

氏名（本籍）	清水 哲（東京都）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	博 甲 第6683号
学位授与年月日	平成25年7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	L-グルコース代謝の遺伝・生化学的研究

主査	筑波大学准教授	博士(農学)	中村 颯
副査	筑波大学教授	農学博士	星野 貴行
副査	筑波大学教授	博士(農学)	高谷 直樹
副査	筑波大学教授	農学博士	小林 達彦

## 論文の要旨

地球上の生命は様々な有機化合物に対してホモキラリティーを示す。糖についても、D 型糖の代謝はよく知られているものの L 型糖代謝についてはあまり報告例がない。特にグルコースについては、ほとんどの生命が D-glucose を資化できるのに対して、L-glucose は代謝されないと考えられてきた。

本研究では、上記の「糖質代謝のホモキラリティー」の解析も念頭に、L-glucose 資化微生物の単離と代謝機構の解析を行った。

### 1) L-glucose 資化微生物のスクリーニング

L-glucose を単一炭素源とした集積培養を用いて、筑波大学周辺の土壌より複数の L-glucose 資化微生物を単離した。これらの微生物は *Alphaproteobacteria* の異なる 6 属に属することを明らかにした。

### 2) L-glucose dehydrogenase 遺伝子の同定と酵素学的解析

分離株より *Paracoccus* sp. 43P 株を選択し L-glucose 代謝機構の解析を行った。最初に代謝初発反応を検討し、顕著な L-glucose dehydrogenase 活性を検出したので、同酵素を精製し遺伝子(*lgdA*)を同定した。*lgdA* 遺伝子は inositol 代謝関連遺伝子群とクラスターを形成しており、同酵素は強い *scyllo*-inositol dehydrogenase 活性を示した。*LgdA* の L-glucose からの反応産物を精製・同定し、*LgdA* が L-glucose を L-gluconate へと変換することを明らかにした。

### 3) *lgn* 遺伝子群のクローニングと機能解析

次に L-gluconate 以降の代謝経路を明らかにするため、43P 株の細胞抽出液を用いて L-gluconate を基質とした酵素活性を検討し、L-gluconate dehydrogenase (L-GnDH)活性を検出した。そこで酵素精製・遺伝子の同定を行い、L-GnDH 遺伝子(*lgnH*)を同定した。

*lgnH* 遺伝子は、ABC-type transporter (*LgnA*-*D*)、dehydratase (*LgnE*)、kinase (*LgnF*)、aldolase (*LgnG*)、L-GnDH (*LgnH*)、dehydrogenase (*LgnI*)をコードする 9 つの遺伝子からなる *lgn* 遺伝子クラスターに含まれていた。これらの遺伝子群で L-gluconate 以降の代謝を行う可能性が考えられたので、*LgnE*-*I* の各組換え酵素を用いて酵素活性の確認及び反応産物の同定を行った。その結果、L-gluconate 以降の代謝は、*LgnH*/*LgnI* の酸化還元反応による L-gluconate の D-idonate への変換、*LgnE* の脱水反応による D-idonate の 2-keto-3-deoxygalactonate への変換、*LgnF* による 6 位のリン酸化、そして *LgnG* の aldol 開裂反応による pyruvate と D-glyceraldehyde-3-phosphate の生成のステップを経ることが示された。

### 4) 遺伝子破壊を用いた L-glucose 代謝経路の確認

*lgdA*、*lgnE*、*lgnH* および *lgnI* の各遺伝子破壊株を作製したところ、各遺伝子の破壊は代謝経路上、上流

の化合物に対する資化能を失わせたが、下流化合物の資化性には影響を与えなかった。そのため上記のL-glucose代謝経路が43P株内で実際に機能していることが明らかになった。また、*lgdA*破壊が*scyllo*-inositol資化能にも影響を与えたことから、LgdAはL-glucoseのみならず*scyllo*-inositolの資化にも関与することが明らかになった。

#### 5) *lgn*遺伝子群の発現調節機構の解析

*lgn*遺伝子群の上流に、逆向きに転写調節因子をコードする*lgnR*を見出し、LgnRが*lgn*遺伝子群の転写調節を行う可能性を検討した。*lgn*遺伝子群および*lgnR*の発現は、野生株ではL-gluconateおよびD-idonateにより誘導されるが、*lgnR*破壊株では脱抑制されて恒常的に発現すること、*in vitro*でLgnRが*lgn*遺伝子群および*lgnR*自身のプロモーターに結合し、その結合がD-idonateにより解除されることを明らかにした。このことより、LgnRは*lgn*遺伝子群および*lgnR*発現のrepressorとして機能し、D-idonateがinducerとして機能することを明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

従来生物はL-glucoseを代謝できないと考えられていたが、本論文でL-glucose資化能を有する微生物が実際に存在することを明らかにし、その代謝経路を酵素・遺伝子レベルで解明した点は非常に高く評価される上、将来のホモキラリティー研究の発展にも大きな影響を与えるものと考えられる。また、今後同定した酵素の産業界への応用も見込まれる。後半では、研究過程で見出した*lgn*遺伝子群の発現調節機構の解明に成功しており、こちらも高い評価を与えられる。

平成25年5月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。