

氏名(本籍)	なかもとともこ 中本智子(東京都)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第5759号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	A Study on Microcystin Biosynthesis Related Gene - <i>mcyF</i> from <i>Microcystis aeruginosa</i> (<i>Microcystis aeruginosa</i> 種由来のミクロシスチン生合成関連遺伝子 - <i>mcyF</i> に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 杉浦 則夫
副査	筑波大学教授 工学博士 王 碧 昭
副査	筑波大学教授 博士(農学) 張 振 亜
副査	筑波大学准教授 博士(理学) 内海 真 生

論文の内容の要旨

富栄養化湖沼において異常発生し、水利用の上で問題となっているラン藻が産生する microcystin は極めて高い毒性を持ち、発ガンプロモーターとしても作用するため、人体への影響が危惧されている。安全な水利用のためには、microcystin 合成機構の解明が喫緊の研究課題となる。そこで、本研究では microcystin の合成、特に microcystin 合成酵素遺伝子 *mcy* クラスタに存在するラセマーゼ遺伝子 *mcyF* に着目し、分子生物学的手法を用いて、microcystin 産生ラン藻類からの *mcyF* の検出、同定、塩基配列解析を行い、*mcyF* の系統発生について検討を行った。また精製タンパク質 McyF を得るため、大腸菌由来の培養細胞を利用して遺伝子組み換えタンパク質 McyF の発現系を構築した。さらに、McyF の機能を知るために、精製された McyF を用いて、酵素活性解析を行った。*M.aeruginosa* PCC 7806, NIES 88, 90, 102, 103, 107, 298, 1055, 1058, 1072, 1085, 1086, 1105 (全 13 株) を培養し、対数増殖期の各菌株を回収したのち全 DNA 抽出を行った。次いで、プライマー (*mcyF*88F, *mcyF*188R) を設計し、ゲノム DNA から *mcyF* 遺伝子領域を増幅し、シーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列に関して Clustalw, PHYLIP を用いて系統解析を行った。McyF 発現系の構築に関して、McyF 発現用のプラスミドベクター pET-24a (+) のマルチクローニングサイトの *Eco* RI と *Xho* I の間に *mcyF* 遺伝子を組み込んで、宿主大腸菌 *E.coli* BL21 (DE3) にトランスフォーメーションした。*mcyF* 遺伝子の転写を活性化するために、イソプロピル-β-D チオガラクトピラノシド (IPTG) を大腸菌 *E.coli* BL21 (DE3) の培養液に加え、発現誘導を行った。生産されたタンパク質を精製し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて、試料中のタンパク質を分離し、染色して観察した。酵素活性解析については、glutamate racemase assay や aspartate racemase assay を用いて、精製された McyF のラセマーゼ活性解析を行った。その結果、13 株の microcystin 産生株において *mcyF* 遺伝子が確認され、アミノ酸配列を系統解析したところ、9 株の *Microcystis* 株が 2 つのクレードに分かれることが判明した。*mcyF* から推定されるアミノ酸配列 (McyF) を用いてアライメントを行った結果、McyF は glutamate racemase、aspartate racemase と同様、ラセマーゼ活性に必須な 2 つの活性システイン残基を保持していることが分かつ

た。*mcyF*は microcystin 中の L-Glu 合成を担う *mcyE* の下流に位置していることから glutamate racemase 活性を持つことが予想されているが、本研究で行ったアミノ酸配列の解析から、McyF が aspartate/glutamate racemase の系統樹において明らかに aspartate のグループに近い位置にあることが判明した。また構築された McyF 発現系では *M.aeruginosa* NIES 88、107、1055 由来する *mcyF* 塩基配列を改変することなく、発現させることができた。これらの形質転換タンパク質に関し、目的タンパク質であることを CBB 染色した SDS-PAGE やウェスタンブロット法によって確認した。精製された McyF のラセマーゼ活性解析を行った結果、*M.aeruginosa* NIES 88、1055 由来する McyF は glutamate racemase 活性と aspartate racemase 活性両方を持ち、デュアルファンクションタンパク質であることが判明した。しかし、*M.aeruginosa* NIES 107 は glutamate racemase 活性がなく、aspartate racemase 活性のみ確認された。このことは、*M.aeruginosa* から由来する一部の McyF が L-Glu にだけでなく、L-aspartate/L-MeAsp のラセミ化に関与しているということを示唆し、また aspartate racemase 活性のみ有する McyF も存在することが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、microcystin の合成でまだ未解明な microcystin 合成遺伝子 *mcy* クラスターに存在するラセマーゼ遺伝子 *mcyF* の機能と役割に着目し、分子生物学的手法により、microcystin 産生ラン藻から *mcyF* の検出、同定、塩基配列、および解析を行い、*mcyF* の系統発生について検討し、さらに遺伝子組み換えタンパク質 McyF の発現系構築、およびその酵素活性解析を行った。

本研究で解析したいくつの microcystin 産生ラン藻類の *mcyF* 塩基配列を用いて系統解析の結果から、McyF が基質特異性が低く、L-Glu にだけでなく、L-aspartate/L-MeAsp のラセミ化にも関与していることが初めて推定された。このことは、精製された組み換えたんぱく質 McyF のラセマーゼ活性解析により証明され、一部の McyF が glutamate racemase 活性と aspartate racemase 活性両方を持ち、デュアルファンクションタンパク質であることによって推定に至った。

McyF の基質特異性を明らかにすることは本研究の着眼点で、既往の研究と比べ、これまで不明確となっていた現象が明らかとなり、microcystin の合成機構の解明に新しい知見が得られた。本学位論文は従来の国内外の研究成果を受け継ぎつつも、上記で述べた成果から、これまでの研究から大きなステップを踏み出したものと位置付けることができる。

McyF の基質特異性と生化学的特性を解明できれば、microcystin の合成機構の解明に新しい知見が得られ、microcystin の生合成のメカニズムの解明に多大な影響を与えることができるものと考えられる。また、近年医薬品や食品添加物、農薬などの重要な中間体として注目されて D-アミノ酸は需要が高まり、D, L-アミノ酸のラセミ化を触媒する酵素であるラセマーゼ McyF の基質特異性が低いと考えられることから、それを利用することにより、安価に供給される L-アミノ酸から D-アミノ酸の直接生産の可能性が生まれる。本研究は、独創的な実験手法に基づいた新規性の高い成果である。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。