

氏名	三井亮司
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1018号
学位授与の日付	平成10年9月24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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Organization and Regulation of the Genes Involved in the Ribulose Monophosphate Pathway in Methylophilic Bacteria (メチロフィル細菌のリブローズモノリン酸経路に関与する遺伝子群の構造と調節)
	(主査)
論文調査委員	教授 加藤暢夫 教授 清水昌 教授 熊谷英彦

論文内容の要旨

C₁化合物を利用する微生物、メチロトロフは生態系の物質循環において必須の役割を担っているばかりでなく、微生物利用の観点からも重要な微生物群である。特にメタノールは、資源的に豊富に存在し、安価に高純度の工業製品が得られ、これを炭素源とした培養液の後処理に大きな環境負荷をかけないことから、理想的な培養原料のひとつとされており、これを原料とする微生物生産の開発に大きな期待が寄せられている。細菌におけるメタノールの資化経路にはセリン経路とリブローズモノリン酸(RuMP)経路が知られており、それぞれの経路に関与する酵素系が明らかにされているが、これらの細菌の生態系での役割の解明や物質生産へのさらに高度な利用のためには、遺伝子レベルでの解析が必要である。特にRuMP経路については、この経路に関与する酵素の遺伝子構造や発現調節などについての知見は全くなかった。本研究では、RuMP経路のホルムアルデヒドの固定に関与する2つの鍵酵素、3-ヘキシユロース-6-リン酸シンターゼ(HPS)とホスホ-3-ヘキシロイソメラーゼ(PHI)に注目し、この経路を有する2種の特徴的な菌株、すなわち、グラム陰性で偏性メチロトロフである*Mathylophilus aminofaciens* 77a株およびグラム陽性で通性メチロトロフである*Mycobacterium gastri* MB19株を用いて、両酵素遺伝子の構成配置と発現調節の機構を明らかにするとともに、両者の違いがそれぞれのC₁化合物の利用性と関連することを見出したもので、その結果は以下のように要約できる。

1) *Me. aminofaciens* 77a株より、HPSを精製単離し、そのタンパク質の一次構造を基に作成したプローブを用いて、4.5 kbのDNA断片を得、トランスアルドラーゼ、HPS、トランスポサーゼ、PHIに相当する4つのopen reading frame (ORF)を確認した。トランスアルドラーゼはこの経路内で糖リン酸の変換に関与する酵素であり、ホルムアルデヒドの固定に関与する*hps*と*phi*はトランスポサーゼ遺伝子(IS10R)を介して配置していた。このISエレメントの役割を明らかにするため、IS10Rを部分欠失したDNA断片を含む一連のプラスミドを構築し、大腸菌内での*hps*と*phi*の発現を調べた結果、IS10Rは一種の発現制御因子として作用し、*hps*は負の、*phi*は正の発現制御をそれぞれ受けることを見出した。

2) *hps*に相当する部分DNA断片をプローブとしたSouthern解析の結果、*Me. aminofaciens* 77a株の染色体DNA上には、*hps*、IS10Rおよび*phi*との相同遺伝子がクラスターを形成して存在することを見出し、メタノール資化能がISエレメントによって他の菌株へも転移する可能性を示唆した。

3) *My. gastri* MB19株についても上と同様に、*hps*と*phi*を含む4.2 kbのDNA断片を取得した。このDNA断片上には、調節タンパク質、PHI、HPS、グルコース-6-リン酸脱水素酵素に相当するORFが配置しており、調節遺伝子は*phi*の上流に逆向きに位置していることを見出した。さらに、*phi*と*hps*周辺の遺伝子構造の特徴やNorthern解析の結果から、*phi*と*hps*はポリシストロニックに転写され、メタノールやメチルアミンなどのC₁化合物によって誘導を引き起こす調節遺伝子によって制御されるオペロンを形成していることを見出した。この発現調節機構は、通性メチロトロフである*My. gastri*

MB19株がC₁化合物によってのみHPSとPHIを誘導する現象をよく説明するものである。

4) HPSおよびPHIが安定同位体で標識した糖リン酸の酵素合成に有用であることから、両酵素の大量調製法を検討し、*Me. aminofaciens* 77a株から得た*hps*および*phi*を大腸菌およびメタノール資化性酵母、*Candida boidinii*で高度に発現させる方法、および各酵素の高効率大量精製法を開発し、¹³C-メタノールからの¹³C標識糖の工業的合成に有効であることを示した。

論文審査の結果の要旨

メチロトロフ細菌の代謝に関連する酵素系の遺伝子解析は、生態系の物質循環における当該微生物の役割を明らかにする上からも、メタノールを原料とする環境調和型の新しい微生物生産方法を開発することからも重要なことであり、酵素遺伝子の発現調節の解明に大きな期待が寄せられていた。本研究は、細菌のメタノール資化経路であるリブローズモノリン酸(RuMP)経路の2つの鍵酵素の遺伝子構造と発現調節機構を、グラム陰性および陽性メチロトロフ2細菌株について明らかにし、各菌株の炭素源の利用性との関連を明確にしたもので、評価すべき点は以下の4点である。

1) グラム陰性で偏性メチロトロフである*Methylomonas aminofaciens* 77a株より、RuMP経路の鍵酵素である3-ヘキシユロース-6-リン酸シンターゼ(HPS)を精製単離し、そのタンパク質の一次構造を基に作成したプローブを用いて得た4.5 kbのDNA断片上に、トランスアルドラーゼ、HPS、トランスポサーゼ、および本経路のもうひとつの鍵酵素であるホスホ-3-ヘキシロイソメラーゼ(PHI)に相当するopen reading frame(ORF)の配位を明らかにした。*hps*と*phi*はトランスポサーゼ遺伝子(IS10R)を介して配置しており、IS10Rを部分欠失したDNA断片を含む一連のプラスミドを構築し、大腸菌内での*hps*と*phi*の発現を調べた結果、IS10Rは一種の発現制御因子として作用し、*hps*は負の、*phi*は正の発現制御をそれぞれ受けることを見出した。

2) *Me. aminofaciens* 77a株の染色体DNA上には、*hps*、IS10Rおよび*phi*の相同遺伝子がクラスターを形成して存在することを見出し、メタノール資化能がISエレメントによって他の菌株へも転移する可能性を示唆した。

3) *My. gastri* MB19株についても同様に、*hps*と*phi*を含む4.2 kbのDNA断片を取得し、*phi*と*hps*周辺の遺伝子構造の特徴やNorthern解析の結果から、*phi*と*hps*はポリシストロニックに転写され、メタノールやメチルアミンなどのC₁化合物によって誘導を引き起こす調節遺伝子によって制御されるオペロンを形成していることを見出した。

4) *Me. aminofaciens* 77a株からクローニングした*hps*および*phi*を大腸菌およびメタノール資化性酵母、*Candida boidinii*で高度に発現させる方法、および各酵素の高効率大量精製法を開発し、¹³C-メタノールからの¹³C標識糖の工業的合成に有効な酵素を簡便に供給できることを示した。

以上のように本論文は、微生物生理、微生物利用の両面にわたって重要なメタノール代謝系であるPuMP経路に関連する酵素群の遺伝子構造と発現調節機構を明らかにするとともに、物質生産に有効な酵素の大量調製を可能にしたもので、制御発酵学、応用微生物学、応用酵素学、微生物生態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10年7月16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。