

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	山 村 栄 虎
論文題目	Biochemical and molecular biological studies on enzymatic synthesis of vitamin B ₆ derivatives and optically active carboxylic acids (ビタミンB ₆ 誘導体ならびに光学活性カルボン酸の酵素合成に関する生化学的および分子生物学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>化学合成法と対比される合成法の1つに酵素法がある。酵素法は、有機溶剤やレアメタルの使用量の削減、高温・高圧反応の回避または製造工程の簡略化などにつながることも多く、製造コスト削減だけでなく循環型社会の形成に貢献しうる。一方、医薬品の患者への経済的負担軽減や国の医療費削減が求められており、化学合成法で多くの後発医薬品が開発されているが、その限界が懸念されていることから、酵素法の導入が期待されている。しかし、酵素法にも課題があり、例えば、高い基質濃度での反応や疎水性物質との反応を不得手とすることが多い。本論文は、医薬中間体の1つであるビタミンB₆誘導体や光学活性カルボン酸の合成酵素を取り上げ、高い基質濃度での反応を実現すべく、<i>Rhodococcus</i>属放線菌を宿主とする遺伝子発現系の開発や新規酵素の探索、酵素の生化学的および分子生物学的解析、そして酵素の大量合成を行い、その物質生産能を明示したものである。</p> <p>第一章では、<i>Rhodococcus</i>属放線菌を宿主とする遺伝子発現システムを開発した。<i>Rhodococcus</i>属放線菌は生物工学応用において有用な能力を有するものが多く、中でも<i>R. erythropolis</i>は、有機溶剤耐性や高い物質生産能力を有している。そこで、<i>R. erythropolis</i>のセルフクロニング系を開発することを最終目標とし、<i>R. erythropolis</i>由来プラスミドをスクリーニングした。その結果、5株の<i>R. erythropolis</i>にプラスミドを見出した。プラスミドを制限酵素で消化しプラスミドマップを解析したところ、<i>R. erythropolis</i> IAM1400は2種類の5.4 kbのプラスミドを保持しており、和合性を有していることが示唆された。各々pRET1100とpRET1200と命名し、全塩基配列を解読したところ、pRET1100の複製タンパク質RepTは、すでに報告のある<i>Rhodococcus</i>属放線菌由来プラスミドの複製タンパク質との相同性が57%であり、ColE2タイプのプラスミドと和合性がある新規プラスミドであることが明らかになった。さらに、<i>repT</i>を含む複製領域を特定し、コピー数が3.5倍向上したプラスミドを創出した。</p> <p>発現ベクターの重要な構成要素の1つにプロモーターがある。そこで、<i>Rhodococcus</i>属放線菌で機能するプロモーターを探索した。探索にあたり、評価遺伝子は、L-1-amino-2-propanol dehydrogenase (AADH) 遺伝子とした。ここで、AADHは、NADP⁺-dependent aminoalcohol dehydrogenaseの1つで、3-pyrrolidinoneを(S)-3-hydroxypyrrolidine (HPD) に変換する酵素であり、産業利用される酵素の1つである。プロモーターを探索した結果、大腸菌において過剰発現する構成型プロモーター<i>TRR</i>が<i>R. erythropolis</i> MAK154においても過剰発現を誘導することを見出した。その組換え<i>R. erythropolis</i> MAK154のAADH活性を測定したところ、<i>R. erythropolis</i> MAK154が内在しているAADH活性に対し、活性が約20倍に向上した。また、<i>R. erythropolis</i>以外の放線菌に導入を試みたところ、21種類の放線菌に導入でき、各々の放線菌のAADH活性が向上した。</p> <p>新規複製タンパク質RepTおよびプロモーター<i>TRR</i>を使用して開発した<i>Rhodococcus</i>属放線菌を宿主とする遺伝子発現システムは、宿主域が広く、学術的にも産業的にも有用である。また、構築したベクターは、<i>Rhodococcus</i>属放線菌と大腸菌の両菌株で酵素を大量合成することから、酵素合成検討が容易な<i>Rhodococcus</i>-大腸菌発現シャトルベクターであると考えられた。</p>			

第二章では、ビタミンB₆誘導体や光学活性カルボン酸の合成酵素を各々2種類取り上げ、生化学的および分子生物学的に解析するとともに、微生物での高発現を行い、その物質生産能を酵素法で評価した。ビタミンB₆誘導体の合成酵素としては、ピリドキシン (PN) からピリドキサール (PL) に変換する pyridoxine 4-oxidase (PNO) と PL からピリドキサミン (PM) に変換する pyridoxamine-pyruvate aminotransferase (PPAT) を取り上げた。PNOは、大腸菌での高発現が実現していなかった。そこで、*Rhodococcus*属放線菌を宿主とする遺伝子発現システムを活用した。*R. erythropolis*の宿主スクリーニングにより、*R. erythropolis*の各々の株によって酵素発現が大きく異なることを見出した。また、転換反応条件を精査したところ、グルコース添加により高濃度基質での反応が可能となることを見出し、500 mM PNを変換率90%でPLに転換することができた。その組換え*R. erythropolis*の転換活性は、組換え大腸菌と比較すると、918倍であった。次に、PPATに関して、*R. erythropolis*を宿主とし、PNOと同じ条件で酵素発現を達成した。そこで、*pno*遺伝子と*ppat*遺伝子を*R. erythropolis*で共発現させ、酵素法で物質生産能を評価した。その結果、PLを経由して、200 mM PNから145mM PMに変換する能力を確認した。

