

氏 名	唐 曉 峰
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2083 号
学位授与の日付	平成 13 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	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON THE GENES AND ENZYMES INVOLVED IN TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS FROM A HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON, <i>THERMOCOCCUS KODAKARAENSIS</i> KOD1 (超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 由来のトリプトファン生合成系遺伝子および酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 田 中 渥 夫 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、90°C 以上でも生育可能な超好熱始原菌の一種である *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のトリプトファン生合成系の酵素および遺伝子群を研究題材とし、*trp* 遺伝子発現の制御機構解明と耐熱性酵素の高温環境下での反応特性に関する研究結果をまとめたものであって、5 章からなっている。

第 1 章では、*T. kodakaraensis* KOD1 由来のトリプトファン生合成酵素遺伝子群 (*trp* 遺伝子群) をクローニングし、その全塩基配列を決定している。7 つの遺伝子 (*Tk-trpCDEGFA*) が存在し、トリプトファン生合成に必要な全て (5 つ) の酵素に対応していた。すなわち、第 1 反応を触媒する anthranilate synthase (AS) は *Tk-trpE*, *Tk-trpG* により、第 2 反応を触媒する anthranilate phosphoribosyltransferase (PRT) は *Tk-trpD* により、第 3 反応を触媒する phosphoribosyl anthranilate isomerase (PRAI) は *Tk-trpF* により、第 4 反応を触媒する indole-3-glycerol phosphate synthase (InGPS) は *Tk-trpC* により、最終反応を触媒する tryptophan synthase (TS) は *Tk-trpA*, *Tk-trpB* により、それぞれコードされていた。本遺伝子群は全長 6,045bp であった。融合遺伝子は存在せず、隣接する *trp* 遺伝子同士は互いに overlap していた。*Tk-TrpB* 以外の酵素は真核生物、原核生物由来のものと 30-40% 程度の相同性を示し、*Tk-TrpB* は 50-60 % と比較的高い相同性を示した。また本遺伝子群が実際にトリプトファン生合成に関与するものであることを確認するため、*trp* 遺伝子群の 1 番目の遺伝子、*Tk-trpC* 遺伝子を *Escherichia coli* 内で大量発現し、組換え型酵素の精製および生化学的解析を行っている。予想される InGPS 活性が検出され、反応最適温度が 85°C であったことから、*Tk-trpC* が *T. kodakaraensis* KOD1 由来の InGPS 遺伝子であることを確認している。

第 2 章では、*T. kodakaraensis* KOD1 由来 *trp* 遺伝子群の転写制御機構の解析を行っている。Northern blot 解析の結果から、7 つの *trp* 遺伝子は 1 つの mRNA に転写され、オペロンを形成していることを明らかにしている。また、*trp* オペロンの転写が培地中のトリプトファンの有無により制御されていることも判明した。これは始原菌において *trp* 遺伝子の発現が 1 つのオペロンとして制御されていることを見いだした初めての報告である。

第 3 章では、第 1 反応を触媒する *Tk*-AS の酵素化学的性質を解析している。*Tk-trpE* と *Tk-trpG* をそれぞれ *E. coli* 内で発現し、組換え *Tk-TrpE* (α subunit) と *Tk-TrpG* (β subunit) を含む大腸菌の無細胞抽出液を混合した後、熱処理することにより、*Tk*-AS 複合体を得た。*Tk*-AS 複合体はヘテロ二量体 ($\alpha\beta$) で、アンモニアおよびグルタミンの双方を NH_2 供与体とする AS 活性を示した。*Tk*-AS は高い耐熱性を有しており、反応最適温度は 85°C、最適 pH は 10 であった。*Tk*-AS 活性には Mg^{2+} が必要であった。*Tk-TrpE* は *Salmonella typhimurium* 由来の TrpE とは 47.6% の類似性を示したが、*S. typhimurium* および *Saccharomyces cerevisiae* での部位特異的変異実験により同定されたトリプトファンのフィードバック阻害に関わるアミノ酸残基は *Tk-TrpE* には保存されていなかった。それにもかかわらず、*Tk*-AS の活性はト

トリプトファンにより顕著に阻害されることが判明した。アンモニアおよびグルタミン依存的活性に対するトリプトファンの K_i 値はそれぞれ $5.25\mu\text{M}$ と $74\mu\text{M}$ であった。また、トリプトファンによる阻害は反応の基質コリスミン酸に対して競争的であった。この結果から、*Tk*-AS 複合体のトリプトファンによるフィードバック阻害に関わるアミノ酸残基は、今までに研究されてきた AS と異なることを示している。

