

学位論文審査の結果の要旨

氏名	李 銀 霞
審査委員	主査 澤 嘉 弘 (印)
	副査 松 下 一 信 (印)
	副査 渡 邊 文 雄 (印)
	副査 柴 田 均 (印)
	副査 石 川 孝 博 (印)
題 目	Novel Non-NadB Type L-Aspartate Dehydrogenases from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134: Molecular Characterization, Application, and Physiological Function. (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1と <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134株由来新規非NadB型アスパラギン酸デヒドロゲナーゼの分子特性、応用と生理機能)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>アスパラギン酸脱水素酵素 (L-AspDH, EC 1.4.1.21) は、アミノ酸デヒドロゲナーゼファミリーに属しており、NAD(P)から NAD(P)H への還元と共に L-Asp からオキサロ酢酸(OAA) への可逆的な酸化的脱アミノ反応を触媒する。この酵素の存在は非常に希で、本研究以前には好熱性細菌の <i>Thermotoga maritima</i>(TmaAspDH)と超好熱性アーキアの <i>Archaeoglobus fulgidus</i> (AfuAspDH) からの2例しか報告されていなかった。AfuAspDH と TmaAspDH は共に NAD 生合成に関与する遺伝子群である <i>nadA</i> と <i>nadC</i> と共にオペロンを形成している。したがって、これら超好熱菌由来 AspDH は、以前より LAO として知られている NadB 型の酵素としての役割を担っていると考えられる。また、これらの酵素は、共に高い熱安定性を有すると報告されているが、常温での触媒活性は非常に低い為、アミノ酸・ケト酸の合成・定量・センサー等への応用は困難であった。</p> <p>本研究は、AfuAspDH とのホモロジー検索により 2 種の中温性細菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 と <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 由来の非 NadB 型 AspDH (PaeAspDH, ReuAspDH) を同定し、これらリコンビナント酵素の詳細な特徴づけ、PaeAspDH を用いる高効率 L-アスパラギン酸生産システムの可能性、さらに、その生理的機能について検討を行ったものである。</p> <p>PaeAspDH と ReuAspDH は約 28 kDa の分子質量を持つ二量体タンパク質であり、それぞれ 127 U/mg と 137 U/mg という L-アスパラギン酸(L-Asp)酸化活性に対する非常に高い比活性を持っていた。これらの値は、アーキア由来 AfuAspDH の 50℃における比活性 (4.6 U/mg) よりも遥かに高いものであった。両酵素は NAD と NADP の両方を補酵素として利用することができ、反応至適温度は共に 48℃であり、20 分間の T_m 値はそれぞれ 48℃~49℃を示し、0.4M NaCl または 30% グリセロールの添加によって、共に約 60℃まで向上した。カイネティックパラメータの解析により、PaeAspDH は、生体内で NAD, NADP を同等に使用しており、一方、ReuAspDH は、NAD を優先的に使用していることが示唆された。</p>	

PaeAspDH 酵素共役系を用いて、高効率 L-Asp 生産システムの検討を行った。同一の大腸菌内に PaeAspDH、*Bacillus subtilis* マレイン酸脱水素酵素(BsMDH)、*Escherichia coli* フマラーゼ (EcFum)遺伝子を有する L-Asp 生産系 B システムは、フマル酸を出発物とした fed-batch 法によって、フマル酸あたりの変換効率 89.4%という高レベル L-Asp 生産量 (625 mM) を達成した。さらに、発酵生産系 C (PaeAspDH と BsMDH 遺伝子のリコンビナント大腸菌) はコハク酸を炭素源として用いることで 50 時間後に 33 mM の L-Asp を菌体外に蓄積した。この生産系に 0.8%以上の Triton X-100 を加えることで L-Asp の生産能がさらに向上した。

バイオインフォマティクスを用いた分析によって、ReuAspDH と PaeAspDH 遺伝子はそれぞれ、*R. eutropha* JMP134 と *P. aeruginosa* PAO1 ゲノムに隣接する 12 の遺伝子と共に、NAD の生合成無関係な独立した遺伝子クラスターを形成していることが明らかとなった。*Ralstonia eutropha* JMP134 株の遺伝子発現解析により、AspDH の遺伝子クラスター、PHA 生合成、TCA サイクルに関する遺伝子の発現は野生株における L-Asp によって強く誘導されることが明らかとなった。また、GC-MS 分析の結果、野生株はフルクトースまたは L-Asp からポリ-3-ヒドロキシブチレート (PHB) を合成できる可能性があるが、AspDH ノックアウト Δ B3576 変異株は L-Asp からいかなる形態の PHA も合成できないことが明らかとなった。この AspDH 遺伝子クラスター産物は PHA 前駆体である AcetylCoA の生合成に関する可能性が強く示唆された。以上、非 NadB 型 AspDH は、これまでに報告されている NadB 型酵素とは全く異なる生理機能を持っていると結論した。

以上、本学位論文は、常温性菌由来 非 NadB 型 AspDH の分子特性、PaeAspDH が持つ高効率な触媒特性を利用した L-Asp 生産系の構築、さらに生理機能、等々、基礎研究、応用研究の両面で、新規で独創性に富むものであり、この分野での研究の発展に大きく貢献することは間違いなく、学位論文として高く評価できると判断された。