

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	斯 大勇
論文題目	Genetic analyses and applied studies of microbial oxidoreductases useful for chiral intermediate production (キラル中間体生産に有用な微生物酸化還元酵素の遺伝子解析および応用研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、産業的に重要な合成中間体であるキラル化合物D-パントラクトン (D-PL) の生産に応用可能な微生物由来の2種の酸化還元酵素に関して、遺伝子工学的手法を用いた基礎解析を行い、さらにD-PLの効率的生産への応用を目指して遂行した研究結果をまとめたものである。主な内容は次のとおりである。</p> <p>(1) 1,2-プロパンジオール (1,2-PD) により誘導生産される色素依存性L-パントラクトン (L-PL) 脱水素酵素 (LPLDH) は、L-PLを立体選択的に酸化してケトパントラクトン (KPL) に変換する酵素として報告されていた。<i>Rhodococcus erythropolis</i> AKU2103よりLPLDH遺伝子 (<i>lpldh</i>) をクローニングし、本遺伝子が392個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、本タンパク質のアミノ酸配列がFMN依存性<math>\alpha</math>-ヒドロキシ酸脱水素酵素/酸化酵素ファミリータンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示すことを明らかにした。<i>lpldh</i>をプロモーター領域と推定される1,940 bpの上流領域とともにクローニングし、<i>Rhodococcus</i>用プラスミドpK4に挿入した組換えプラスミドpKLPLDHを構築し、<i>R. erythropolis</i> AKU2103に導入した。本形質転換株は、野生型<i>R. erythropolis</i> AKU2103と比較して、1,2-PD誘導条件下で単位タンパク質量あたり約6倍のLPLDH活性を示した。また、<i>lpldh</i>破壊株を作成し、各種炭素源に対する生育を観察した。その結果、<i>lpldh</i>破壊株はグルコースを単一炭素源とした場合は生育したが、1,2-PDを単一炭素源とした場合は生育しなかったことから、LPLDHが1,2-PDの資化に関与することが示された。</p> <p>(2) <i>R. erythropolis</i>における<i>lpldh</i>の1,2-PDによる発現誘導機構を明らかにするため、<i>lpldh</i>周辺の配列解析を行った。その結果、<i>lpldh</i>上流にTetR様発現制御因子 (LplR) 遺伝子(<i>lplR</i>)が存在することを見いだした。<i>R. erythropolis</i> AKU2103の<i>lplR</i>破壊株を作成し、野生株と比較したところ、1,2-PD誘導・非誘導のいずれの条件下でも高いLPLDH活性を示すことが明らかとなった。また、<i>lplR</i>の破壊により<i>lpldh</i>の転写レベルも大幅な上昇が認められた。これらの結果から、LplRは<i>lpldh</i>発現における負の制御因子であることが示唆された。さらに、<i>lpldh</i>を含むオペロンの転写開始起点の同定とLplRが結合するオペレーター/プロモーター領域を同定した。<i>lplR</i>破壊株を宿主として上記pKLPLDHを導入したところ、1,2-PD誘導・非誘導のいずれの条件下でもさらに高いLPLDH活性を示す組換え株が得られた。本組換え株およびラセミ体PLをそれぞれ触媒および基質として反応させたところ、0.768 Mラセミ体PL中のL-PLのみをほぼ定量的にKPLに変換することができた。</p> <p>(3) ケトパント酸 (KPA) のカルボニル基を不斉還元して、D-パント酸 (D-PA) に変換するNADPH依存性KPA還元酵素が<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>からすでに単離さ</p>			

れており、パントテン酸生合成系酵素の1つとして報告されていた。そこで、*S. maltophilia* NBRC14161よりKPA還元酵素遺伝子 (*kpr*) のクローニングを行った。クローニングされた遺伝子*kpr*は、258個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、本タンパク質のアミノ酸配列が短鎖アルコール脱水素酵素/還元酵素ファミリータンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示すことが明らかとなった。*kpr*をT7プロモーター下流に挿入した組換えプラスミドpETSmKPRを構築し、大腸菌内で大量発現させた。さらに、補酵素NADPH再生系酵素としてグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を調製した。この共発現大腸菌を触媒とすることにより、1.17 MのKPAをほぼ定量的にD-PAに変換することができた。さらに、上記*lpldh*発現株を触媒とするL-PLからKPLへの酵素的変換、KPLからKPAへの自動水解、*kpr*発現株を触媒とするKPAからD-PAへの酵素的変換、D-PAからD-PLへの閉環反応の4つの反応を組み合わせることで、ラセミ体PLのD-PLへの効率的立体反転を可能とするプロセスを確立した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

酸化還元酵素は、様々な生物種において多種多様に存在しており、生体を維持するためには必要不可欠な酵素群である。また近年、工業的生産プロセスに利用されるなど、酸化還元酵素は応用的にも興味深い酵素群である。本論文では、産業的に重要なキラル中間体の生産に利用可能な微生物由来の酸化還元酵素について、その遺伝子解析結果、ならびに、実用生産プロセスへの適用に向けた検討結果がまとめられており、評価すべき点は以下の3点である。

(1) ラセミ体パントラクトン (PL) 中のL-PLを立体選択的に酸化しケトパントラクトン (KPL) に変換するL-PL脱水素酵素 (LPLDH) 遺伝子 (*lpldh*) を*Rhodococcus erythropolis*より初めてクローニングし、その塩基配列解析の結果から、LPLDHが $\alpha$ -ヒドロキシ酸脱水素酵素/酸化酵素ファミリーに属するタンパク質であることを明らかにした。また、LPLDHがその発現誘導物質である1,2-プロパンジオール (1,2-PD) の資化に必須であることを示した。

(2) 1,2-PDによる*lpldh*の発現誘導機構を明らかにした。すなわち、*lpldh*上流にコードされているTetR様発現制御タンパク質 (LplR) が負の発現制御因子として作用していることを示した。さらに、LplRの結合するオペレーター/プロモーター領域とオペロンの転写開始基点の同定を行うとともに、LplR遺伝子(*lplR*)破壊株を宿主とする*lpldh*高発現株を取得した。

(3) パントテン酸生合成に関与するNADPH依存性ケトパント酸 (KPA) 還元酵素遺伝子 (*kpr*) を*Stenotrophomonas maltophilia*から初めてクローニングし、その塩基配列解析の結果から、KPA還元酵素が短鎖アルコール脱水素酵素/還元酵素ファミリーに属するタンパク質であることを明らかにした。*kpr*とグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を構築し、これを触媒とすることによりKPAからD-パント酸を効率的に生産できることを示した。さらに、上記の立体選択的L-PL酸化反応との組み合わせにより、ラセミ体PLからの効率的なD-PL生産プロセスの確立を行い、工業生産への可能性を示した。

以上のように、本論文は微生物由来の酸化還元酵素について基礎と応用の両面にわたって検討を加えたものである。得られた結果は、酸化還元酵素の機能ならびに発現機構の分子レベルでの理解を深めるものであるとともに、微生物酵素を複合的に活用する新たな物質生産プロセスを提案している点において産業的に意義深く、応用微生物学、応用酵素学、応用生化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24年2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。

注)Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。  
要旨公開可能日： 年 月 日以降