光学活性カルボン酸の2種類については、2種類の酵素に取り組んだ。その1つは、ラセミ体の2-クロロマンデル酸メチルエステル (CMM) をR体選択的に加水分解し、抗血栓剤であるクロピドグレルの鍵中間体(R)-2-クロロマンデル酸 (R-CM) を合成する酵素 (エステラーゼ) である。910株の微生物をスクリーニングし、糸状菌 *Exophiala dermatitidis* NBRC 6857に活性を見出した。新規エステラーゼ (EstE) を精製し、EstEの至適反応条件や基質特異性を解析した。また、EstEの遺伝子にはイントロンは無く、大腸菌でEstEを容易に発現することができた。酵素法で物質生産能を評価したところ、10% (w/v) のCMMを4.9% (w/v) のR-CMに変換する能力を確認した。

もう1つの酵素は、プロキラルなエステル誘導体 (Z-MDE-AE) を加水分解し、アルドース還元酵素阻害剤Ranirestatの合成に必要な光学活性なカルボン酸誘導体 (Z-MME-AE) を合成する酵素 (エステラーゼ) である。495株の微生物をスクリーニングし、*Bacillus thuringiensis* NBRC 3951に新規エステラーゼ (EstBT) を見出し精製を行った。EstBTの生化学的解析や分子生物学的解析の結果、EstBTはブタ肝臓エステラーゼ (PLE) と同等以上の活性を有していることを見出した。PLEは、プロセス化学で使用されることが多いが、動物臓器由来酵素であり、ロット間差が大きく、遺伝子組換えによる酵素の大量発現に成功した例がない。大腸菌でEstBTを大量に発現できたことから、PLEの代替酵素として有用であると考えられた。さらに、酵素法で物質生産能を評価したところ、90 mM Z-MDE-AEから収率80%でZ-MME-AEに変換する能力を確認した。

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)

化学合成法と比較し、酵素法は、有機溶剤やレアメタルの使用量の削減、高温・高圧反応の回避、または製造工程の簡略化などにつながる事が多く、環境負荷低減や循環型社会の形成への貢献が期待されている。一方、医薬品の患者への経済的負担軽減や国の医療費削減が求められており、化学合成法で多くの後発医薬品が開発されているなか、酵素法での後発医薬品生産にも期待が集まっている。しかし、酵素法の欠点として、例えば、高い基質濃度での反応や疎水性物質との反応を不得手とすることが多い。本論文は、酵素法の欠点の1つである高濃度基質での反応という課題に対し、生化学的及び分子生物学的解析を通して、産業利用することを想定した酵素の大量発現を試みたものである。評価すべき点として、以下の5点が挙げられる。

1. スクリーニングにより *Rhodococcus erythropolis* 由来の新規なプラスミド pRET 1100 を取得した。新規な複製機構を持つプラスミドで、ColE2 タイプのプラスミドと和合性を有するプラスミドであることを示した。また、複製領域を特定し、既知のものに対しコピー数が 3.5 倍向上したプラスミドを創出した。
2. 放線菌で機能する高発現プロモーターを見出した。また、構築した *Rhodococcus* 属放線菌発現ベクターは 22 種類の幅広い放線菌に使用できることを示した。
3. *R. erythropolis* を宿主とした場合、PNO を大量発現できることを見出し、PN から PL への変換活性が、組換え大腸菌と比較し 918 倍向上したことを示した。さらに、*R. erythropolis* を宿主として PNO と PPAT が同時発現可能であることを見出し、酵素法で評価した結果、200 mM PN を 145 mM PM に転換する能力を有していることを示した。
4. スクリーニングにより新規エステラーゼ (EstE) を単離し、生化学的解析および遺伝子解析を行い、大腸菌で EstE を大量発現できることを示した。その物質生産能を酵素法で評価した結果、10% (w/v) CMM を 4.9% (w/v) R-CM に転換する能力を有していることを示した。
5. スクリーニングにより、新規 PLE 代替酵素 (EstBT) を取得し、生化学的解析および分子生物学的解析を行い、大腸菌で EstBT を大量発現できることを示した。その物質生産能を酵素法で評価した結果、90 mM Z-MDE-AE を収率 80% で Z-MME-AE に変換する能力を有していることを示した。

以上のように、本論文は、*Rhodococcus* 属放線菌を宿主とする遺伝子発現系を開発するとともに、ビタミン B₆ 誘導体ならびに光学活性カルボン酸の生産に有用な酵素の生化学的および分子生物学的解析を行い、開発した発現系を活用した酵素の大量発現により高濃度基質での反応が可能となることを示したものであり、発酵生理学、制御発酵学、分子微生物科学、応用生化学の発展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、令和元年 1 月 21 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) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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 (学位授与日から 3 ヶ月以内)