

氏名	しば た たかし 柴 田 孝
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2427 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Development of the metabolic system for 2-keto-L-gulononic acid production in <i>Pseudomonas</i> sp. and its basic aspects (<i>Pseudomonas</i> 属細菌における2-ケト-L-グロン酸生産代謝系の構築と基礎研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 池 田 篤 治

論 文 内 容 の 要 旨

アスコルビン酸は医薬品をはじめ、食品、動物飼料、化粧品等に幅広く使われ、その需要が年々高まっており、さらに低コスト生産法の開発が強く望まれている。現在の製造法である Reichstein 法にはさまざまな改良がなされてきたが、収率の面での改善の余地がある。またこの方法には、有害な過マンガン酸カリウム等を使用するという難点があるため、アスコルビン酸の合成中間体である2-ケト-L-グロン酸(2-KLGA)を、発酵法で製造するための多くの開発研究がある。しかし、いずれの方法も用いる菌株の生育速度や耐糖能に難点があり、未だ Reichstein 法に代わる製造法にはなっていない。本研究では、耐糖能に優れ、工業規模での酸化発酵に適し、しかも2-KLGAの生合成に関与する酵素系を全く保有していない *Pseudomonas* 属細菌を宿主とした分子育種法を検討し、2-KLGAの直接発酵を可能にする菌株の構築に成功した。さらに、この開発研究の過程で、*Gluconobacter oxydans* G624株から新規なソルビトールデヒドロゲナーゼ(SLDH)及び *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* IFO14464株からピロロキノリンキノン(PQQ)関与の新規なアルコールデヒドロゲナーゼ(qADH)を見出し、当該遺伝子をクローニングするとともに、その酵素学的諸性質を明らかにした。結果は以下のように要約できる。

1) ソルビトールから2-KLGAへの変換過程の初発段階であるソルビトールをソルボースに変換するための酵素として *G. oxydans* G624株のSLDHを選定した。本酵素は安定性が低いために、発現量が低い元株から単離精製することが困難であった。そのため、SLDH活性を指標とした発現クローニングにより相当する遺伝子を特定し、大腸菌の大量発現株より酵素を精製した。すなわち、*G. oxydans* G624株のコスミドライブラリーを大腸菌で作製し、各々のクローンをソルビトール含有培地で培養後、生成したソルボースを検出することにより、SLDH活性を有するクローンを取得した。得られたクローンを縮小化し、SLDHをコードする読み枠を特定した。次いで、ヒスチジンタグをC末端に付与した融合タンパク質を *Pseudomonas putida* IFO3738株において活性型で発現させ、高度に精製した標品を調製し、酵素化学的性質を明らかにして、本酵素がNADP⁺の存在下でソルビトールをソルボースに酸化することを明確にした。

2) *G. oxydans* T-100株のソルボースデヒドロゲナーゼ(SDH)とソルボソンドヒドロゲナーゼ(SNDH)をそれぞれコードする遺伝子、および *G. oxydans* G624株のSLDH遺伝子を *Pseudomonas putida* IFO3738株に導入することによって、ソルビトールから2-KLGAを効率よく生産する組換え株を構築した。ここで、SNDH遺伝子発現のために大腸菌のペプチド伸長因子TuBのプロモーターを用いること、さらに、SLDHおよびSDHとSNDH遺伝子をそれぞれ別々のプラスミド上に組換えることなどが当該遺伝子の高発現に有効であることを見出し、ソルビトールから2-KLGAの生産性が顕著に増大した菌株の育種に成功した。得られた組換え体を用いて培養条件を最適化することにより、ソルビトールから2-KLGAの生成率は32%に達した。ここで、副生物として2-KLGAがさらに還元を受けたイドン酸が40%蓄積していることを認め、この副生物への変換を抑えることで、さらに高収率な生産系の構築が可能であることを示した。

