

氏 名	いま なか ひろ ゆき 今 中 洋 行
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2291 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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 enzymes involved in sugar metabolism in the hyperthermophilic archaeon, <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 (超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1の糖代謝関連酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 青 山 安 宏 教 授 木 村 俊 作 教 授 村 上 正 浩

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、第三の生物ドメインを構成する始原菌に属する超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1を対象として、生体内における最も中心的な代謝経路の一つである糖代謝に関連する酵素の内、これまでほとんど情報のない、もしくは報告例のない酵素について、その遺伝子の同定、生化学的特性の解析および糖代謝経路の制御機構について報告したものであり、四章からなっている。

第一章では、KOD1株由来 fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolase (*Tk-Fba*) について遺伝子のクローニング及び大腸菌内における誘導発現の後、組換え酵素の精製、そして精製酵素の高温条件下における生化学的特性の解析について述べている。そして、*Tk-Fba* が非常に高い活性を持つこと、またクエン酸で活性化される新たなタイプの酵素であることが示されている。さらに様々な代謝中間体を用いたエフェクター解析によって *Tk-Fba* が FBP の開裂・縮合の両反応をほぼ同程度に触媒するものの主に解糖の方向でその役割を担っていることを示唆している。

第二章では、KOD1株由来 pyruvate kinase (*Tk-Pyk*) についての生化学的特性の解析、そして遺伝子の転写解析を行いその制御機構について報告している、まず、*Tk-Pyk* が基質によるホモトロピックなアロステリック効果を示さず、ヘテロトロピックな影響もほとんど見られないことからタンパク質レベルでの制御が非常に弱い酵素であることを見出している。さらに、ADP 及び AMP 依存的に同じ反応を触媒する2つの酵素について様々な培養条件下における遺伝子の転写解析及び細胞内における酵素活性の測定を行った結果、*T. kodakaraensis* において *Tk-Pyk* が解糖方向であるピルビン酸生成反応で中心的な役割を果たし、その制御が転写レベルでなされていることを明らかにしている。

第三章では、始原菌における新規な fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) についての報告を行っている。これまで、糖新生における鍵酵素である FBPase については様々な始原菌で培養菌体中にその活性がみられる一方、遺伝子の同定はなされていなかった。しかし、活性を有するタンパクの精製後その N 末端配列を決定し、配列をもとにゲノム解析を行った結果、従来型のどの FBPase とも異なる新規な FBPase の同定に成功している。その後、組換えタンパクについて生化学的特性の解析及び遺伝子の転写解析を行っている。まず *Tk-Fbp* が高い FBPase 活性と厳密な基質特異性を有することを示している。さらに解糖・糖新生条件下における遺伝子の転写解析及び菌体内における活性測定を行い、糖新生条件下における転写の誘導、そして糖による強い転写抑制について明らかにしている。これらの結果から、単離・同定した遺伝子が始原菌における真の FBPase であることを証明している。

第四章では、始原菌における 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA, DeoC) の初めての報告について述べている。まず、KOD1由来の DeoC 遺伝子 (*Tk-deoC*) のクローニングと組換え酵素の精製を行いタンパク産物が実際に DERA 活性を有することを明らかにしている。そして、その生化学的特性を詳細に検討し、*Tk-DeoC* が最適条件下で非常に高い活性を有することと厳密な基質特異性を持つことを示している。また、様々な培養条件下における恒常的な遺伝子の転写を確認し、本酵素が実際に細胞内に存在していることを実証している。さらに、転写挙動と関連遺伝子のゲノム解析

によって本酵素が *T. kodakaraensis* 細胞内の代謝に関して未知の機能・役割を有している可能性を示している。

最後に、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1由来の4種の糖代謝関連酵素について詳細な解析を行ったことで得られた生化学的特性に関する新たな知見を要約し、同時に従来の細菌や真核生物由来糖代謝とは異なる制御機構についてまとめられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1を対象として、生体内における最も中心的な代謝経路の一つである糖代謝関連酵素の内、これまでほとんど情報のない、もしくは報告例のない遺伝子の同定及び生化学的特性の解析を行い、糖代謝経路の制御機構について報告したものである。

まず、KOD1株由来 fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolase (*Tk*-Fba) について組換え酵素の高温条件下における生化学的特性の解析を行い、*Tk*-Fba が主に解糖の方向で役割を担っていることを示唆した。次に KOD1株由来 pyruvate kinase (*Tk*-Pyk) がタンパク質レベルではほとんど制御を受けないことを見出した。また、様々な培養条件下における遺伝子の転写解析、酵素活性の測定を行い、*Tk*-Pyk が解糖方向で中心的な役割を果たし、その制御が転写レベルでなされていることを明らかにした。さらに始原菌における新規な fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) の同定に成功し、その組換えタンパクの生化学的特性の解析及び遺伝子の転写解析を行った。高い FBPase 活性、厳密な基質特異性、そして糖による遺伝子の転写抑制などの結果から、本遺伝子が始原菌における真の FBPase であることを明らかにした。最後に KOD1株由来 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA, DeoC) の同定を始原菌において初めて行い、その生化学的特性を解析、本酵素の細胞内における存在を実証した。また、転写挙動と関連遺伝子のゲノム解析により、本酵素が *T. kodakaraensis* 細胞内において未知の機能・役割を有している可能性を示した。

このように、本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1由来の4種の糖代謝関連酵素について詳細な解析を行い、それらの生化学的特性について新たな知見を得ると共に従来の細菌や真核生物由来糖代謝とは異なる制御機構について明らかにした。従って、学術上、実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15年2月21日、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。