

ポリリン酸を利用した新規 ATP 再生系の 構築に関する研究

学位論文内容の要旨

ポリリン酸はリン酸が直鎖状に数個から数千個結合したポリマーであり、自然界において原核生物から高等真核生物に至る様々な生物でその存在が確認されている。ポリリン酸の生体内機能は、生体内エネルギー中間体である ATP、および DNA、RNA を構成するヌクレオチド合成の際のリン酸基の供給源、金属イオンのキレート剤、生体内の pH 安定化のための緩衝作用、ストレス応答遺伝子の発現制御、などがあげられる (Kornberg 1995)。本研究では、ヌクレオチド合成におけるリン酸供給源としてのポリリン酸の役割に注目し、*in vitro* においてポリリン酸をリン酸源として利用する ATP 再生系の構築を目的とした。ATP を含むヌクレオチド 3 リン酸 (NTP) は生体物質の合成に関わるさまざまな酵素反応において必要とされ、その反応を工業的な物質生産に利用する際に必要となる。NTP を随時反応系に添加して物質生産を行うとコストがかさむため、その効率的な再生系が必要不可欠となる。本論文は 5 章から構成され、それぞれの概略は以下の通りである。

第 1 章は序章であり、本研究の背景、目的を明らかにした。

第 2 章では、ATP 再生系を構築する要素である二つの酵素、Polyphosphate-AMP phosphotransferase (PAP) と Polyphosphate kinase (PPK) の生化学的性質およびその調製法について記した。*Myxococcus xanthus* はグラム陰性の桿菌で、菌体内に大量のポリリン酸を蓄積することが知られている。この菌は増殖が定常期に入るとポリリン酸を蓄積しはじめ、それに伴って PAP 活性が上昇する。この PAP 活性は主に菌体破碎物の不溶性画分で見られ、これを界面活性剤で処理することにより PAP を粗精製した。この粗精製した PAP を用いて Polyphosphate-NMP phosphotransferase 活性を調べたところ、AMP 以外にも GMP でもリン酸転移反応が起こることが観察された。また、PAP の生化学的性質は最適 pH は 8.5 で、 Mg^{2+} イオン要求性であり、 NH_4^+ 、および SO_4^{2-} イオンの存在によって活性が上昇した。

PPK については大腸菌の PPK の N 末端にヒスチジンタグが付加された形で発現する組換え DNA を作成し、大量発現、精製を行った。

第 3 章では、PAP と PPK の組み合わせによって、AMP から ATP を再生する各種反応条件の検討を行った。その結果、実際に PAP と PPK によってポリリン酸をリン酸源とした AMP からの ATP 再生が行われることが分かった。また反応系における初期 AMP 濃度、初期ポリリン酸濃度を検討した結果、初期 AMP 濃度は ATP 再生の速度に影響すること、初期ポリリン酸濃度は ATP 再生量に大きく影響することが分かった。

第 4 章では、PAP と PPK による ATP 再生系の応用について検討した。ATP を要求するモデル反応系として、Acetyl-CoA synthase (ACS) により触媒され酢酸と CoA から Acetyl-CoA を合成する反応を選び、PAP と PPK による ATP 再生系と組み合わせる反応を行った。その結果、PAP 活性と PPK 活性が共存する場合でのみ Acetyl-CoA 合成が見られ、PAP と PPK による ATP 再生系により Acetyl-CoA 合成に必要な ATP が合成され ACS の触媒する反応が進行していることが確認できた。また反応系に添加する初期ポリリン酸量の増加により、PAP 活性、PPK 活性に必要な Mg^{2+} イオンがキレートされ ATP 再生効率が低下するため、反応系に添加する Mg^{2+} イオンの量に関する条件検討を行った。その結果、初期ポリリン酸濃度が 30 mM のときの最適 Mg^{2+} イオンは 24 mM であり、初期ポリリン酸濃度の増加に伴い最適 Mg^{2+} イオン濃度も上昇することが示唆された。各種条件検討の結果、PAP と PPK による ATP 再生系を用いて約 10 mM の Acetyl-CoA の合成に成功した。この反応系の初期 AMP 量は 0.25 mM、初期ポリリン酸量は 30 mM であり、ATP はポリリン酸によって約 40 回再生されていることが分かった。また、PAP が GMP をリン酸化する活性も有するという第 2 章の結果と、PPK は NDP とポリリン酸から NTP を合成する NDK 活性を持つという報告 (Kuroda and Kornberg 1997) から PAP と PPK による ATP 再生系は GTP 再生系としても利用できることを示した。その実証実験として、GMP と [^{32}P]ラベルしたポリリン酸を基質として PAP と PPK による反応を行ったところ、[^{32}P]GTP が再生されることが観察され、PAP と PPK による ATP 再生系は GTP 再生系としての利用も可能であることが示唆された。

第 5 章は総括であり、本研究で得られた成果を総括した。

本研究によってポリリン酸をリン酸源とし、PAP と PPK を用いることで AMP からの ATP の再生を行う再生系を構築した。ポリリン酸は現在利用されている ATP 再生系のリン酸源と比較してかなり安価なことから、この ATP 再生系の利用により ATP を必要とする酵素反応を利用した有用物質の工業的生産の低コスト化

が期待される。また、ATP再生だけでなくGTP再生も可能であることも確認し、ポリリン酸を利用したNTP再生系への足がかりを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 教 授 木 下 晋 一
副 査 教 授 上 館 民 夫
副 査 助 教 授 柴 肇 一

