

京都大学	博士（工学）	氏名	横 大 路 裕 介
論文題目	Genetic studies on the metabolism and CRISPR-Cas system of <i>Thermococcus kodakarensis</i> （遺伝学的手法を用いた <i>Thermococcus kodakarensis</i> の代謝および CRISPR-Cas システムに関する研究）		
（論文内容の要旨） 本論文は、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の代謝および CRISPR-Cas システムについて、新たな代謝経路の同定や、本菌の代謝経路の一部の代謝機構の生理的役割の解明、および微生物の免疫機構である CRISPR-Cas システムの本菌における機能の解析の成果をまとめたものであって、序論、本論 2 部 4 章、結論から構成されている。 序論では、アーキアにおける分類や遺伝子組換え技術の現状、アーキア特有の代謝機構、CRISPR-Cas システムのメカニズム、本研究に用いた <i>T. kodakarensis</i> の諸性質に関して、および本研究の意義などがまとめられている。 第 1 部第 1 章では、アーキアにおける Coenzyme A（CoA）の生合成経路の解明について述べている。アーキアの CoA 生合成経路においては、ゲノム情報を用いた遺伝子の一次構造の比較からは pantothenate synthetase（PS）および pantothenate kinase（PanK）という連続する 2 種類の遺伝子がアーキア全体で見つからなかった。そこでアーキア全体において真核生物・細菌の既存のものとは異なる新型の PS・PanK が存在すると考え、<i>T. kodakarensis</i> を対象にこれらの同定を目指した。その候補遺伝子の探索には、比較ゲノムという既存のゲノム情報を有効に活用する手法を用いている。PanK の探索では、候補の一つである TK2141 に弱い PanK 活性を検出したが、詳細な検討の結果、TK2141 は本来 PS の基質となる pantoate に対する高い kinase 活性を示すことがわかり、本酵素を pantoate kinase（PoK）と名付けている。次に PoK に続く縮合反応を触媒する第 2 の新規酵素 phosphopantothenate synthetase（PPS）の候補遺伝子を比較ゲノムにより推定したところ、TK1686 を得ている。この遺伝子産物についての酵素活性を検討した結果、TK1686 は PS 活性を示さず PPS 活性のみを示したことを確認している。また両遺伝子の破壊株の遺伝学的解析の結果、両破壊株は CoA 要求性を示し、両遺伝子とも本菌における CoA 生合成に必須であり、PoK/PPS による経路が唯一の CoA 生合成経路であることを証明している。本研究により、アーキアで未同定であった CoA 生合成経路の pantoate から 4' -phosphopantothenate までの変換を担う 2 種の新規酵素を同定している。 第 2 章では、<i>T. kodakarensis</i> の解糖系における glyceraldehyde 3-phosphate（GAP）と 3-phosphoglycerate（3-PGA）との間の物質変換経路の生理的役割の解明について述べている。本菌の解糖系では、一般的な解糖系と異なり GAP・3-PGA 間において 3 種類の経路の存在がゲノム情報から推定されていた。そこで経路を担う各遺伝子の破壊株の生育特性の解析を行っている。その結果、従来の解糖系では両方向に機能していた GAP dehydrogenase/3-PGA kinase による経路が本菌では糖新生方向にのみ機能しており、一方他の 2 種類の経路である GAP:ferredoxin oxidoreductase（GAPOR）および non-phosphorylating GAP dehydrogenase（GAPN）は、解糖方向にのみ機能していることを証明している。また GAPOR と GAPN は糖に依存した生育条件においてどちらも必須であることも示している。これは両酵素が利用する補酵素の違いから、GAPOR が ATP 生産			

京都大学	博士（工学）	氏名	横大路裕介
の、GAPNが還元力の生産の役割をそれぞれ担っていると考えられる。 第3章では、<i>T. kodakarensis</i>のアミノ酸異化代謝の研究について述べている。本菌は10種類以上のアミノ酸を酸化分解すると考えられていた。一方ゲノム情報ではアミノ酸酸化の初発段階を担う酵素としていくつかのaminotransferase（AT）および1つのglutamate dehydrogenase（GDH）の存在が推定されており、glutamateがアミノ酸異化代謝の中で特別な役割を担っている可能性が考えられた。そこで本菌のアミノ酸分解の初発段階の機構を整理し、GDHの生理的役割およびglutamate自体の異化代謝についてGDH破壊株の解析により明らかにしている。遺伝学的解析の結果、全ての異化代謝されるアミノ酸の初期酸化は、AT反応を介してGDHのみにより行われることを証明している。またピルビン酸を培地に添加した培養条件におけるGDH破壊株の解析結果から、GDHは過度にアミノ酸が酸化された場合にはアミノ酸を生成する方向に作用し、アミノ酸の枯渇を防いでいることを明らかにしている。またglutamateの異化代謝を担う2種の遺伝子を同定している。 第2部第4章では、近年注目されている微生物の免疫機構であるCRISPR-Casシステムについての研究を述べている。本研究を通じて<i>T. kodakarensis</i>のCRISPR-Casシステムが機能していることを証明し、外来プラスミドを攻撃する際の構造上の必要条件を明らかにしている。またゲノム上のCRISPR領域の配列を組換えることにより、任意のプラスミドに対して防御反応が起こることを示している。 結論では、本論文で得られた成果について要約している。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の代謝について、新たな代謝経路の同定や生理的役割の不明な代謝の機能解明を目標に研究した成果、および微生物の免疫機構である CRISPR-Cas システムの *T. kodakarensis* における機能を検証した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. Coenzyme A 生合成経路において、アーキアでは未解明であった経路中の物質変換が、*T. kodakarensis* では 2 種類の新規活性を持つ酵素 pantoate kinase および phosphopantothenate synthetase によるアーキア特有の経路で行われていることを証明した。
2. *T. kodakarensis* の解糖系 (変型 Embden-Meyerhof 経路) における glycer-aldehyde 3-phosphate と 3-phosphoglycerate との間の 3 種類の物質変換経路の生理的役割について研究し、3 つの経路のうち 2 つの経路が解糖に、残り 1 つの経路が糖新生に寄与していることを明らかにした。
3. *T. kodakarensis* のアミノ酸異化代謝の初期酸化過程のメカニズムを研究し、異化代謝されるすべてのアミノ酸が直接あるいは aminotransferase を介して glutamate dehydrogenase (GDH) により酸化されていることを証明した。またアミノ酸の酸化分解が進行するにつれ、アミノ酸の枯渇を防ぐために GDH が同化方向に機能することを明らかにした。
4. *T. kodakarensis* の CRISPR-Cas システムが細胞内で機能していることを証明し、プラスミドを攻撃する際の構造上の必要条件を決定した。また遺伝子工学を用いるにより、任意のプラスミドに対して防御反応が起こることを示している。

以上、本論文は、微生物の生命現象に対する多くの新たな知見をもたらしたものであり、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、平成 25 年 7 月 24 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。