

論文の内容の要旨

論文題目 *Corynebacterium ammoniagenes* の GTP 生産能
を利用した物質生産に関する研究

氏名 小泉 聡 司

Corynebacterium ammoniagenes はイノシン、イノシン 5'-リン酸、グアノシン 5'-リン酸、アデノシン 5'-三リン酸などのヌクレオシドおよびヌクレオチドの工業的製造に用いられている微生物である。本菌株が有する強力なウリジン 5'-三リン酸生産能を利用した CDP-コリンの生産法も開発されているが、グアノシン 5'-三リン酸(GTP)生産能の利用に関しては、まだ報告されていない。

リボフラビン(ビタミン B2)は酸化還元反応や酸素添加反応を触媒する酵素(フラビン酵素)の補酵素として作用するフラビンモノヌクレオチド(FMN)およびフラビンアデニンヌクレオチド(FAD)の型で生体内に存在し、エネルギー獲得、物質代謝、薬物代謝に関与している。リボフラビンは GTP およびリブローズ-5-リン酸を出発基質として6段階の酵素反応により生合成される。*C. ammoniagenes* においては、両出発基質とも豊富に供給されていると予想されることから、リボフラビンの生合成に関しては GTP 以降のリボフラビン生合成系の活性が律速していると考えられた。そのため、生合成遺伝子をクローン化して遺伝子増幅をかければ、その生産性が飛躍的に向上すると考えられた。そこで、本研究では遺伝子増幅株を用いた発酵法によるリボフラビン生産系の構築を目的として検討を行った。

GTP を出発基質として生合成される生体物質には、リボフラビンの他に GDP-マンノ

ース・GDP-フコースなどが知られている。GDP-マンノース・GDP-フコースは糖転移酵素の基質となり、細胞表面に存在するリボ多糖などの生合成に関与している重要な化合物である。これらの糖ヌクレオチドは、工業的な製造法がないため非常に高価な試薬としてのみ供給されている。本研究では、GTP 生産能が高い *C. ammoniagenes* の活性を利用した GDP-マンノース・GDP-フコースの効率的な生産についても検討した。さらに GDP-フコース生産系にフコース転移酵素を組み込むことによりフコースを含有するオリゴ糖の生産系を構築することができたので、併せて報告する。

第1部 リボフラビンの発酵生産

第1章 リボフラビン生合成遺伝子のクローニング

C. ammoniagenes からリボフラビン生合成遺伝子を取得するため、変異処理によりリボフラビン要求性変異株を取得した。これら変異株の中には、リボフラビンの直前の前駆物質である 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine(DMRL)を蓄積する変異株が含まれていた。この変異株の DMRL 蓄積量は添加したリボフラビン量には影響されなかったことから、*C. ammoniagenes* においては *Bacillus subtilis* の場合と異なり、リボフラビンの生合成がリボフラビンまたはその代謝産物により制御されない可能性が示唆された。

次に、これらのリボフラビン要求性変異株を宿主としたショットガンクローニングを行い、栄養要求性の相補によりリボフラビン生合成に関与する遺伝子を取得した。得られたリボフラビン生合成に関与する遺伝子を増幅した菌株のコロニーは、コロニー周辺が黄色を呈しており、リボフラビンが過剰生産されていることが示唆された。

リボフラビン要求性を相補する断片(5.6 kb)につき、その DNA 塩基配列を決定したところ、5つの ORF を見出した。塩基配列から推定されるポリペプチドのアミノ酸配列を既知の配列と比較したところ、*B. subtilis* のリボフラビンオペロンに存在する ORF の配列と高い相同性を示した。このことから、*C. ammoniagenes* においても、リボフラビン生合成遺伝子がオペロン構造となって存在することが示唆された。

第2章 生合成遺伝子発現強化株によるリボフラビン生産

リボフラビン生合成に関与する遺伝子を増幅した菌株では、リボフラビンの過剰生産が認められたが、その生産性は十分なものではなかった。さらに生産性を向上させるためには、生合成遺伝子群の発現量を上げることが必要であると考えられた。しかしな

がら、*C. ammoniagenes* においては、強力なプロモーターは知られていなかった。そこで、新たにプロモーター活性を有する断片を取得するために、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標としたプロモータープローブを造成した。

