

氏名	カンダカール アル サイド シディキエー Khandaker Al Zaid Siddiquee (
学位の種類	博士 (情報工学)
学位記番号	情工博甲第149号
学位授与の日付	平成17年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Integrated metabolic regulation analysis for <i>Escherichia coli</i> with a single-gene knockout of <i>pykF</i> , <i>fnr</i> , and <i>cra</i> (<i>pykF</i> , <i>fnr</i> , <i>cra</i> などの1遺伝子欠損株大腸菌の統合的代謝制御解析)
論文審査委員	主査 教授 清水和幸 教授 岡元孝二 教授 原尾政輝 助教授 倉田博之

学位論文内容の要旨

本研究では、解糖系の調節遺伝子である *pykF* や、大域調節遺伝子である *fnr* や *cra* などの遺伝子欠損株大腸菌について、代謝調節制御機構の解明を行なっている。

第1章では、*pykF* 遺伝子や、大域調節遺伝子の役割などについて、これまでの既往の研究を展望し、本研究テーマの意義について述べている。

第2章では、*pykF* 遺伝子欠損株大腸菌について、細胞内代謝物濃度や酵素活性を測定し、同位体実験およびNMRやGC-MSを利用して代謝流束分布を求め、これらの情報を統合的に解析している。その結果、*pykF* 遺伝子を破壊すると、フォスフェノールピルビン酸 (PEP) の濃度が上昇し、補充反応の PEP カルボキシラーゼ(Ppc)の反応が促進され、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)、およびリンゴ酸酵素 (Mez)の反応が活性化され、ピルビン酸(PYR)を別経路で補充していること、さらに、このために、酢酸生成が低下することをつきとめている。また、PEP の濃度の上昇によって、解糖系のフォスホフラクトキナーゼ(Pfk)の酵素活性がアロステリックに阻害され、その結果、グルコース 6-リン酸 (G6P) の濃度が上昇し、このために、酸化的ペントースリン酸 (PP) 経路の酵素活性、および反応速度が増加することを示している。

第3章では、RT-PCR を用いて、遺伝子発現について調べており、*pykF* 遺伝子を破壊すると、*glk*, *pgi*, *pfkA*, *tpi* の遺伝子発現が低下し、*ppc*, *pckA*, *maeB*, *mdh*、および酸化的 PP 経路の *zwf* や *gnd* の発現量が著しく増加することを見つけている。さらに、*cra*(*fruR*)の発現量が増加し、*cyaA* や *ptsG* の発現量が低下していることを示し、これらがグルコース消費速度の低下と関係していることを示している。

第4章では、*fnr* 遺伝子欠損株の代謝解析を行ない、この遺伝子を破壊すると、トリカルボン酸(TCA)回路関連の遺伝子発現量や酵素活性が低下し、*crp* 遺伝子の発現量が増加することや、*pfl* や *frd* の遺

伝子発現量が低下することを示しており、培養データを、これら、遺伝子発現、酵素活性、細胞内代謝物濃度の観点から説明できることを示している。

第5章では、*cra* 遺伝子の破壊が代謝に及ぼす影響を統合的に調べ、DNA マイクロアレイを利用した遺伝子発現解析では、主要エネルギー代謝経路だけでなく、アミノ酸合成経路、脂肪酸合成経路、膜透過に関連する遺伝子の一部が大きく変化することを見出しており、細胞の代謝全体に大きな影響を与えることを示している。

第6章では、以上の結果をまとめると同時に、今後の研究の展望について述べており、本研究で得られた成果が、今後の代謝解析の研究に大きな貢献をすることが示されている。

学位論文審査の結果の要旨

多くの生物について、全ゲノム配列が解読され、これからは、これらのゲノム情報に加えて、遺伝子発現やタンパク質発現の情報をもとに、代謝制御解析を行なうことが重要になってきている。特に、個々の遺伝子やタンパク質を *in vitro* で解析するだけでなく、細胞を *in vivo* でシステムとして解析することがますます重要になってきている。とりわけ、工学的観点からは、培養環境や遺伝子破壊が細胞全体に及ぼす影響を定量的に解析し、産業応用も考えた視点の研究が重要になってきている。また、細胞の代謝調節制御機構を定量的に解析することも大変重要である。

このような観点から、本研究では、大腸菌細胞の *pykF*, *fnr*, *cra* 遺伝子の破壊株について、遺伝子発現、タンパク質発現、細胞内代謝物濃度、代謝流束分布を統合的に解析し、細胞の代謝調節制御機構を定量的に明らかにしており、細胞を *in vivo* で解析するための重要な知見が得られたものと思われる。とりわけ、大域調節遺伝子である *fnr* や *cra* が細胞の調節に及ぼす影響を、定量的に解析した点は高く評価される。

従来の研究では、遺伝子発現、タンパク質発現、代謝流束分布に関して、それぞれ別々に解析が行なわれているが、本研究の特徴は、大腸菌細胞の遺伝子発現、タンパク質発現、細胞内代謝物濃度、代謝流束分布を統合的に解析し、細胞の代謝調節制御機構を定量的に明らかにしていることであり、細胞を *in vivo* で解析するための重要な知見が得られたものと思われる。

また、*cra* 遺伝子破壊株については、網羅的な遺伝子発現解析も行なっており、大変興味深い知見が得られている。

以上の点から、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（情報工学）の学位に十分値するものであると判断した。