

氏 名	おり 折 田 和 泉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1592 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Properties and Structures of Key Enzymes in the Ribulose Monophosphate Pathway and Their Physiological Significance (リブロースモノリン酸経路鍵酵素の特性及び構造とその生理的意義)
論文調査委員	(主 査) 教 授 阪 井 康 能 教 授 清 水 昌 教 授 喜 多 恵 子

論 文 内 容 の 要 旨

メタンやメタノールなどの C1 化合物は、持続的安定供給が可能なことから未来型資源として期待されている。C1 化合物を単一の炭素源として利用できる微生物（メチロトロフ）の資化経路のひとつにリブロースモノリン酸（RuMP）経路がある。本経路では、メタノールの酸化によって生じたホルムアルデヒドを 3-hexulose-6-phosphate synthase（HPS）によってリブロース 5-リン酸に固定し、生成したヘキシュロース 6-リン酸を 6-phospho-3-hexuloisomerase（PHI）によりフルクトース 6-リン酸に異性化する。本論文において RuMP 経路の鍵酵素 HPS・PHI について、超好熱性アーキアに見出された HPS と PHI の融合遺伝子産物の性質と生理的役割の解析を行うとともに、HPS の立体構造解析および常温で機能する HPS-PHI 融合酵素の開発を行った。その主な内容は以下の通りである。

1) 超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* において HPS と PHI の両者をコードしている ORF（*PH1938*）を大腸菌内で発現し、発現産物の酵素学的諸性質を調べた結果、*PH1938* 産物は高温域で HPS・PHI 両酵素活性を有する二機能性融合酵素であることを明らかにした。

2) *PH1938* 産物、および *PH1938* の HPS 領域、PHI 領域をそれぞれ大腸菌内で発現したこれらの遺伝子産物を精製するとともに酵素学的諸性質を検討した。その結果、PHI 領域遺伝子産物は至適温度・耐熱性ともに低下し、本菌の生育温度である 80°C 付近では触媒活性を持たず、HPS と PHI は融合することによりそれぞれの至適温度・耐熱性を向上させていることを明らかにした。

3) *PH1938* 産物の分子活性は、HPS 領域遺伝子産物と PHI 領域遺伝子産物の当モル混合物と比較して、60°C では 2 倍、80°C では 50 倍以上、分子触媒活性が向上していることを明らかにした。

4) *P. horikoshii* をホルムアルデヒド添加または無添加の培地で生育させ、それぞれの無細胞抽出液について酵素活性の測定とウエスタン解析を行った。その結果、細菌の HPS・PHI がホルムアルデヒド誘導性なのに対し、アーキアである本菌では、ホルムアルデヒド無添加条件でも、添加時と同程度の酵素活性を認めた。これはホルムアルデヒドの有無による誘導の影響を受けない構成型 HPS・PHI の初めての例である。

5) 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 において HPS と PHI の両者をコードしている ORF（*TK0475*）産物について、ホルムアルデヒド固定の逆反応であるフルクトース 6-リン酸に依存したリブロース 5-リン酸の生成触媒活性を見出し、当該発現産物がペントースリン酸生成活性を有することを確認した。

6) *T. kodakaraensis* を宿主として、*TK0475* 遺伝子破壊株を構築した。その結果、本遺伝子破壊株は最小培地で生育不能であるが、ヌクレオシド添加により生育を回復することを見出した。この遺伝学的実験結果は、5) で得られた生化学的実験結果とともに、HPS・PHI によるリブロース 5-リン酸の生成反応が、核酸の前駆体であるリボース合成に必須であることを示している。

7) メチロトロフ細菌 *Mycobacterium gastri* MB19 由来 HPS の大腸菌発現産物について結晶化を試みた。X 線回折

実験に適した結晶を得ることに成功し、1.6 Å 分解能のデータが得られた。

8) X 線回折実験より空間群、格子定数を決定した。

9) 構造解析精密化の結果、HPS の全体構造は典型的な $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造をとっていることを明らかにした。HPS はアミノ酸一次配列の比較から orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC) ファミリーに属しているが、HPS 全体構造は、OMPDC ファミリーに属する OMPDC, 3-keto-L-gulonate 6-phosphate decarboxylase (KGPDC) と非常によく似ていることを明らかにした。

10) 活性部位の立体構造と一次構造を比較した結果、機能的に重要なアミノ酸残基は、OMPDC ファミリー間でよく保存されていることを明らかにした。

11) これまで自然界で見出された HPS-PHI 二機能性融合酵素は、いずれも超好熱性であり常温では触媒活性をもたない。そこで *M. gastri* MB19 由来 HPS 遺伝子と PHI 遺伝子の融合遺伝子を新たに構築し、常温で機能する融合酵素の創製を試みた。PHI 遺伝子を HPS 遺伝子上流に配した *phi-hps*、その逆に配した *hps-phi* の 2 種類の融合遺伝子を構築し、その遺伝子産物の性質を調べた。その結果、*hps-phi* 産物のみが酵素活性を示し、常温に至適温度を有する二機能性 HPS-PHI 融合酵素の創製に成功した。

