

氏 名	ふく だ わか お 福 田 青 郎
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2585 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 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 the Metabolism of C3 and C4 Compounds in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 (超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 株の C3・C4 化合物代謝 に関する研究)
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、鹿児島県小宝島から単離された超好熱始原菌、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を題材として、これまで報告例の少ない超好熱始原菌の C3 有機酸 [phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate] と C4 有機酸 [oxaloacetate (OAA)] の代謝について研究を行い、その成果についてまとめたものであり、序論、本論3章、結論から構成されている。

序論では超好熱始原菌の進化的な位置づけ、一般的な生物と超好熱始原菌に見られる糖代謝の違い、一般的な生物における C3・C4 有機酸代謝とそれに関係する酵素、アミノ酸代謝、本研究の題材である *T. kodakaraensis* KOD1 株の諸性質等に関して、研究の現状などがまとめられている。

第1、2章では、ゲノム解析から明らかになった C3・C4 有機酸代謝関連酵素 PEP carboxykinase (PCK) と malic enzyme (MAE) それぞれについて、一次構造に基づいた系統学的解析を行い、また大腸菌内で大量発現を行って得られた組換え型酵素の酵素学的諸特性を明らかにした。さらに各酵素の発現様式を調べるために、解糖培養条件（炭素源：可溶性デンプン）と糖新生培養条件（炭素源：ピルビン酸またはアミノ酸）で *T. kodakaraensis* を培養し、ノザンプロット解析を行った。更に各細胞における無細胞抽出液中の酵素活性についても測定を行った。

PCK の発現様式を調べた場合、ノザンプロット解析ではいずれの条件下においても転写されていたが、糖新生条件でより高い転写量が観察された。中でもピルビン酸を炭素源とした際に最も高い発現誘導が認められた。各細胞における無細胞抽出液中の酵素活性も同じ傾向を示した。これらの事実から、PCK はアミノ酸に由来する炭素を糖新生系に導入する役割を果たしていることが推測された。一方で、ピルビン酸培養における機能については、過剰の PEP を OAA に変換することにより様々な生体構成成分の合成に利用していると推定された。

MAE のノザンプロット解析では、解糖条件・糖新生条件で転写量の差が観察されなかったことから、アミノ酸の同化に関わっていることが示唆された。

第3章では *T. kodakaraensis* の C3・C4 有機酸代謝関連酵素 [PCK, MAE, PEP synthase (PPS)] について、それぞれのシングル・ダブル・トリプル遺伝子破壊株（計7種）を作製し、それぞれの生育特性解析を行っている。遺伝子破壊株の生育特性解析からは *in vitro* 解析では困難な、各酵素の生体内での役割について直接知見を得ることが可能である。また本章では遺伝子破壊手法として、複数の遺伝子を迅速に破壊する新規な手法を確立している。

細菌では一般に、PPS は糖新生の初発を担い、解糖系での逆反応を pyruvate kinase が担うことが知られている。しかし本章の研究から、超好熱始原菌では PPS が解糖系・糖新生系両方で重要な役割を持つことが証明された。特に PPS は、解糖系で生じる AMP を ADP や ATP に再生する役割を担い、解糖系において必須の酵素であることが示唆された。また PCK と PPS がそれぞれ糖新生の初発酵素として機能し得ることも明らかになった。さらに PCK と PPS を経由する他にも、セリンやグリシンから糖新生を行うことが可能であると判明した。またゲノム情報からアスパラギン・アスパラギン酸の生合成経路の存在が示唆されているにもかかわらず、本菌はアスパラギン・アスパラギン酸要求性を示した。この理由として、

アスパラギン・アスパラギン酸の生合成は可能ではあるが、条件によってはその量が不足するためであることが分かった。また以上の結果に加えて、ゲノム解析では明らかにされなかった新規な代謝経路の存在も明らかとなった。

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、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株の C3・C4 有機酸代謝に関して研究を行い、その成果についてまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

(1) C3・C4 有機酸代謝関連酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) と malic enzyme (MAE) について、一次構造に基づいた系統学的解析、組換え型酵素の酵素学的諸特性、各酵素の細胞内での転写量および細胞内比活性を明らかにした。この結果、PCK は主に糖新生条件において重要な役割を果たしていることが示唆された。また MAE はアミノ酸の同化に関わっていることが示唆された。

(2) *T. kodakaraensis* の C3・C4 有機酸代謝関連酵素 [PCK, MAE, phosphoenolpyruvate synthase (PPS)] について各種遺伝子破壊株を作製し、それぞれの生育特性を解析した。その結果、細菌の PPS とは異なり、超好熱始原菌では PPS が解糖系・糖新生系両方で重要な役割を持つことが証明された。さらに原核生物ではあまり例のないセリンやグリシンからの糖新生経路の存在が判明した。また、ゲノム解析からアスパラギン・アスパラギン酸 (Asp/Asn) 合成経路の存在が示唆されているにもかかわらず、本菌は Asp/Asn 要求性を示した。この理由が Asp/Asn を生合成可能であるが、生育条件によってはその合成量が不足するためであることが分かった。

以上、本論文はこれまで報告がほとんどなかった超好熱始原菌の C3・C4 有機酸代謝やそれに連なるアミノ酸代謝等に関して新しい多くの知見を与えるだけでなく、ゲノム解析からは明らかにならなかった新規代謝経路を示唆するなど、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、平成 17 年 9 月 28 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。