

京都大学	博士 (工学)	氏名	道 盛 裕 太
論文題目	Bioinformatics-driven identification of enzymes and pathways in Archaea (バイオインフォマティクスを活用したアーキアにおける酵素・代謝経路の同定)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> を対象に、毒性を示す 2-phosphoglycolate (2-PG) の除去機構および proline 生合成に必要な ornithine 供給機構に関する課題の解決を目標とし、バイオインフォマティクスを活用しながら様々な酵素の生化学的・遺伝学的な解析を通じて未同定であった代謝機構を解明した結果をまとめたものである。その構成は、序論、本編 4 章、結論から成る。 序論では、バイオインフォマティクスの概要と発展、アーキアと超好熱菌の分布及びその特性、<i>T. kodakarensis</i> の性質、<i>T. kodakarensis</i> における ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)を用いた核酸分解代謝、serine kinase を用いたアミノ酸代謝、アミノ酸異化代謝、Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路を用いる生物における 2-PG の回収経路および本論文の意義等がまとめられている。 第 1 章では、<i>T. kodakarensis</i> における 2-PG 代謝に関わる酵素の生化学的解析を行った。CBB 回路の鍵酵素 Rubisco は、carboxylase 反応の基質である CO₂/H₂O の代わりに O₂ 分子を用いることで、ribulose 1,5-bisphosphate を酸化・開裂させて毒性のある 2-PG を生成する oxygenase 活性も有する。Type III Rubisco を有する超好熱性アーキア <i>T. kodakarensis</i> は O₂ を利用できない絶対嫌気性菌であるが、微好気条件下においても生育することが知られており、本菌も 2-PG の蓄積を回避する何らかの代謝機構を有していると考えられる。そこで既知の光呼吸経路を参考に、<i>T. kodakarensis</i> ゲノム上から 2-PG phosphatase (PGP)、glycolate dehydrogenase (GLDH)、alanine:glyoxylate aminotransferase (AGAT)と相同性を示す遺伝子を探索し、各候補タンパク質を生化学的に解析した。PGP 候補の内、TK1734 タンパク質は 2-PG に対して選択的な脱リン酸化活性を示した一方、TK2301 タンパク質は幅広い基質に対して活性を示したため、TK1734 タンパク質が本菌における PGP であることが示唆された。GLDH 候補はいずれも glycolate に対して選択的ではなかったが、<i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_m 値は TK0683 タンパク質が TK0551 タンパク質より約 30 倍高く、TK0683 タンパク質が本菌における GLDH であることが示唆された。AGAT 候補 TK0186 タンパク質は幅広いアミノ酸にも活性を示した一方、TK1094 タンパク質は alanine および glutamate にのみ強い活性を示した。本菌はこれら複数の aminotransferase によって glyoxylate を glycine に変換できることがわかった。これらの結果から本菌は光呼吸経路に類似した一連の酵素反応によって 2-PG を glycine に変換し得ることが示唆された。 第 2 章では、<i>T. kodakarensis</i> における推定 2-PG 代謝経路が実際に細胞内で機能しているか検証するため、第一章において検討した PGP、GLDH、AGAT 候補遺伝子および、glycine から serine への変換に関わる glycine cleavage system (GCS) H-protein 候補遺伝子を加えたそれぞれの遺伝子破壊株を作製し、細胞内活性に対する各タンパク質の寄与を遺伝学的に解析した。宿主株である KU216 株と比較して、PGP 候補遺伝子 TK1734 破壊株の無細胞抽出液で顕著な 2-PG 脱リン酸化活性の低下が観察されたため TK1734 が本菌細胞中における主たる PGP をコードしていることが示唆された。また TK1734 遺伝子破壊株は、微好気条件において KU216 株に比べて生育の悪化を示した。更に、還元剤の添加による溶存酸素の除去に伴ってこの生育の差が小さくなったことから、			

