

氏名(本籍)	小 ^こ 菅 ^{すが} 武 ^{たけ} 英 ^{ひで} (山梨県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第1,827号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	高度好熱性細菌 <i>Thermus thermophilus</i> のアミノ酸合成系遺伝子の解析とアミノ酸性産株の創製
主査	筑波大学教授 農学博士 中原 忠 篤
副査	筑波大学教授 農学博士 祥雲 弘 文
副査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行

論文の内容の要旨

Thermus thermophilus は生育温度範囲を50-85℃に有する高度好熱菌の代表的菌種の一つであり、遺伝子組換えを含む genetic manipulation が行える生物の中で、最も高温で生育できる生物である。

本研究は、*T. thermophilus* を用いた高温発酵による有用物質生産の可能性を検討するために、*T. thermophilus* の種々のアミノ酸性合成系遺伝子のクローニングと解析を行うとともに、*T. thermophilus* でのアミノ酸の代謝制御発酵を試みたものである。

まず、*T. thermophilus* HB27株から種々のアミノ酸性合成系遺伝子をクローニングし、それらの塩基配列を決定した。決定された遺伝子は、*proA*, *proB*, *proC*, *argB*, *argC*, *lysR* の6遺伝子に及んでいる。これらのうち、プロリンについては、*proB*, *proA*, *proC* の3遺伝子で、プロリン合成系のすべてがカバーされていることが明らかとなった。また、*lysR* 遺伝子産物は、リジン合成系の最終段階の酵素をコードしている *lysA* 遺伝子のアクティベーターであると考えられた。これは、*T. thermophilus* はもとより、高度好熱性細菌における遺伝子発現調節遺伝子の最初の発見例である。

プロリン生合成経過については、*T. thermophilus* の経路も、これまでに報告されていたアミノ酸生産菌や大腸菌のものと同様であることが明らかとなった。そこで、生合成系の調節様式について検討したところ、生合成系の最初の酵素である γ -グルタミルキナーゼ (*proB* 遺伝子産物) が最終産物であるプロリンによってフィードバック阻害を受けることが明らかとなった。そこで、*proB* 遺伝子に部位特異的変異を導入することによって、プロリンによるフィードバック阻害がかからなくなった変異株の創製を試みた。大腸菌やアミノ酸生産菌における *proB* 遺伝子のフィードバック阻害脱感作変異株の変異部位の知見に基づき、*T. thermophilus* の *proB* 遺伝子に部位特異的変異の導入を行った。その結果、 γ -グルタミルキナーゼがプロリンによるフィードバック阻害を受けなくなった変異株が得られた。ついでこの変異株に紫外線による変異処理を施すことにより、プロリン資化能欠損株(すなわちプロリン分解系遺伝子の欠損株)の分離を試みた。得られたプロリン資化能欠損株について、プロリンの菌体外への生産能を検討したところ、一株がプロリンを菌体外へ分泌生産していることが確認された。定量的結果、プロリンの生産量は培地1リットル当たり約2mgであり、プロリン以外に数種のアミノ酸の副生も認められた。これは、*T. thermophilus* のみならず高度好熱性細菌における代謝制御発酵の世界で初めての成功例である。

なお、塩基配列を決定したアミノ酸合成系遺伝子のすべてについて、それらの遺伝子産物の一次構造の常温

菌酵素との比較検討も行っており、耐熱性蛋白質の耐熱性に係るいくつかの知見も得ている。

審査の結果の要旨

高度好熱性細菌の代表的菌種の一つである *Thermus thermophilus* から、6種類ものアミノ酸生合成系酵素遺伝子をクローニングし、それらの一次構造を明らかにしたことは、これらを材料とした生化学、蛋白化学研究の発展への多大な寄与という点から、まず高く評価できる。また、これらの中に、好熱性細菌ではこれまで未発見であった調節遺伝子が含まれていることの意義も少なからぬものがある。

さらに、生合成系の全体像が明らかになったプロリン生合成系をターゲットとして、好熱性細菌で未だかつて試みられたことがなかった代謝制御発酵を試みたことは、本研究の極めてユニークな点である。部位特異的変異の導入によるフィードバック阻害脱感作変異株の人工的（理論的）創製と、ランダムな突然変異によるプロリン分解能欠損株の取得という、分子生物学的手法と古典的遺伝学手法の融合によって、目的とするプロリン生産株の取得に成功した。プロリンの生産量は、アミノ酸生産菌のそれと比べて現時点では著しく低いですが、好熱性細菌においも代謝制御発酵が可能であるということを厳然たる事実として示したことは、高く評価されて然るべきである。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。