

## 審査の結果の要旨

氏名 倉都将宏

急速なゲノム解析技術の発展により、これまでに数多くの微生物ゲノム情報が明らかとなっている。一方、代謝経路に関しては、大腸菌などにおいて数多くの知見が蓄積されている。しかし近年、*Thermus thermophilus* において見出された $\alpha$ -Aminoadipic acid からのリジン新規生合成経路などのように、モデル微生物での代謝経路とは異なる経路が存在することが明らかになりつつある。このような事例は、新規生合成経路が他にも数多く存在する可能性を示唆している。

本論文は、多くの栄養要求性を示す *Lactobacillus* 属の新規一次代謝経路（アミノ酸、核酸系物質、ビタミン）の探索、ならびに *T. thermophilus*、*Acidothermus cellulolyticus*、*Helicobacter pylori* のメナキノン（MK）新規生合成経路について解析したものであり 3 章からなる。

第 1 章では、*L. fermentum*、*L. reuteri*、*L. gasseri*、*L. brevis* を対象とし、網羅的な栄養要求性評価及びゲノムデータベースとの比較解析を行い、新規一次代謝経路を探索した。多くの場合、ゲノム情報と栄養要求性の結果は一致したが、アミノ酸では *L. fermentum* におけるグルタミン酸やセリン・システイン生合成に関して、核酸系物質では *L. fermentum* における GMP 生合成や *L. gasseri* における UTP から CTP、dTTP に至る生合成に関して、ビタミンでは *L. fermentum* におけるビタミン B6・葉酸、*L. reuteri* における葉酸、*L. gasseri* におけるチアミン・リボフラビン・葉酸の各生合成に関しては、ゲノム情報ではそれらの生合成に必要な遺伝子が存在しないにも関わらず、それらの要求性を示さなかった。これらの結果から、それらが新規経路で生合成されている可能性を見出すことができた。

第 2 章では、第 1 章で見出した新規生合成経路を有していると予想された葉酸生合成経路の中でコリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) を生合成する遺伝子の探索について詳細に検証した。*in vitro* での検討においては、*L. fermentum* における FolP オルソログである LAF1336 は、FolP と同様に、PABA を基質として葉酸生合成経路中間体である 7,8-dihydropteroate を生成することが LC-MS にて確認され、*in vivo* 検討においては、生育不良を示した *folP* 欠損大腸菌が LAF1336 の発現により相補されることが明らかになった。これにより、少なくとも *L. fermentum* においては PABA が新規経路で生合成される可能性が示された。*Nitrosomonas eutropha* もまた、葉酸非要求性にも関わらず、葉酸生合成経路の中でコリスミ酸から PABA を生合成するのに必要なオルソログを有していない。そこで、大腸菌の PABA 生合成に関与する *pabA*、*pabB*、*pabC* 欠損株を宿主に用い、*L. fermentum*、*N. eutropha* をゲノム DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った。その結果、*N. eutropha* から pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知とアノテーションされていた遺伝子 (*NE1434*) が PABA の生合成に関与していることを明らかにした。

第3章では、MK新規生合成経路の解析を行った。MqnAに関しては、*T. thermophilus* 及び *A. cellulolyticus* におけるオルソログを中心に、*in vivo*、*in vitro*の両面から解析を行ったが、その詳細を明らかにすることはできなかった。一方、FLからDHFLが生成するMqnBオルソログに関して、*S. coelicolor*、*T. thermophilus*、*A. cellulolyticus*、*H. pylori* が有する各酵素の機能解析を行い、コリスミ酸からDHFLに至る経路に多様性があることを明らかにした。このことからMqnAの生成物はFLではなくAFLであり、その後DHFLに至る経路にFLを介す場合と介さない場合があることが示された。FLを介さない経路を持つ細菌は、これまでに *H. pylori* しか見つかっていないため、本反応が抗ピロリ菌剤として非常に有望なターゲットとなる可能性が考えられる。

以上、これらの研究成果は、学術上応用上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。