

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田畑和彦

本研究の目的は微生物ゲノム情報を利用した新規酵素遺伝子の探索とそれを利用した物質生産プロセスの構築である。従来、新規酵素を探索する場合は、対象酵素の活性を指標とした活性スクリーニングが定法であったが、操作自体に大量の労力を必要とし、活性陽性株が取得できても、その酵素遺伝子の配列情報を取得するための更なる操作が必要になるなど、目的達成に大きな時間を要するという欠点があった。この点において、データベースを利用した探索では、検索すべき情報さえあれば、労せずして候補となる対象遺伝子の全長の配列情報が得られる。操作に関して、活性スクリーニングに比べ、データベースを用いたスクリーニングは、遥かに時間・労力・経験などを省けて非常に効率的で魅力的な方法である。

工業生産に利用すべき酵素遺伝子を新たに探索する際に重要なことは、検討を開始してから短期間のうちに、他者の特許に抵触しない物質生産に関わる酵素遺伝子を取得することである。また最も望ましくは、全く未知の新たな活性を有する酵素遺伝子を取得することである。この目標を達成するために、微生物ゲノム情報を利用した新規酵素遺伝子の探索を実践し、新たな物質生産プロセスの構築を試みた。

### 1. 既知酵素の配列情報を基に広範囲の生物種のゲノム情報からの探索

序章に続き、第1章では新たなシアル酸酵素的生産プロセスの構築のため、その鍵酵素となる GlcNAc 2-epimerase に関して、酵素遺伝子探索を行った。この酵素は、先行研究によりブタ由来の酵素遺伝子がクローン化されており、また特許化されていることから、他の生物種特に微生物由来の酵素遺伝子探索を行った。その結果、全ゲノム構造が解明されたラン藻(*Synechocystis sp.* PCC6803)の機能未知 ORF (slr1975) に高い相同性を示すものがある事がわかった。この組換え型酵素を評価したところ、目的の活性を有し、既知の高等動物由来の酵素と非常に近似した性質である事が確認された。

このラン藻由来新規 GluNAc 2-epimerase の活性を利用して、これまでシアル酸の生産に利用されていないシアル酸合成酵素を組み合わせた生産プロセスの構築を検討した。その結果、2種の酵素を組換え発現した大腸菌菌体と糖代謝能が強い *C. ammoniagenes* の培養菌体を酵素源に菌体反応において、最大 12 g/l のシアル酸の生成蓄積が確認できた。

### 2. 既知酵素をデータベースの機能分類を利用して対象菌株からの探索

第2章では、大腸菌を宿主として、メバロン酸合成酵素遺伝子群をクローニングし組換え発現させ、宿主の解糖系から供給される acetyl-CoA を利用したメバロン酸生産の検討を行った。乳酸菌由来のメバロン酸合成酵素群を発現した組換え大腸菌株は、通常酢酸

生成に向かっていた代謝を、メバロン酸の生合成へ転換させ効率的に分泌生産できることを確認した。そして、Jar でのフェドバッチ培養を行った結果、最大でメバロン酸 47 g/l( 培養 50 時間、対糖収率 25% ) の生成蓄積が確認できた。

### 3 . 未知活性酵素の構造的特徴の仮説を基に機能未知遺伝子からの探索

第 3 章では、新規ジペプチド合成酵素の探索を行った。これまでに遊離の L-アミノ酸から  $\gamma$ -ジペプチドを直接合成する酵素活性を有するものは確認されていない。そこで、既知のペプチド結合形成反応の情報を収集し、あるべき対象酵素の仮説を立ててデータベース検索を行うことにした。ATP-grasp ドメイン構造を有する遺伝子を抽出し、次に機能が未同定のものに絞込み、最後に唯一  $\gamma$ -ジペプチド合成活性を有する D-Ala-D-Ala ligase とのホモロジーが確認できるものを選択した。その結果、全ゲノムの解明された枯草菌 *B. subtilis* の *ywfE* 遺伝子を抽出するに至った。この遺伝子産物は ATP 依存的に遊離の L-Ala, L-Gln から AlaGln を合成する活性を有することを確認した。このような活性を有する酵素を見出したのは世界で初めての事である。

また組換え型酵素の性質解析の結果、他の遊離アミノ酸の組合せでもジペプチドの生成が確認でき、汎用的なジペプチド生産への応用の可能性を示せた。

ゲノム解析研究は、現在ではヒトゲノムの完成に至っている程であり、今後益々ゲノム情報を利用した遺伝子探索を行う環境は充実して来ている。一生物種の全ゲノムが解明され、そこにある遺伝子の存在が予測されても、現状では、その半数以上が機能未知の遺伝子として残されている。これらの中には、我々がこれまで想像もしていないような、新たな活性を有する酵素遺伝子が含まれている可能性がある。これらの中から、如何にして新規酵素を発見するかは、研究者の検索条件設定の気転と想像力によるところであり、今後益々用いられるべき実験手法になるであろう、と考察された。

以上本研究は、ゲノム情報を最大限に利用した微生物由来新規酵素の探索、およびそれを実際の物質生産に利用した先駆的研究として、学術的さらには産業応用的に貢献するところが多い。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。