

氏名	ほりのうち のぶ ゆき 堀之内 伸 行
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1574号
学位授与の日付	平成18年5月23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	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Microbial production of 2'-deoxyribonucleosides (2'-デオキシリボヌクレオシドの微生物生産)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 喜多恵子 教授 阪井康能

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、2'-デオキシリボヌクレオシド(dNS)の微生物生産プロセスの開発に関する研究成果をまとめたものである。本生産プロセスは微生物の可逆的なdNS分解経路に注目し、dNS生産にこの反応系に関与する酵素、デオキシリボアルドラーゼ(DERA)、ホスホペントムターゼ(PPMase)、ヌクレオシドホスホリラーゼ(NPase)を用いるものである。さらに、この生産系への原料供給系として解糖系を共役させることで、最終的にはグルコースからのdNS生産が可能であることを示している。以下に、論文内容の概要を記す。

(1) DERAによるアセトアルデヒドとD-グリセルアルデヒド3-リン酸(G3P)との縮合反応は、全プロセスにおける鍵反応である。平衡反応である本反応を2'-デオキシリボース5-リン酸(DR5P)合成側へ向けるには、高濃度アセトアルデヒド存在下にて反応を行う必要がある。本反応に有用なアセトアルデヒド耐性DERA生産菌を探索し、*Klebsiella pneumoniae* B-4-4株を得た。本菌の休止菌体を触媒とする酵素法により、高濃度アセトアルデヒド存在下、87.5 mMのG3Pから61 mMのDR5Pを生産することができた。また、本菌の解糖系酵素トリオースリン酸イソメラーゼを利用することにより、ジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)とアセトアルデヒドからも効率良くDR5Pを生産することができた。

(2) *K. pneumoniae*由来のDERAを高発現する大腸菌を作製した。さらにDERA反応の基質となるG3Pを解糖系を利用して糖類から供給するべく、DERA高発現大腸菌における糖代謝を調べた。本大腸菌を用い、解糖系中間体とアセトアルデヒドからのDR5P合成を検討した結果、ATPを供与することでグルコースがG3Pへの変換を経てDR5Pの合成原料となることを見いだした。

(3) 解糖系のリン酸化中間体、特にフルクトース1,6-二リン酸(FBP)がDERA高発現大腸菌の解糖系を経て効率良くG3Pへと変換されることを見いだした。そこで、パン酵母の発酵エネルギー(ATP再生系)を利用してグルコースからFBPを誘導し、次にこれをDERA高発現大腸菌によりアセトアルデヒド存在下でDR5Pへと変換する2段階反応を試みた。まず、パン酵母のトルエン処理菌体を触媒とする1段階目の反応では、最適生産条件下にて触媒量のAMP供与のもとグルコース、無機リン酸から356 mMのFBPを生産することができた。さらに、DERA高発現大腸菌の休止菌体を触媒とする2段階目の反応では、酵母により調製したFBPおよびアセトアルデヒドから246 mMのDR5Pを生産することができた。

(4) DR5PからのdNS生産に必要なPPMaseおよびNPase高活性菌の育種を行い、大腸菌由来のPPMase、NPaseを大量発現する形質転換大腸菌を作製した。これらの形質転換大腸菌もしくは市販プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNPase)を触媒として、前述の2段階反応で調製したDR5PからのdNS合成(3段階反応)を試み、DR5Pに対し収率80%にて10 mMの2'-デオキシイノシン(dI)の生成を確認した。

(5) この3段階反応では、第1段階ならびに第2段階において副生するリン酸化された反応中間体が反応の進行を阻害するため、リン酸濃度制御下でのワンポット反応系を構築した。種々の反応条件を検討した結果、触媒としてパン酵母乾燥菌

体, DERA 高発現大腸菌, PPMase 高発現大腸菌, ならびに市販 PNPase を用い, エネルギー担体として触媒量のアデノシンを添加し, リン酸濃度を 33 mM に制御する至適反応条件下にて, グルコース, アセトアルデヒドおよびアデニンから 30 mM の dI 生産が可能となった。

(6) dNS の律速段階であると考えられた PPMase 反応を改善すべく, 安定性ならびにリン酸化化合物への耐性という観点から新たな PPMase の探索を行った。その結果, リン酸化化合物に耐性を示す PPMase 生産株として *Bacillus sphaericus* AKU 229 株を見いだした。本菌の PPMase はリン酸化化合物を含む DR5P 含有反応液を用いた反応においても良好に機能することを確認した。

(7) ワンポット反応に用いる微生物触媒の簡素化を図り, DERA-PPMase 共発現大腸菌を構築した。パン酵母乾燥菌体, DERA-PPMase 共発現大腸菌湿菌体ならびに市販 PNPase を触媒として用い, 反応中にアデニン, パン酵母乾燥菌体を逐次添加する生産方式を確立し, 加えた総塩基骨格に対する収率の大幅な向上を達成した (dI 収量 75 mM (18.0 g/L), 対塩基モル収率 83%)。

論文審査の結果の要旨

多くの天然型有機酸, アミノ酸, 脂肪酸, リボヌクレオシドの微生物生産法が既に開発されているのに対し, 重要な生体分子のひとつである 2'-デオキシリボヌクレオシド (dNS) の有効な微生物生産法は未だ確立されていない。その原因として, 情報物質 DNA のブロックである dNS の生合成が, 複雑かつ厳密に制御されていることが挙げられる。本論文では, dNS の微生物生産プロセスとして dNS の可逆的分解経路に注目し, この反応系に關与する酵素, デオキシリボアルドラーゼ (DERA), ホスホペンタムターゼ (PPMase), ヌクレオシドホスホリラーゼ (NPase) の高活性菌を用いる dNS 合成を検討した結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1) アセトアルデヒドに耐性を示す DERA の探索を行い, *Klebsiella pneumoniae* B-4-4 株を見いだした。本菌を用い, 高濃度アセトアルデヒド存在下, トリオースリン酸からの著量の 2'-デオキシリボース 5'-リン酸 (DR5P) 生産を達成した。よって, 本酵素がこのプロセスに利用可能であることが示された。

(2) *K. pneumoniae* 由来 DERA を高発現する大腸菌を作製し, DERA 高発現大腸菌の糖代謝を利用する DR5P 生産を検討した結果, エネルギー (ATP) を供与することで糖類が DR5P 生産の原料となり得ることを示した。

(3) グルコースをエネルギー源とする ATP 再生系としてパン酵母のアルコール発酵過程を DERA 反応に共役させることにより, グルコースからの DR5P の効率生産を達成した。dNS の合成中間体 DR5P をグルコースから著量生産できたことは, 本プロセスの産業的利用への可能性を示したものとして評価できる。

(4) 効率的な dNS 生産プロセスを確立すべくワンポット反応系の構築を行った。この反応系では, リン酸化中間体による PPMase 反応の阻害を解除するのを認め, リン濃度の制御ならびにパン酵母の ATP 再生機能の高度利用を検討した。その結果, 反応系内のリン酸の循環が円滑になり, 2'-デオキシイノシン (dI) の高蓄積を可能とした。

以上のように, 本論文は dNS の微生物生産プロセスの開発について述べたものである。得られた成果は, 安価な出発原料であるグルコース, アセトアルデヒドおよび核酸塩基からの dNS の実用的微生物生産の可能性を示したものであり, 発酵生理学, 応用酵素学, 応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって, 本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお, 平成 18 年 3 月 9 日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。