京都大学	博士（工学）	氏名	道 盛 裕 太
Rubisco の oxygenase 活性によって細胞内に発生した 2-PG の蓄積防止に TK1734 タンパク質が寄与していることが示された。GLDH 候補遺伝子 TK0683 破壊株の無細胞抽出液で顕著な glycolate 酸化活性の低下が観察され、TK0683 タンパク質が本菌の主たる GLDH であることが示唆された。AGAT 候補のうち、TK1094 遺伝子破壊株と TK0186 破壊株で AGAT 活性の明瞭な低下が観察されたことから、これらを主とした複数の aminotransferase によって glyoxylate が glycine に変換され得ることが示唆された。更に GCS-H 候補遺伝子 TK0150 破壊株は serine 要求性を示し、別の C1 供与体として ketopantoate を添加した場合に serine 要求性が解除されたことから、TK0150 遺伝子は GCS に必須であることが示された。更に詳細に 2-PG の代謝運命を追跡するべく、^{13}C で標識した glycolate を培地に添加したところ、細胞内 glycine や serine への同化は観察されなかった。また微好気条件下で <i>T. kodakarensis</i> を培養した培地上清の glycolate 濃度を測定したところ、未植菌培地に比べて glycolate 濃度増加が認められた。以上の結果から、本菌は 2-PG を glycine/serine あるいは 3-PGA へと変換し得る酵素群を有しているが、主として脱リン酸化の後に glycolate の状態で細胞外へ排出することで 2-PG を除去していることがわかった。 第 3 章では、<i>T. kodakarensis</i> において ornithine の供給に関与する可能性のある酵素を発見し、その詳細な生化学的解析を行った。Arginine から ornithine を生成する代謝経路として知られる arginine deiminase 経路を構成する遺伝子のアーキアにおける分布を検討したところ、carbamate kinase を持つ種において、機能未知とされていた TK2200 遺伝子のホモログが <i>arcA</i> (arginine deiminase 遺伝子) と相補的な分布を示すことがわかった。この TK2200 を <i>arcE</i> と名付け、<i>arcA</i> に代替する機能を有する候補遺伝子として解析を進めた。<i>arcE</i> 遺伝子が大腸菌内で発現して得られた組換え型タンパク質は、arginine deiminase 活性を示さなかった。ArcE が触媒する反応を推定するために、AlphaFold による予測構造から Dali server で類似のタンパク質を検索したところ、P-loop NTPase superfamily に属するタンパク質と似た骨格であることが示唆された。様々な基質を検討した結果、本酵素は Mg^{2+} の存在下で arginine、ADP、Pi と citrulline、ATP、NH_3 を可逆的に変換するいままでに知られていない酵素反応を触媒することがわかった。そこで本酵素を arginine synthetase と名付けた。 第 4 章では、arginine synthetase の遺伝学的解析により、本酵素は arginine 分解による proline 前駆体の供給に関与することが明らかとなり、ATP 合成に寄与することが示唆された。また、citrulline が培地に存在するときは arginine の生合成にも寄与できることが明らかとなった。 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)

本論文は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究対象とし、本菌における 2-phosphoglycolate の代謝運命の解明と、proline 前駆体である ornithine を供給する代謝経路の同定に、バイオインフォマティクスを活用したアプローチで取り組んだ。得られた主な成果は次のとおりである。

1. *T. kodakarensis* の 2-PG 代謝に関わる候補遺伝子の生化学的解析を行い、本菌が植物やラン藻の光呼吸経路に類似した一連の酵素反応によって 2-PG を glycine に変換し得ることを示した。
2. *T. kodakarensis* は 2-PG を glycine/serine あるいは 3-PGA へと変換し得る酵素群を有しているが、主として 2-PG を脱リン酸化した後に glycolate として細胞外へ排出していることを明らかにした。
3. *T. kodakarensis* において ornithine の供給に関与する可能性のある酵素を発見し、その詳細な生化学的解析を行った。本酵素は arginine、ADP、Pi と citrulline、ATP、NH₃ を可逆的に変換する新奇生体反応を触媒することが判明し、arginine synthetase と命名した。
4. Arginine synthetase の遺伝学的解析により、本酵素は arginine 分解による proline 前駆体の供給と ATP 合成に関与することが示唆された。

以上のように本論文は、アーキアにおける新規酵素・代謝の研究におけるバイオインフォマティクス活用の基盤的知見を著しく向上させたものであり、学術上、実際に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、令和6年6月20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。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：令和6年10月23日以降