

氏 名	ふじ 藤	さわ 澤	あゆみ 歩
学位(専攻分野)	博 士	(学 術)	
学 位 記 番 号	博 乙 第 35 号		
学位授与の日付	平成 7 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学 位 論 文 題 目	<i>Bacillus sphaericus</i> ビオチン高生産菌の育種とその無細胞系を用いたデチオビオチンからビオチンへの変換反応に関する研究		
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐		
	教 授 村 上 章	教 授 宗 川 吉 汪	

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、医学的ならびに薬学的に重要な化合物であるビオチンの生化学的工業的生産を目指した研究の結果を記載しており、特に素反応系に関する基礎研究の結果を記載している。

ビオチンはビオチン酵素の補酵素として重要な働きを行うが、炭酸固定、炭酸転移および脱炭酸反応に重要な役割を演じており、脂肪酸、糖ならびにアミノ酸の代謝に深く関与している。多くの微生物がピメリン酸からデチオビオチン (DTB) を介してビオチンを合成するが、ピメリン酸から DTB にいたる反応経路は酵素学的に明らかにされてはいるものの、最終ステップである DTB からビオチンにいたる反応に関してはよくわかっていない。本研究はビオチンの工業生産を最終目標として、*Bacillus sphaericus* ビオチン高生産株の開発とビオチン生合成最終ステップの反応機構の解明を目的として行われた。

本研究では、まず薬剤耐性株を得てビオチン生産能向上を試みており、この結果は第 2 部第 1 章にまとめられている。野生株からビオチンアナログ耐性株を獲得し、これからビオチンフィードバック抑制阻害を解除した変異株を得た。これに *bioB* 発現ベクターを導入した株を得たが、このビオチン蓄積量は $2.5 \mu\text{g biotin} / \text{mg of cells}$ であった。このビオチン抑制解除株からさらに 2 種の薬剤耐性株を得た。一つは細胞壁合成阻害剤 Vancomycin 耐性株であり、この *bioB* 形質転換株のビオチン蓄積量は $5 \mu\text{g biotin} / \text{mg of cells}$ であったが、48-72 時間後に合成が停止することがわかった。もう一方は、電子伝達系阻害剤 (TTFA; 1-(2'-Thenoyl)-3,3,3-trifluoroacetone) 耐性株であるが、この *bioB* 形質転換株は $6 \mu\text{g biotin} / \text{mg of cells}$ を生産した。これはこれまでの報告で最高の値である。TTFA の阻害部位であるコハク酸デヒドロゲナーゼの活性に関しては、耐性獲得前後で差がないことを認めたが、この系ではチトクローム 552 量が増大していた。すなわち、ビオチン生産は電子伝達系と密接に関係するということを見いだした。

第 2 章では、変異株の休止菌体を用いたスクリーニングの結果が記載されている。この系では、アミノ酸がビオチン合成に最も大きな寄与を行うことを見出した。詳細な検討を繰り返した結果、ビオチン生産のための完全合成反応液として、(L-Ala 2.5, L-Arg 1.5, L-His 3.0, L-Ile 2.5, L-Ser 5.5, L-Tyr 0.28, L-Val 2.5, L-Phe 0.25, K_2HPO_4 1.0, MgCl_2 0.017, FeCl_3 0.02 g/l, pH 8.0) を決定した。また S 源としては、特に L-Cys の効果が著しいことを見出しており、数 mM を添加することによって、ビオチン蓄積量が無添加時の 5—6 倍に上昇することを確認した。さらに、TTFA 耐性 *bioB* 形質転換体からビオチン合成酵素を精製した。酵素は分子量 74 kDa の二量体であった。全アミノ酸組成及び N 末アミノ酸配列は、*bioB* 塩基配列から予想される産物のアミノ酸組成、配列と一致した。UV スペクトル測定を行ったところ、蛋白以外の吸収は検出されず、ほとんど金属成分が検出されなかったことから、本蛋白をアポ酵素と推定した。

第3章では、無細胞ビオチン生産系の調製方法を検討した結果を報告している。まず、菌体またはプロトプラストをフレンチプレス破碎することで、再現性良くDTBからビオチン合成活性を持つ無細胞系を得ることに成功した。これはビオチン合成活性を持つ *B. sphaericus* 無細胞系調製を得た初めての報告である。ビオチン合成酵素の所在を確かめるために、野生株と *bioB* または *bioYB* 発現ベクターを TTFA 耐性株に導入して取得した2種類の形質転換株の無細胞抽出液を、超遠心法を用いて、細胞質画分と膜画分に分画した。両方の画分に抗 biotin synthase ウサギ抗血清と反応する蛋白が検出されたが、特に膜画分に高い合成比活性が存在することを明らかにした。種々検討した系の中でも、特に *bioYB* 形質転換体で膜画分中の合成比活性が最高値を示した。*bioY* は *bio* operon 中で *bioB* の直上流に位置する遺伝子であり、産物とビオチン合成の関係は現在のところ不明であるが、塩基配列から疎水性蛋白であると推測され、膜蛋白である可能性が高い。これは、ビオチン合成酵素と電子伝達系とを結ぶ蛋白である可能性もある。本結果はビオチン合成酵素が膜と関与しながらビオチンを合成することを示唆した最初の報告である。

以上のように、本論文は、ビオチンの生化学的工業生産を目指し、今日まで明らかにされていなかったデチオビオチンからビオチンへの生合成に必要な諸因子の詳細な解析の結果をまとめたものである。

論文審査の結果の要旨

藤澤 歩氏の博士論文について詳細な審査を行った。論文は、「*Bacillus sphaericus* ビオチン高生産菌の育種とその無細胞系を用いたデチオビオチンからビオチンへの変換反応に関する研究」という課題であり、3編のレフリー付きの国際的に評価の高い欧文学術雑誌に報告されたものをまとめたものであるが、詳細かつ論理的に記述されている。本論文に記載された研究内容は、上記要旨にまとめたように、医薬品、化粧品のほかに飼料添加物として大量の需要が見込まれているビオチンの工業生産を目指したビオチン高生産菌の育種とその無細胞系を用いたデチオビオチンからビオチンへの変換反応系の解明に関するものであり、今日までまったく明らかにされていなかったデチオビオチンからビオチンへの生化学的変換過程が明らかにされた点を高く評価する。また本論文では、工業生産を目的とするという立場からいかにして高生産能を持った系を確立するかについても詳述されており、今日まで達成できなかった高いビオチン生産能を持った系を獲得したことは興味深く、工業的に重要な知見を多く含むものであると評価する。この研究の中で、本研究で確立された系を用いることにより、さらに詳細なビオチン合成酵素の反応機構の解明がなされ、工業レベルの生産が可能になると考える。

以上、本研究では新しいビオチン生産系確立のための基礎的研究の結果が、詳細かつ論理的に記述されている。記載内容は3編の国際的学術雑誌に申請者を筆頭著者として報告されており、本学の博士号（学術）を授与するに十分値するものと結論する。よって本審査委員会は、藤澤 歩氏の提出された学位申請論文が本学の学位を申請するのに十分な高い程度を持っていると結論する。