

氏 名	三 原 康 博
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2411 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 月 23 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	STUDIES ON THE ENZYMATIC PHOSPHORYLATION OF NUCLEOSIDES (ヌクレオシドの酵素的リン酸化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、うまみ調味料の原料として有用な 5'-ヌクレオチドの生産法の開発に関するものである。すなわち、安全で安価な化合物であるピロリン酸をリン酸基供与体として用いる新規なヌクレオシドの酵素的リン酸化法を確立するために行ったもので、微生物由来のヌクレオシドの 5' 位特異的なリン酸基転移酵素のスクリーニング、本酵素の諸性質の解明と遺伝子クローニング、進化工学的手法によるリン酸基転移活性の向上と 5'-ヌクレオチド生産プロセスの構築、および本酵素の X 線結晶構造解析に関する成果をまとめたものである。本論文は、3 章よりなり、主な内容は以下に示すとおりである。

1. ピロリン酸をリン酸基供与体としてヌクレオシドの 5' 位を特異的にリン酸化し、5'-ヌクレオチドを生成する活性を示す微生物をスクリーニングした。ヌクレオシドをリン酸化する活性は比較的広い範囲の微生物に認められたが、多くの場合、リン酸基転移反応の位置特異性は低く、2' や 3'-ヌクレオチドを副生した。しかし、*Morganella* 属や *Escherichia* 属等の腸内細菌には高い 5' 位選択性を示すリン酸基転移活性が存在することを認めた。

2. 高い 5'-イノシン酸 (5'-IMP) 蓄積能を示した *Morganella morganii* を選抜し、本菌の無細胞抽出液から 5' 位選択的リン酸基転移酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。精製酵素の位置特異性は高く、ヌクレオシドの 5' 位のみを選択的にリン酸化した。また、リン酸基受容体に対する基質特異性も広く、本酵素によって各種ヌクレオシドの 5' 位をリン酸化することが可能であった。しかし、本酵素はリン酸基転移活性だけでなく、各種リン酸エステルの加水分解活性も示し、反応速度定数の解析から、ホスファターゼであることが示唆された。さらに、本酵素遺伝子をクローニングして塩基配列を決定したところ、本酵素遺伝子は既知の酸性ホスファターゼ遺伝子と高い相同性を示した。

3. *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia blattae*, *Klebsiella planticola* および *Providencia stuartii* から 5' 位選択的リン酸基転移活性を持つ酸性ホスファターゼ遺伝子をクローニングし、一次構造と酵素学的諸性質を比較した。その結果、これら菌株由来酵素の一次構造には高い相同性があることを認めた。いずれの酵素にもクラス A の酸性ホスファターゼに共通するモチーフが存在し、リン酸基転移活性を示すホスファターゼとしてよく知られているグルコース 6-ホスファターゼと近縁であった。

4. 野生型酵素はリン酸基転移反応で生成した 5'-ヌクレオチドを再び加水分解する活性が強く、5'-ヌクレオチド生産への適用が困難であったため、進化工学的手法により酵素を改変し、リン酸基転移活性の向上を試みた。*M. morganii* のリン酸基転移酵素 (酸性ホスファターゼ) 遺伝子へのランダム変異導入とスクリーニングを繰り返し、親株よりも 5'-ヌクレオチドの生産性が大きく向上した変異型酵素を得た。本変異型酵素を大量発現させた *E. coli* を用いた反応では、イノシンの添加濃度を上げてでも収率の低下が見られず、生成した 5'-IMP の急速な分解も抑制された。最適条件下での 5'-IMP の生成量は 101 g/l (対イノシン収率 88%) に達した。

5. 変異型酵素では 92 番目の Gly 残基 (GGT) が Asp 残基 (GAT) へ、171 番目の Ile 残基 (ATC) が Thr (ACC) 残基へ置換されていることを確認した。また、種々の変異型酵素を精製し、その諸性質を検討した結果、生産性の向上した変異型酵素ではリン酸基転移反応におけるイノシンに対する K_m 値が野生型酵素の約 1/3 まで低下したことにより転移反応の効

率が大きく向上し、一方、ヌクレオチド加水分解反応においては $V_{\max}$ 値が野生型酵素の約1/6まで低下したことにより分解活性が弱化していることが判明した。

6. X線結晶構造解析により *E. blattae* 由来酸性ホスファターゼの構造を決定した。本酵素の構造は既知のホスファターゼのものとは異なり、すべて α ヘリックスからなるユニークなものであった。また、本酵素の活性中心部位のトポロジーは *Curvularia inaequalis* 由来クロロペルオキシダーゼのものと類似していることを認めた。

論文審査の結果の要旨

5'-イノシン酸や5'-グアニル酸は呈味性があり、うまみ調味料の原料として有用なヌクレオチドである。これらヌクレオチドを直接発酵法によって生産することは困難なため、工業的スケールの製法のひとつとして、発酵法で生産したヌクレオチドを化学的あるいは酵素的にリン酸化する方法が用いられている。酵素的リン酸化法としてはイノシンキナーゼを用いる方法が開発されているが、本方法はATP再生系との共役下で反応させる必要があるため、*Bacillus subtilis*でヌクレオチド発酵を行う場合には適用できないなどの制限がある。著者は無機リン酸化合物をリン酸基供与体として用いる、ATP再生系を必要としないヌクレオチドの酵素的リン酸化反応についての研究を行い、新規な5'-ヌクレオチドの生産プロセスを確立するに至った。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 微生物界にピロリン酸—ヌクレオシドリリン酸基転移酵素を探索し、腸内細菌に属する数種の菌株に5'位選択性の高いリン酸基転移活性の存在を認めた。
2. *Morganella morganii*の無細胞抽出液よりピロリン酸—ヌクレオシドリリン酸基転移酵素を精製し、本酵素が位置選択的リン酸基転移活性を持つ酸性ホスファターゼであることを明らかにした。
3. 腸内細菌に属する5属の菌株よりピロリン酸—ヌクレオシドリリン酸基転移酵素遺伝子をクローン化し、これらの酵素がクラスAの酸性ホスファターゼに分類されることを示した。
4. 進化工学的手法を用い、野生型酵素を改変し、リン酸基転移活性を向上させ、加水分解活性を弱化させた、5'-ヌクレオチド生産へ適用可能な変異型酵素を創製した。
5. 変異型酵素遺伝子を導入して大量発現させた *Escherichia coli*を用いてピロリン酸をリン酸基供与体とする5'-ヌクレオチド生産プロセスを開発した。
6. 各種変異型酵素の諸性質を解明し、変異型酵素の5'-ヌクレオチド生産性向上の機構を明らかにした。
7. 1.9Åの分解能で *E. blattae* 由来酸性ホスファターゼのX線結晶構造を決定し、クロロペルオキシダーゼの構造との類似性を明らかにした。また、モリブデン酸結合遷移状態アナログの構造を解析することで、本酵素の活性中心の構造を解明した。

以上のように本論文は、スクリーニングにより新たに位置選択的ヌクレオシドリリン酸基転移酵素の存在を明らかにするとともに、これを進化工学的手法によって改変することで、酵素法による工業的な5'-ヌクレオチド生産プロセスの開発のための基盤を築いたものであり、応用微生物学、酵素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13年12月13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。