第4章では、第2反応を触媒する *Tk*-PRT の酵素化学的性質を解析している。これは始原菌由来の PRT としては初めての報告である。*Tk*-trpD を *E. coli* 内で発現し、二量体である組換え *Tk*-PRT を精製した。今まで報告されてきた PRT のほとんどが TrpG との融合タンパク質として存在するのに対して、*Tk*-TrpD は単独に存在する monofunctional な酵素であった。金属イオン要求性は今まで報告されてきた Mg^{2+} 依存型 PRT と異なって、 Zn^{2+} 存在下で最大活性を示した。 Zn^{2+} 依存型 PRT 活性は Ca^{2+} および Mg^{2+} 依存型活性の1.7および2.5倍であった。 Zn^{2+} と Mg^{2+} の濃度がそれぞれ $100\mu\text{M}$ および $200\mu\text{M}$ で最大活性を示したが、これら以上の濃度では酵素活性の顕著な減少が観察された。*Tk*-TrpD は *T. kodakaraensis* KOD1 由来の他の酵素と比べて耐熱性が低いことが観察されたが、 Zn^{2+} と Mg^{2+} の添加により酵素の熱安定性が向上した。基質であるアントラニル酸および5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate に関して、 Zn^{2+} および Mg^{2+} 依存型活性のそれぞれの K_m 値を決定している。また、*Tk*-TrpD 活性がアントラニル酸による基質阻害を受けることを明らかにしている。

第5章ではトリプトファン生合成経路における最後の反応を触媒する TS に関する研究を進めている。*Tk*-trpA と *Tk*-trpB をそれぞれ *E. coli* 内で発現し、組換え *Tk*-TrpA (α subunit) および *Tk*-TrpB (β subunit) を含む *E. coli* の無細胞抽出液を混合し、熱処理により TS 複合体を形成させた。 α 、 β subunit および TS 複合体の三種類の酵素を精製し、それぞれの酵素化学的性質を解析した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果から、 α subunit は単量体 (α)、 β subunit は二量体 (β_2)、TS 複合体はヘテロ四量体 ($\alpha_2\beta_2$) であることが明らかになった。温度特性、pH 特性などを検討した結果、TS 複合体の状態が最も安定しており、最適温度は 90°C 、最適 pH は 8.0 であった。一方、 β_2 は低温域では活性は低く、 80°C 以上で活性の反応初速度が高くなるが、耐熱性は低くなることを観察している。 α 単独の場合は熱安定性、酵素活性双方について低いことが判明している。以上の結果および CD スペクトルによる構造変化の解析より、温度と各 subunit の構造・活性の相関関係を表すモデルを提唱している。

最後に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、 90°C 以上でも生育可能な超好熱始原菌の一種である *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のトリプトファン生合成系の酵素および遺伝子群を研究題材とし、trp 遺伝子発現の制御機構解明と耐熱性酵素の高温環境下での反応特性に関する研究をとり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) *T. kodakaraensis* KOD1 由来のトリプトファン生合成酵素遺伝子群 (*Tk*-trpCDEGFBA) の全塩基配列を決定し、遺伝子構造の特徴を明らかにした。
- (2) *T. kodakaraensis* KOD1 由来 trp 遺伝子群の転写制御機構を解析することにより、7つの trp 遺伝子は1つの mRNA に転写され、オペロンを形成していること、およびトリプトファンによるフィードバック抑制を受けていることを明らかにした。
- (3) KOD1 株由来のトリプトファン合成系酵素の各々について生化学的検討を加え新たな知見を得た。例えば、anthranilate synthase (AS) の酵素化学的性質を解析した結果、*Tk*-AS 複合体のトリプトファンによるフィードバック阻害に関わるアミノ酸残基は、今までに研究されてきた AS と異なることが示された。また anthranilate phosphoribosyltransferase の金属イオン要求性は、今までに報告された Mg^{2+} 依存型酵素と異なって、 Zn^{2+} 存在下で最大活性を示した。さらに tryptophan synthase の解析により温度と各 subunit の構造・活性の相関関係を表す新しいモデルを提唱した。

以上、本論文は、超好熱菌の遺伝子発現制御と耐熱性酵素の生化学的特性に関する新しい知見を数多く発見したものであり、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13年5月17日、論文内容とそれに関連する事項について試問を行った結果、合格と認めた。