3) *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* IFO14464株に、ソルボースからソルボソンを経て2-KLGAに酸化する新規なqADHを見出した。精製したqADHは65kDaの単量体であり、反応至適pHは7.0、等電点は4.1であり、PQQとカル

シウムを結合していることを見出した。次に、qADH の内部アミノ酸配列をもとに設計したプライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅断片をプローブとして、qADH 遺伝子をクローニングした。この qADH 遺伝子が発現した大腸菌の無細胞抽出液は、PQQ と CaCl_2 とを添加した時のみ酵素活性を示すことから、qADH は安定なアポ型酵素で存在し、PQQ と CaCl_2 の添加によりホロ型になることを見出した。この酵素遺伝子を上述の 2KLGA 生産菌株に導入することにより、より生産性の高い菌株が構築できる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

医薬品、食品、動物飼料、化粧品等に幅広い用途があるアスコルビン酸は、年々需要が高まっており、その低コスト生産法の開発が強く望まれている。現在の製造法である Reichstein 法に対し、これまで、収率や製造工程の安全性の観点から様々な改良がなされているが、いずれの方法も Reichstein 法に代わる新規な製造法を開発するには至っていない。本研究は、ソルビトールをアスコルビン酸の前駆体である 2-KLGA へ直接変換する菌株を育種することを目的とし、その変換に有効な酵素を選別し、精製酵素の性質を明らかにするとともに、それぞれの遺伝子を *Pseudomonas putida* に導入することによって、新しい工業菌株を構築することに成功したものであり、評価すべき点は以下の 3 点である。

1) ソルビトールから 2-KLGA への直接転換株を構築するにあたり、ソルビトールをソルボースに変換する酵素として、*G. oxydans* G624 株の SLDH を選定した。単離精製が困難であった当該 SLDH を大腸菌による発現クローニングによって相当する遺伝子を特定し、さらに、ヒスチジンタグを C 末端に付与した融合タンパク質を *Pseudomonas putida* IFO3738 株で発現させることによって精製酵素標品を得た。得られた融合タンパク質がソルビトールをソルボースに変換することを確認するとともに、 NADP^+ 依存性デヒドロゲナーゼであることを明らかにした。

2) 上記の SLDH および *G. oxydans* T-100 株より得た SDH と SNDH にそれぞれ相当する 3 遺伝子を、耐糖性に優れた 2-KLGA の生合成に関与する酵素系を全く保有していない *Pseudomonas putida* IFO3738 株に導入することで、ソルビトールを 2-KLGA に高収率で直接変換する菌株の育種に成功した。ここでは、各遺伝子を発現するためのプロモーターの最適化やそれぞれの遺伝子を導入するためのプラスミド系に改良を加えている。培養条件の最適化により、ソルビトールから 2-KLGA 及びその代謝物であるイドン酸への転換率は 70% に達しており、イドン酸への変換を抑えることで、さらに高収率な生産系の構築が可能であることが示された。

3) *Pseudogluconobacter saccharoketogenes* IFO14464 株に、ソルボースからソルボソンを経て直接 2-KLGA に酸化する PQQ 関与の新規なアルコールデヒドロゲナーゼを見出し、酵素化学的性質を明らかにした。さらに、当該遺伝子を PQQ が合成できない大腸菌で発現させることにより、安定なアポ型酵素が得られること、および PQQ と CaCl_2 の添加によりこれが容易にホロ型になることを見出した。この qADH 遺伝子を SDH 及び SNDH 遺伝子と共発現することで、より効率的な 2-KLGA 生産系が構築できる可能性を示した。

以上のように本論文は、幅広い用途をもつアスコルビン酸の発酵生産を可能にするために、関与する酵素の諸性質を明らかにするとともに、当該遺伝子の高発現系を開発して工業菌株を構築する新たな手法を示したもので、制御発酵学、応用微生物学、微生物遺伝子工学に貢献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 14 年 2 月 14 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。