

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Natthaporn Takpho

分岐鎖アミノ酸の一種であるバリンは、哺乳類では必須アミノ酸であることから、飼料やサプリメント、抗ウイルス薬の原料などに広く用いられている。現在、バリンは主に大腸菌や *Corynebacterium* 属細菌を用いた発酵法により生産されているが、食品として高い安全性が認められている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いれば、有用性の高い技術になることが期待される。また、真核生物のモデルとしても知られる *S. cerevisiae* におけるバリンの合成制御機構と生理的役割の解明は、高等生物における研究にも貢献すると考えられる。そこで本研究では、バリン合成を制御している鍵酵素であるアセトヒドロキシ酸合成酵素 (AHAS) とバリン合成の最終ステップを担う分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT) に着目し、*S. cerevisiae* での機能解析を行った。

酵母の AHAS は、触媒サブユニット Ilv2 および調節サブユニット Ilv6 から成り、Ilv6 にバリンが結合することにより AHAS 活性が阻害されると推測されている。これまでに、大腸菌の AHAS においてバリンによるフィードバック阻害を解除するアミノ酸置換が複数同定されていることから、酵母の Ilv6 上における相同なアミノ酸残基の置換が AHAS 活性に及ぼす影響を解析した。その結果、バリンとの結合領域である ACT ドメイン上の N86A, G89D, N104H 置換体を発現する株では、バリンの毒性アナログであるノルバリンに対する耐性が野生型株よりも上昇し、細胞内バリン含量も著しく増加していた。また、酵母の Ilv2 および Ilv6 を大腸菌の組換えタンパク質として調製し、*in vitro* 再構成系を用いて AHAS 活性を測定したところ、N86A, G89D, N104H 置換がバリンによるフィードバック阻害を解除することも明らかにした。以上の結果から、AHAS のフィードバック阻害機構が生物間で広く保存されていることが示された。

酵母の BCAT については、アミノ末端にミトコンドリア移行シグナル (MTS) を有するミトコンドリア局在型 (Bat1) と有さないサイトゾル局在型 (Bat2) の 2 種類が存在する。本研究では、Bat1 の欠損が細胞内バリン含量を減少させ、バリン欠乏培地における細胞の生育を遅延させるのに対し、Bat2 の欠損はほとんど影響を及ぼさないことを見出した。従って、バリン合成において Bat1 が主要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、BCAT の細胞内局在の意義を調べるために、MTS 欠失型 Bat1 発現株 (Bat1-MTS) と MTS 付加型 Bat2 発現株 (Bat2+MTS) を構築し、表現型を解析した。その結果、Bat1-MTS 株だけが Bat1 欠損株と同様に細胞内バリン含量を減少させ、バリン欠乏培地における生育を遅延させた。以上の結果から、ミトコンドリアに局在する BCAT が効率的なバリン合成を行うために必要であることが判明した。

本研究を通して、酵母のバリン合成における AHAS のフィードバック阻害と BCAT の細胞内局在の重要性を明らかにすることができた。これらの知見は、バリンの発酵生産への応用や高等生物におけるバリン合成制御の理解に繋がることが期待される。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Natthaporn Takpho

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵産業において広く利用されている微生物であるが、アミノ酸生産における活用例は未だ多くはない。しかしながら、*S. cerevisiae* を用いて製造される発酵食品や飼料等におけるアミノ酸含量を直接高めることができれば、それらの高付加価値化および発酵産業上有用な技術の確立に貢献することが期待される。申請者は、これまで研究があまり進んでいなかった *S. cerevisiae* におけるバリンの合成制御機構と生理的役割に着目し、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) 大腸菌での先行研究を参考にして、酵母の AHAS における調節サブユニット Ilv6 の ACT ドメインにアミノ酸置換 (N86A, G89D, N104H) を導入することで、バリンによる AHAS のフィードバック阻害が解除され、それらの置換体を発現する酵母では細胞内バリン含量が著しく増加することを見出した。
- 2) AHAS のフィードバック阻害が解除された Ilv6 の N86A, G89D, N104H 置換体を発現する酵母ではノルバリン耐性が上昇していたことから、ノルバリン耐性を指標としたバリン高生産株の選抜・育種に資する有用性の高い知見が得られた。
- 3) N86A, G89D, N104H 置換体を発現する酵母では細胞内バリン含量のみが増加しており、他の分岐鎖アミノ酸 (ロイシン・イソロイシン) の含量には影響を及ぼさなかった。このことから、酵母における分岐鎖アミノ酸の合成経路は共通であるにも関わらず、合成制御機構は各アミノ酸で独立している可能性が示された。
- 4) 大腸菌では、ACT ドメインに加え、カルボキシル末端側の ALS_{ss}C ドメイン上のアミノ酸置換もフィードバック阻害を解除したが、酵母では該当するアミノ酸置換はバリン合成に影響を及ぼさなかった。このことから、原核生物と真核生物における ALS_{ss}C ドメインの機能の違いが示唆された。
- 5) 酵母に存在する2種類の BCAT のうち、ミトコンドリア局在型である Bat1 がサイトゾル局在型である Bat2 と比べて、バリン合成に重要な役割を有することを明らかにした。
- 6) MTS 欠失型 Bat1 および MTS 付加型 Bat2 の発現株をそれぞれ構築し、機能解析を行った結果、MTS の存在が細胞内バリン含量の増加に必要であることが明らかになった。このことから、Bat1 と Bat2 自身の酵素活性や機能に差があるのではなく、BCAT のミトコンドリア局在が効率的なバリン合成に必要であると結論づけた。

以上の結果から、酵母のバリン合成における AHAS のフィードバック阻害と、BCAT の細胞内局在の重要性を明らかにするに至った。これらの知見は、真核生物におけるバリン合成の制御メカニズムの理解や、酵母を用いたバリンの発酵生産技術に繋がる有用なものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。