学 位 論 文 題 名

ポリリン酸を利用した新規 ATP 再生系の 構築に関する研究

ポリリン酸はリン酸が直鎖状に数個から数千個結合したポリマーであり、自然界において原核生物から高等真核生物に至る様々な生物でその存在が確認されている。ポリリン酸の生体内機能は、生体内エネルギー中間体である ATP、および DNA、RNA を構成するヌクレオチド合成の際のリン酸基の供給源、金属イオンのキレート剤、生体内の pH 安定化のための緩衝作用、ストレス応答遺伝子の発現制御、などがあげられる。本研究では、ヌクレオチド合成におけるリン酸供給源としてのポリリン酸の役割に注目し、*in vitro* においてポリリン酸をリン酸源として利用する ATP 再生系の構築を目的とした。ATP を含むヌクレオチド3リン酸 (NTP) は生体物質の合成に関わるさまざまな酵素反応において必要とされ、その反応を工業的な物質生産に利用する際に必要となる。NTP を随時反応系に添加して物質生産を行うとコストがかさむため、その効率的な再生系が必要不可欠となる。本論文は5章から構成され、それぞれの概略は以下の通りである。

第1章は序章であり、本研究の背景、目的を明らかにした。

第2章では、*P. aeruginosa* の *ppk* 遺伝子と *ppx* 遺伝子の同定とその解析を行った。*ppk* 遺伝子の下流には *ppx* 遺伝子が逆向きにコードされており、それぞれの終端部分は14塩基分重なっていた。*M. xanthus* はグラム陰性の桿菌で、菌体内に大量のポリリン酸を蓄積することが知られている。この蓄積に伴って高まるポリリン酸代謝活性によってポリリン酸から ATP を合成していると考えられた。ATP 再生系を Polyphosphate-AMP phosphotransferase (PAP) と Polyphosphate kinase (PPK) によって構築することを決定し、このふたつの酵素の生化学的性質およびその調製法について記した。PAP 活性は *M. xanthus* の不溶性画分で見られ、これを界面活性剤で処理することにより PAP を精製した。この精製した PAP を用いて

Polyphosphate-NMP phosphotransferase 活性を調べたところ、AMP 以外にも GMP でもリン酸転移反応が起こることが観察された。また、PAP の生化学的性質は最適 pH は 8.5 で、 Mg^{2+} イオン要求性であり、 NH_4^+ 、および SO_4^{2-} イオンの存在によって活性が上昇した。PPK については大腸菌の PPK の N 末端にヒスチジンタグが付加された形で発現する組換え DNA を作成し、大量発現、精製を行った。また、PAP の生化学的性質は最適 pH は中性付近で、 Mg^{2+} イオン要求性であった。この His-tagged PPK を用いて NDK 活性が見られることを確認した。

第 3 章では、PAP と PPK の組み合わせによって、AMP から ATP を合成する各種反応条件の検討を行った。その結果、実際に PAP と PPK によってポリリン酸をリン酸源とした AMP からの ATP 合成が行われることが分かった。また反応系における初期 AMP 濃度、初期ポリリン酸濃度を検討した結果、初期 AMP 濃度は ATP 合成の速度に影響すること、初期ポリリン酸濃度は ATP 合成量に大きく影響することが分かった。

第 4 章では、PAP と PPK による ATP 再生系の応用について検討した。ATP を要求するモデル反応系として、Acetyl-CoA synthase (ACS) により触媒され酢酸と CoA から Acetyl-CoA を合成する反応を選び、PAP と PPK による ATP 再生系と組み合わせて反応を行った。その結果、PAP 活性と PPK 活性が共存する場合でのみ Acetyl-CoA 合成が見られ、PAP と PPK による ATP 再生系により Acetyl-CoA 合成に必要な ATP が合成され ACS の触媒する反応が進行していることが確認できた。また反応系に添加する初期ポリリン酸量の増加により、PAP 活性、PPK 活性に必要な Mg^{2+} イオンがキレートされ ATP 再生効率が低下するため、反応系に添加する Mg^{2+} イオンの量に関する条件検討を行った。その結果、初期ポリリン酸濃度が 30 mM のときの最適 Mg^{2+} イオンは 24 mM であり、初期ポリリン酸濃度の増加に伴い最適 Mg^{2+} イオン濃度も上昇することが示唆された。各種条件検討の結果、PAP と PPK による ATP 再生系を用いて約 10 mM の Acetyl-CoA の合成に成功した。この反応系の初期 AMP 量は 0.25 mM、初期ポリリン酸量は 30 mM であり、ATP はポリリン酸によって約 40 回再生されていることが分かった。また、PAP が GMP をリン酸化する活性も有するという第 2 章の結果と、PPK は NDP とポリリン酸から NTP を合成する NDK 活性を持つという報告から PAP と PPK による ATP 再生系は GTP 再生系としても利用できることを示した。その実証実験として、GMP と $[^{32}P]$ ラベルしたポリリン酸を基質として PAP と PPK による反応を行ったところ、 $[^{32}P]$ GTP が再生されることが観察され、PAP と PPK による ATP 再生系は GTP 再生系としての利用も可能であることが示唆された。

第 5 章は総括であり、本研究で得られた成果を総括した。

これを要するに、著者は本研究によってポリリン酸をリン酸源とし、PAP と PPK を用いることで AMP からの ATP の再生を行う再生系を構築した。ポリリン酸は現在利用されている ATP 再生系のリン酸源と比較してかなり安価なことから、この ATP 再生系の利用により ATP を必要とする酵素反応を利用した有用物質

の工業的生産の低コスト化が期待される。また、ATP再生だけでなくGTP再生も可能であることも確認し、ポリリン酸を利用してのNTP再生系への足がかりを示した。本研究は、ポリリン酸の工業的な利用への方法を示すことで、酵素工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。