

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川崎 寿

イノシン 5'-モノリン酸 (イノシン酸) ナトリウム、グアノシン 5'-モノリン酸 (グアニル酸) ナトリウムは、それぞれ、鰹節のうま味成分、椎茸のうま味成分として知られている。これらは、核酸系調味料として、グルタミン酸ナトリウムと共に広く利用されている。核酸系調味料の需要は拡大の一途を辿っており、今後も需要増が見込まれることから、その製造方法について更なる改善が求められている。核酸系調味料の主たる製造法は、発酵生産したイノシンまたはグアノシンを POCl_3 でリン酸化する方法である。本論文は、新製法開発の第一段階として、リン酸化設備を簡略化できるイノシン及びグアノシンの酵素的リン酸化法を検討したものである。

第一章では、研究の背景及び意義について述べられている。

第二章では、*E. coli* 由来イノシン-グアノシンキナーゼを利用し、菌体の持つ ATP 再生反応と共役させてイノシンをリン酸化する方法について、その実用性の評価を行っている。イノシン-グアノシンキナーゼ [E.C. 2.7.1.73] は、ATP の γ 位のリン酸基をイノシン及びグアノシンの 5' 位の水酸基に転移し、イノシン酸、グアニル酸を生成する。評価の結果、本法によるイノシンのリン酸化は工業生産上の観点からも、有用であることが確認された。しかし、本法によるグアノシンのリン酸化は認められなかったため、精製酵素の性質を詳細に解析した。その結果、本酵素は、反応生成物であるグアニル酸の他、GDP や GTP によっても強く阻害されることが明らかとなり、これが原因のひとつと推定された。

第三章では、グアノシンを酵素的にリン酸化するために、新規イノシン-グアノシンキナーゼの探索を行った。同一細胞中にイノシン及びグアノシンの利用経路が 2 種存在する場合があること、及びイノシン-グアノシンキナーゼ活性が微弱であることから、原核生物のイノシン-グアノシンキナーゼ活性は、限定された種で報告されているのみである。そこで、細胞や粗酵素抽出液などの混合系を用いた場合でも微弱な活性を検出することが可能なスクリーニング法を構築し、発酵工業生産に用いられている 70 株の細菌を検索した。その結果、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953 (*Exiguobacterium* 属に再分類された)、*Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887 にイノシンを直接リン酸化する活性を見出した。

第四章では、*E. acetylicum* に見いだされたイノシンを直接リン酸化する活性を精製し、イノシン-グアノシンキナーゼであることを証明した。また、この新規イノシン-グアノシンキナーゼが GDP、GTP によって阻害されないことから、ATP 再生反応と共役させたグアノシンのリン酸化を可能とする酵素と考えられた。

第五章では、*E. acetylicum* 由来イノシン-グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングを行った。その結果、本酵素は 303 アミノ酸残基よりなる分子量 32, 536 の蛋白質と推定

された。ホモロジー検索の結果、本酵素は各種の糖キナーゼと相同性をもつことから、リボキナーゼファミリーに属するものと考えられた。一方、*E. coli* 由来イノシンーグアノシンキナーゼ等他のヌクレオシドキナーゼとは低い相同性を示した。*E. acetylicum* ATCC 953 は、2種のプリンヌクレオシド利用経路を持つが、イノシンーグアノシンキナーゼによる経路は増殖期に、他方の経路は定常期に利用されている可能性が考えられた。

第六章では、*E. acetylicum* 由来イノシンーグアノシンキナーゼを用い、ATP 再生反応と共役させたイノシンとグアノシンのリン酸化が述べられている。生産工程簡略化のため、ATP 再生菌として用いる *Corynebacterium ammoniagenes* において *E. acetylicum* 由来イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を発現させ酵素的リン酸化を行った。その結果、モル転換率 82% でイノシンよりイノシン酸が生成した。さらに、モル転換率は 16% であったが、これまで報告されていないグアノシンからグアニル酸を生成することが出来た。

以上、本論文は核酸系調味料の新製造法開発を検討したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。