能にも着目し、大腸菌 TyrR においてアスパラギン 316 がオリゴマー化において重要な役割を果たしていることを見出した。本残基を様々なアミノ酸で置換することによりオリゴマー化の促進および抑制が見られ、野生型 TyrR では報告されていない ATP のみの存在下でのオリゴマー化や ADP 存在下でのオリゴマー化といった興味深い性質を持つ変異体を取得した。TyrR のオリゴマー化に関するこのような新規知見を得ることは、TyrR のみならず AAA+ スーパーファミリーに属するタンパク質群のオリゴマー化機序の解明という意味からも、大きな寄与であると考えられる。

また、本論文のもう一つの重要な側面として、基礎的解析によって得られた知見を利用し、物質生産やタンパク質発現系の構築といった応用面に結びつけたことが挙げられる。特に *Erwinia herbicola* 菌体を利用したパーキンソン氏病の対症療法薬 L-DOPA の合成法は、もともと化学合成法に比べて生産性の面から極めて優れた合成法として知られていたが、本論文に述べられた変異型 TyrR を導入した菌株の使用によりさらに生産効率が改善されただけでなく、本合成法の唯一の弱点であった培養槽へのチロシンの添加も不必要となった。本株の使用により、L-DOPA の工業生産効率は大幅に改善されることが考えられる。またこのような実用生産面での貢献のみならず、転写調節因子の機能を改変することによってこれまでに達成しえなかったレベルでの有効な微生物育種を行うことが可能であるということを示したことも、メタボリックエンジニアリングという学問分野に対する大きな寄与であると考えられる。

このように本論文の研究は、バクテリアの芳香族アミノ酸代謝に関連するタンパク質群について機能解析を行うとともに、得られた知見を用いて物質生産やタンパク質発現といった応用面への結果にも結び付けた大変有意義なものであり、基礎的分野および応用的分野の両方において重要な貢献をするものである。

よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成19年5月9日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。