造成したプロモータープローブに *C. ammoniagenes* の染色体 DNA の制限酵素切断断片を導入後 *C. ammoniagenes* を形質転換し、X-gal を含有するプレート上で青色を呈するコロニーを選択した。選択した菌株について、その β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、最も高い活性を示した菌株が保有するプラスミドとして pFM54-6 を取得した。

pFM54-6 に導入された断片(409 bp)について、その塩基配列を決定したところ、*B. subtilis* の valine tRNA と高い相同性を示す領域が存在した。また、この断片中には *Escherichia coli* や *C. glutamicum* のプロモーターで保存されている -35, -10 配列に相当する配列は認められなかった。

上記で得られた強力なプロモーター活性を有する断片(P54-6)支配下にリボフラビン生合成遺伝子群を発現するプラスミド(pFM67)を造成した。pFM67 保有株では、本来のプロモーター支配下での発現に比べて、リボフラビン生合成の最初の酵素である GTP cyclohydrolase II 活性が 2.4 倍、最後の反応を触媒する riboflavin synthase 活性が 44 倍に上昇していた。また、5L ジャー培養を行った際のリボフラビン蓄積量は 5.0g/l と 2.9 倍上昇しており、リボフラビン生産性は初発酵素である GTP cyclohydrolase II の活性と高い相関が認められた。

さらにリボフラビンの生産性を向上するためには、GTP cyclohydrolase II 活性を増強させることが必要であろうと考えられた。そこで、GTP cyclohydrolase II 遺伝子の開始コドン上流の配列を様々に改変したプラスミドを造成して、そのリボフラビン生産性を評価したところ、最高で 15.3g/l (72 時間)のリボフラビン生産性を示す菌株が取得できた。

第 2 部 GDP-マンノース、GDP-フコースおよびフコース含有オリゴ糖の生産

第 1 章 GDP-マンノース、GDP-フコースの生産

大腸菌の夾膜多糖であるコラン酸の生合成遺伝子群に存在する GDP-フコース生合成に関与する遺伝子を大腸菌染色体より PCR にて取得し、これらを強力なプロモーター支配下に高発現する組換え大腸菌を造成した。

GMP から GTP への強力な転換活性を有する *C. ammoniagenes* と GDP-フコース生合成遺伝子を高発現する組換え大腸菌の界面活性剤およびキシレン処理菌体を酵素源とし、GMP とマンノースを原料として菌体反応されたところ、30 時間で 4.8g/l の GDP-フ

コースが蓄積した。この際、反応液中には前駆物質である GDP-マンノースが著量蓄積していた。これは生成した GDP-フコースが GDP-mannose dehydratase 活性を阻害するためであろうと考えられた。そこで、その阻害を回避するために GDP-フコースの直前の前駆物質である GDP-4-keto-6-deoxy-mannose (GKDM)を蓄積させた後、蓄積した GKDM を GDP-フコースに転換するという 2 段階反応を行ったところ、30 時間で 18.4g/l の GDP-フコースの蓄積が認められ、生産性が大幅に向上した。

第 2 章 フコース含有オリゴ糖の生産

フコース含有オリゴ糖の生産に必要なフコース転移酵素については、哺乳動物由来の遺伝子が多数取得されているが、大腸菌で活性を保持して発現させることが困難であった。そのため、大腸菌での発現が容易な細菌由来の遺伝子という観点から *Helicobacter pylori* 由来の α 1,3-フコース転移酵素を選択した。*H. pylori* から PCR にて α 1,3-フコース転移酵素遺伝子を取得し、 P_L プロモーター支配下に高発現する組換え大腸菌を造成した。

H. pylori 由来の α 1,3-フコース転移酵素を発現する組換え大腸菌を、先に構築した GDP-フコース生産系に組み込むことにより、GMP とマンノースと N-アセチルラクタサミン [Gal β 1-4GlcNAc] を原料として、血液型抗原として知られているオリゴ糖であるルイス X [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] が 30 時間で 21g/l 蓄積した。

総括

GTP 生産能が高い *C. ammoniagenes* の活性を利用することにより、GTP を経由して生合成されるリボフラビンおよび GDP-フコースの生産系を構築することができた。さらに、GDP-フコース生産系とフコース転移酵素を組み合わせることにより、様々な生理活性が知られているフコース含有オリゴ糖の効率的な生産系を構築することもできた。