

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 泉 聡 司

*Corynebacterium ammoniagenes*はイノシン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)生産能の利用に関する報告はない。本研究は、GTPを出発基質として生合成されるリボフラビン(ビタミンB2)およびGDP-マンノース・GDP-フコース・フコース含有オリゴ糖に関して、GTP生産能が高い*C. ammoniagenes*の活性を利用した効率的な生産系の構築を目的とし、生合成酵素遺伝子の取得およびその解析を行うとともに生産検討を行ったもので、緒論、2部4章、総括より構成されている。

緒論では、研究の背景と意義、目的について概説している。

第1部第1章では、*C. ammoniagenes*におけるリボフラビン生合成の制御、生合成遺伝子の取得および解析について述べられている。*C. ammoniagenes*のリボフラビン要求性変異株の中で前駆物質のDMRLを蓄積する株のDMRL蓄積量が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*の場合とは異なり、その生合成がリボフラビンによる制御を受けない可能性が示された。さらに、要求株を宿主とした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、その断片(5.6kb)のDNA塩基配列を決定した。この領域に見い出された4つのORFの推定アミノ酸配列は*B. subtilis*のものと高い相同性が認められ、*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された。

第1部第2章では、*C. ammoniagenes*からの新規プロモーターの取得およびリボフラビンの発酵生産について述べられている。 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利用したプロモーター取得を行い、*B. subtilis*の valine tRNA と高い相同性を示す配列を含むプロモーター活性を有する断片を取得した。このプロモーター支配下に生合成遺伝子群を発現するプラスミド保有株では、生合成酵素の活性が上昇しており、リボフラビン生産性も初発酵素であるGTP cyclohydrolase IIの活性上昇に相当する向上が認められた。GTP cyclohydrolase II活性を増強させるために、構造遺伝子の開始コドン上流の配列を改変したプラスミドを造成したところ、最高で15.3g/l(72時間)のリボフラビン生産性を示す菌株を造成できたことが示されている。

第2部第1章では、*C. ammoniagenes*と生合成遺伝子を高発現する組換え大腸菌との組み合わせによるGDP-マンノースおよびGDP-フコースの生産について述べられている。GMPからGTPへの強力な転換活性を有する*C. ammoniagenes*とGDP-マンノース生合成遺伝子を高発現する組換え大腸菌の菌

体を酵素源とし、GMPとマンノースから効率的にGDP-マンノースが蓄積したことが示されている。GDP-フコース生産においては、GDP-フコースによる阻害を回避するためにGDP-フコースの前駆物質である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段階反応を適用することにより大幅な生産性の向上が認められたことが示されている。

第2部第2章では、フコース含有オリゴ糖の生産について述べられている。*Helicobacter 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、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-アセチルラクトサミン [Gal β 1-4GlcNAc] を原料として、血液型抗原として知られているルイスX [Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] が効率的に蓄積したことが示されている。

総括では、*C. ammoniagenes*が有する高いヌクレオシド5'-三リン酸生成活性について考察を加えている。

以上、本論文はGTP生産能が高い*C. ammoniagenes*の活性を利用することにより、GTPから生合成されるリボフラビンおよびGDP-マンノース・GDP-フコース・フコース含有オリゴ糖の効率的な生産系を構築したもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。