12) 創製した *hps-phi* 産物の分子活性は、HPS・PHI 単独酵素の等モル混合物と比べて2倍以上向上していた。11) の結果とあわせて、本融合遺伝子・融合酵素を、ホルムアルデヒド耐性を指標とした形質転換マーカーとして、あるいは生体触媒として応用するための道を開いた。

論文審査の結果の要旨

未来型資源として期待されているメタンやメタノールなどの C1 化合物を単一の炭素源として利用できる微生物（メチロトロフ）が、C1 化合物を資化する経路のひとつにリブローズモノリン酸（RuMP）経路がある。本経路では、3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS) ならびに 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI) の 2 種の鍵酵素により、ホルムアルデヒドをリブローズ 5-リン酸に固定した後、生成したヘキシュロース 6-リン酸をフルクトース 6-リン酸に異性化する。従来、これら鍵酵素は、メチロトロフに特有なものと考えられてきたが、近年の多様な微生物におけるゲノム解析の結果、非メチロトロフやアーキアにも広く分布していることが明らかになった。本論文は、従来、全く知見のなかったアーキア由来のこれら鍵酵素について、酵素化学的・遺伝学的手法を用いてその性質および生理学的意義を明らかにするとともに、HPS の立体構造をはじめて明らかにした。さらに、本酵素機能の応用を目的として常温で機能する HPS-PHI 融合酵素の開発を行った。評価すべき点は以下の 6 点である。

1) 超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 において HPS と PHI の両者をコードしている ORF (*PH1938*) をクローン化し、*PH1938* および *PH1938* の HPS 領域、PHI 領域をそれぞれ大腸菌内で発現した。それぞれの発現産物を精製し、発現産物の酵素学的諸性質を明らかにした。PHI 領域遺伝子産物のみでは至適温度・耐熱性ともに低く、本菌の生育温度である 80°C 付近では機能しないことを明らかにした。また、*PH1938* 産物は高温域で HPS・PHI 両酵素活性を有する二機能性融合酵素であり、HPS と PHI は互いに融合することにより、至適温度・耐熱性を向上させていることを明らかにした。さらに、HPS 領域遺伝子産物と PHI 領域遺伝子産物の当モル混合物と比較して、融合酵素である *PH1938* 産物の分子活性は、大幅に向上していることを明らかにした。

2) *P. horikoshii* の *PH1938* 産物がホルムアルデヒドの有無に関わらず生産される構成型酵素であることを本菌の無細胞抽出液について活性測定とウエスタン解析を行うことにより明らかにした。これは、構成型 HPS・PHI の初めての例である。

3) 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 において HPS と PHI の両者をコードしている ORF (*TK0475*) をクローン化した。本アーキアの無細胞抽出液は、ホルムアルデヒド固定反応とともに、その逆反応であるフルクトース 6-リン酸に依存したリブローズ 5-リン酸への触媒活性も有していた。さらに、本アーキアにおいて *TK0475* 破壊株を構築した。その結果、本遺伝子破壊株は最小培地で生育不能であり、ヌクレオシドを添加するとその生育を回復した。これらの実験結果は、HPS・PHI が核酸の前駆体の生合成に必須であることを示しており、RuMP 経路がホルムアル

デヒド固定の逆反応として生理的機能を果たしていることを示したはじめての例である。

4) メチロトロフ細菌 *Mycobacterium gastri* MB19 由来 HPS の大腸菌発現産物について結晶化を試み、X 線回折実験に適した結晶を得ることに成功した。

5) X 線回折実験より空間群と格子定数を決定した。精密化の結果、HPS の全体構造は典型的な $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造をとっていることを明らかにした。全体構造、および、活性部位における機能的に重要なことが予測されるアミノ酸残基は、orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC) ファミリーでよく保存されていることを明らかにした。

6) *M. gastri* MB19 由来 HPS 遺伝子および PHI 遺伝子を、人工的に融合し常温で機能する HPS-PHI 融合酵素の創製を試みた。構築した融合遺伝子のうち HPS 領域 - PHI 領域をこの順に配置した融合遺伝子産物は、常温に至適温度を有する HPS・PHI 二機能性融合酵素であり、その分子活性は HPS・PHI 融合遺伝子をそれぞれ単独で発現した発現産物の等モル混合液と比べて 2 倍以上向上していた。

以上のように本論文は、HPS・PHI 融合遺伝子を超好熱性アーキアゲノムに見出し、酵素機能について生化学的に実証することにより、自然界における C1 化合物代謝、アーキアの糖代謝に新たな知見を与えたのみならず、HPS の構造をはじめて明らかにし、常温で機能する融合遺伝子を創製してこれを応用するための道を開いたことから、制御発酵学、応用微生物学、微生物生化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18年10月27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。