

氏 名	佐 藤 喬 章
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2679 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 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	Development of a Gene Disruption System and Its Application for Metabolic Analyses in Hyperthermophilic Archaea (超好熱始原菌における遺伝子破壊系の構築とそれを用いた新規代謝経路の 解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏 教 授 森 泰 生

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* における遺伝子破壊系の構築、およびそれを用いた代謝経路の解析を行い、その成果についてまとめたものである。論文は序論、本論5章、結論から構成されている。

序論の前半では、超好熱始原菌の生物界における位置付け、その研究の現状および限界点についてまとめられている。特筆すべきは、超好熱菌においてはこれまでに遺伝子破壊系が構築されておらず、生体内における遺伝子機能の解析は全くと言って良いほど行えなかった。さらに後半では、超好熱菌および始原菌における代謝経路の中でも特に研究に値すると考えられる経路についてまとめている。

本論第1, 2章では、超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* における遺伝子破壊系の構築およびその改良を行った。

第1章では、ウラシル要求性を示すオロチジル酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (*pyrF*) の欠損株, KU25 (*pyrF*⁻) を宿主, その要求性を相補する *pyrF* 遺伝子を選択マーカーとして、相同的組換えを利用した超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* における遺伝子破壊系の構築に成功した。これは超好熱菌としては世界で初めての報告である。第2章では、まず *pyrF* 遺伝子の特異的に欠失させた KU216 株 ($\Delta pyrF$) を作製することにより、第1章で開発した遺伝子破壊系の改良を行った。さらにトリプトファン生合成遺伝子の1つ *trpE* を破壊したトリプトファン要求性株 KW128 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE::pyrF$) を宿主, *trpE* を選択マーカーとした新しい形質転換系も構築した。この系においては、形質転換体の選抜が簡便になり、形質転換効率の算出も可能となった。さらに、標的遺伝子内に挿入した *pyrF* マーカーを染色体上からポップアウト(離脱)させ、繰り返し利用できる系も開発した。これにより同一宿主において複数の遺伝子进行操作・破壊できるようになった。

本論第3～5章では、構築した遺伝子破壊系を実際に用いて *T. kodakaraensis* における代謝経路の解析を行った。

第3章では、超好熱菌における糖新生の鍵酵素、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ (FBPase) を同定することに成功した。超好熱菌においては *imp* および *fbp* の2つの FBPase 候補遺伝子が挙げられていた。そこで、各遺伝子破壊株を作製・解析した結果、*fbp* 破壊株は解糖条件においては増殖を示したが糖新生条件においては全く増殖を示さなかった。一方、*imp* 破壊株においては特に表現型の変化は見られなかった。これらにより *fbp* が真の FBPase 遺伝子であることを証明した。

第4章では、始原菌では明らかにならなかった核酸の前駆体、リブローズ-5-リン酸 (Ru5P) の生合成機構を明らかにした。ホルムアルデヒドの無毒化のための経路と考えられていたリブローズモノリン酸 (RuMP) 経路を構成する *hps* / *phi* 遺伝子の破壊株を作製・解析した結果、ヌクレオシド存在下では増殖を示したが、ヌクレオシドを含まないアミノ酸培地においては全く増殖を示さなかった。これらのことから RuMP 経路が Ru5P を合成する経路であることを証明した。

第5章では、真核生物の翻訳開始因子と相同性を示すタンパク、E2b2 がリブローズ-1, 5-ビスリン酸からリブローズ-1, 5-ビスリン酸 (RuBP) を合成する反応を触媒することを発見した。RuBP カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) を有する始原菌にはほぼ1対1の関係で E2b2 のホモログが存在した。これらにより、これまでは謎とされてきた始原菌に

における Rubisco や E2b2 ホモログの生理学的機能について決定的な知見を得ることができた。

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、超好熱菌としては世界初となる遺伝子破壊系の構築、さらにそれを用いた代謝経路の解析を行い、その成果についてまとめたものである。研究成果は以下の通りである。

(1) 超好熱菌にはこれまでに遺伝子破壊系がなく、生体内における遺伝子機能の解析はほとんど行えなかった。本論文では相長的組換えを利用して、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* における遺伝子破壊系を構築することに成功した。さらに構築した系を改良すると共に、複数遺伝子の破壊が可能となるまでその技術を拡張することができた。

(2) さらに構築した遺伝子破壊系を用いて各遺伝子破壊株を作製・解析することにより、*T. kodakaraensis* における代謝経路の解析を行った。まず、超好熱菌においては“missing gene”とされていた糖新生の鍵酵素、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼを同定した。また、始原菌では明らかにされていなかった核酸の前駆体、リブローズ-5-リン酸の生合成がリブローズモノリン酸経路により行われていることを明らかにした。さらに真核生物の翻訳開始因子と相同性を示すタンパク、E2b2 が、リボース-1, 5-ビスリン酸からリブローズ-1, 5-ビスリン酸を合成する反応を触媒することを発見し、これまでは謎とされてきた始原菌におけるルビスコや E2b2 ホモログの生理学的機能について決定的な知見を得た。

以上のように、本論文は超好熱菌としては世界初となる遺伝子破壊系を構築し、さらにそれを用いて重要な代謝経路や新規な代謝経路を同定・解明することに成功しており、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18年2月17日において、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。