

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (農学)	氏名	宮内 隆記
学位授与の要件	学位規則第4条第1・②項該当		
論 文 題 目			
ネクトリシンの生合成機構の解明と製法構築への応用に関する研究			
論文審査担当者			
主 査	教 授	三本木 至宏	
審査委員	教 授	太田 伸二	
審査委員	教 授	島本 整	
審査委員	准教授	大村 尚	
審査委員	准教授	船戸 耕一	
審査委員	教 授	仲宗根 薫	
〔論文審査の要旨〕			
<p>ここに提出された論文は、糸状菌が産生するイミノ糖であるネクトリシンの生合成機構を解明し、その製法構築への応用を目指したものである。</p> <p>CS-1036 は、糖尿病治療薬として三共株式会社（現第一三共株式会社）にて創製された化合物であり、その原料としてネクトリシンを用いることで製造原価低減が期待できる。そのためには、遺伝子組み換え微生物によるネクトリシンの発酵生産が魅力的と考えられたが、ネクトリシンの生合成遺伝子や生合成経路に関する情報は報告されていなかった。</p> <p>本論文では以上の背景を踏まえ展開され、その構成は下記の5章からなる。</p>			
第1章 緒言			
本章では、研究の背景と動機が記述されている。			
第2章 <i>T. discophora</i> におけるネクトリシン生合成経路を解析			
<p>本章では、菌体への¹³C 同位体標識した中間体候補物質の添加実験と菌体からの推定中間体の単離・結晶構造解析、及び菌体抽出液による推定中間体のネクトリシンへの変換が調べられている。その結果、D-リボースや D-キシロースがネクトリシンの生合成中間体であること、菌体抽出液中に 4-アミノ-4-デオキシアラビニールが含まれており、本化合物がネクトリシンの前駆体であることが示された。そして得られた知見より、ネクトリシンの推定生合成経路が提案されている。</p>			

第3章 ネクトリシン生合成酵素の *T. discophora* からの精製と特性解析

本章では、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールをネクトリシンへ変換する酵素 (NecC) が精製され、性質が調べられている。菌体抽出液より硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーにより NecC が精製された。また、LC-MS/MS 分析により NecC アミノ酸配列の一部が推定された。NecC はグルコース-メタノール-コリンオキシダーゼと相同性があること、フラビン骨格を有する補因子を含有し、オリゴマーを形成していること、酵素活性は、至適 pH が 7.0、至適温度が 30°C であり、EDTA により阻害され、MnCl₂ により若干上昇すること、4-アミノ-4-デオキシアラビニトールからネクトリシンへの変換反応は菌体から抽出後に主に起こっていることが示された。そして、ネクトリシンの醗酵生産にあたっては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出されなければならないことが提言されている。

第4章 ネクトリシン生合成遺伝子の同定と機能解析

本章では、ネクトリシン生合成遺伝子クラスターの取得と機能解析、及び遺伝子組換え大腸菌によるネクトリシン生産について述べられている。第3章で得られた NecC 部分アミノ酸配列を手がかりに、*T. discophora* ゲノムライブラリーより *necC* 遺伝子全長が同定された。また、*necC* 周辺のゲノム DNA より、残りの推定生合成遺伝子 (*necA* と *necB*) が見出された。遺伝子破壊と相補、及び大腸菌による異種発現によりこれらの遺伝子の機能が検証された結果、NecA、NecB により 4-アミノ-4-デオキシアラビニトールが生じ、NecC によりネクトリシンが生成することが示された。最後に、*NecA/necB/necC* を導入した組み換え大腸菌は、ネクトリシンを生産できることが示された。

第5章 結論と今後の展望

本章では、第2章から第4章までの研究成果を応用して元株を用いたネクトリシンの工業的生産プロセスを確立し、CS-1036 の製造原価低減を達成したことが述べられている。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (農学) の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。