

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤 井 匡

今日、世界で販売されている医薬品の約 40%が、また開発中の医薬品の約 80%がキラル化合物であり、キラル化合物の世界市場は 2000 年で 66.3 億ドルで 2007 年には 160.3 億ドルになると予想されている。中でも L-ホモグルタミン酸および L-ピペコリン酸は、医薬品合成のキラル中間体として重要な化合物である。本論文は、キラル化合物を生産する上で最も有効な方法の一つである微生物変換法を用い、L-リジンから L-ホモグルタミン酸および L-ピペコリン酸への微生物変換系の構築を行った結果を論述したもので、緒言に続く 4 章から成る。

第 1 章は L-リジン 6-アミノトランスフェラーゼ (LAT) をコードする *lat* 遺伝子をクローニングした結果を述べている。グラム陰性菌 *Flavobacterium lutescens* IF03084 株において、L-リジンが L-ホモグルタミン酸に立体選択的に変換されることが知られていた。この変換反応では、まず LAT により L-リジンが α -アミノアジピン酸セミアルデヒドあるいはこれと平衡状態にある Δ^1 -ピペリデイン-6-カルボン酸 (P6C) に変換され、次いで P6C 脱水素酵素 (PCD) により L-ホモグルタミン酸に変換されることが予想された。そこで *F. lutescens* IF03084 株による L-リジンから L-ホモグルタミン酸への微生物変換速度の向上を目的として、その変換反応に関与する遺伝子をクローニングすることを試みた。まず *F. lutescens* IF03084 株の LAT を精製し、その N 末端のアミノ酸配列から LAT をコードする *lat* 遺伝子をクローニングした。LAT のアミノ酸配列は種々のアミノトランスフェラーゼに相同性を示していた。また LAT はホモダイマーとして機能していた。この結果は、他の種々のアミノトランスフェラーゼがモノマーかホモポリマーとして機能していることと合致しており、既に報告されていた「*F. lutescens* IF03084 株の LAT はヘテロテトラマー構造をとる」という報告を覆す結果であった。

第 2 章は PCD をコードする *pcd* 遺伝子をクローニングし、さらに L-リジンから L-ホモグルタミン酸への微生物変換速度の向上を達成した結果を述べている。まず、ショットガンクローニングにより、PCD をコードする *pcd* 遺伝子をクローニングした。さらに LAT と PCD との共役反応により L-リジンを L-ホモグルタミン酸に変換することを示した。また、*lat* と *pcd* をプラスミドに連結した後、得られたプラスミドを *F. lutescens* に導入して、L-リジンから L-ホモグルタミン酸への微生物変換反応効率を約 1.7 倍に向上させることに成功した。この株の L-ホモグルタミン酸生産量は培養開始後 96 時間で約 13.4 g/L であったが、この生産量は十分工業生産に耐えうる数値であり、実際にこの菌株を用いて L-ホモグルタミン酸の工業生産が行われている。

第3章はLATとピロリン-5-カルボン酸還元酵素(P5C還元酵素)に触媒されるL-リジンからL-ピペコリン酸への微生物変換系を構築した結果を述べている。本研究以前は経済的にL-ピペコリン酸を発酵生産する系は確立されておらず、また化学合成法によっても光学純度100%のL-ピペコリン酸を得る事は出来なかった。本研究では*lat*を発現させた大腸菌がL-リジンをL-ピペコリン酸へ変換することを見出し、さらに大腸菌の*proC*がコードするP5C還元酵素が、LATによりL-リジンから生成されるP6Cを還元してL-ピペコリン酸に変換することを*in vivo*および*in vitro*における実験により明らかにした。この*lat*発現大腸菌による微生物変換反応で蓄積するL-ピペコリン酸の光学純度は100%であり、これにより遺伝子組換え大腸菌によるL-リジンからL-ピペコリン酸への変換菌をはじめて構築することができた。

第4章は*lysP*と*yeiE*の増幅により*lat*発現大腸菌のL-リジンからL-ピペコリン酸への変換速度の向上を達成した結果を述べている。リジン特異的透過酵素をコードする*lysP*遺伝子を*lat*と共に連結したプラスミドを大腸菌に導入し、この株のL-リジンからL-ピペコリン酸への微生物変換速度を調べた。この結果、変換速度は140 mg/L/hであり、*lat*のみを連結したプラスミドを導入した大腸菌の変換速度28 mg/L/hの約5.0倍であった。また、*yeiE*が*lysP*の正の転写制御因子であることを明らかにし、*yeiE*を*lysP*と*lat*と共に連結したプラスミドを大腸菌に導入し、この株のL-リジンからL-ピペコリン酸への微生物変換速度を調べた。この結果、変換速度は180 mg/L/hであり、*lat*のみを連結したプラスミドを導入した大腸菌の変換速度の約6.4倍であった。このように、*yeiE*と*lysP*の増幅は*lat*発現大腸菌によるL-リジンからL-ピペコリン酸への微生物変換速度の向上に対して有効であることが示された。先に述べた光学純度100%のL-ピペコリン酸生産系の生産性を、工業生産で用いることが可能なレベルにまで向上させることに成功した。実際にここで構築した株を用いてL-ピペコリン酸の工業生産が行われている。

以上のように、これまでの化学合成法や酵素を直接用いる酵素合成法では、コストがかかりすぎたり、その生産量や光学純度を上げられなかったり、あるいはそれを生産する系すら存在しなかったような目的キラル化合物について、遺伝子組換え菌を用いた微生物変換法による発酵生産が可能であることを本研究は示したものであり、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって本審査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。