



Title	Porphyrin biosynthesis in a Vitamin B12 producer, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> .
Author(s)	橋本, 義輝
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40167
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	はし 橋 本 義 輝
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 1 1 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科醸酵工学専攻
学 位 論 文 名	Porphyrin biosynthesis in a Vitamin B ₁₂ producer, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> . (ビタミン B ₁₂ 生産菌におけるポルフィリン生合成系に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 室岡 義勝 教 授 卜部 格 教 授 小林 昭雄 教 授 吉田 敏臣 教 授 金谷 茂則 教 授 山田 靖宙 教 授 菅 健一 教 授 関 達治 教 授 今中 忠行 教 授 塩谷 捨明 教 授 二井 将光

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ビタミン B₁₂ 生産菌 *Propionibacterium freudenreichii* におけるポルフィリン生合成系に関する研究をまとめたものである。

緒言では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第一章では、テトラピロール生合成の主な前駆体である δ-アミノレブリン酸 (ALA) の生合成経路を明らかにするために、*P. freudenreichii* の染色体遺伝子ライブラリーの作成と大腸菌の ALA 生合成能欠損変異株を用いて ALA 生合成に関与する遺伝子の単離と解析について記述している。単離した遺伝子を *hemL* と同定し、*Propionibacterium* では以前報告されていた C 4 経路ではなく C 5 経路を経て ALA を生合成しているという新知見を得ている。

第二章では、テトラピロール生合成に共通の経路の中で、ALA からポルフォビリノーゲン (PBG) を合成する酵素 ALA dehydratase をコードする遺伝子の単離とその解析について、さらにこの遺伝子を大腸菌内で発現させ、その酵素を精製しその構造についても記述している。単離した遺伝子を *hemB* と同定し、この菌由来のものは分子量 36,000 のサブユニットの 8 量体から構成されていることを示唆している。

第三章では、第一章および第二章で単離、解析した遺伝子が、他のヘム生合成系遺伝子と共にクラスターを形成していることの発見について記述している。*P. freudenreichii* の *hemYHBXPL* クラスターは、テトラピロール生合成系の初期段階の遺伝子と、ヘム生合成系の最終段階の遺伝子が 1 つのクラスターを構成する最初の例であることを発見している。

第四章では、ビタミン B₁₂ 合成へ分岐する酵素、urogen III methyltransferase をコードする遺伝子の単離、解析について、さらに大腸菌内で発現させ、その酵素の諸性質を調べた結果についても記述している。この菌の酵素は urogen III に 2 つのメチル基だけではなく、3 つあるいは 4 つのメチル基を付加する反応も触媒でき、また、urogen I も基質とするという知見を得ている。

最後に、本研究で得られた知見を総括し、嫌気性細菌のビタミン B₁₂ 生産菌におけるポルフィリン生合成系に関する研究の将来の展望について記述している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ビタミンB₁₂の発酵生産および生合成経路の研究に使われてきた嫌気性グラム陽性細菌である *Propionibacterium freudenreichii* のテトラピロール化合物の生合成経路をさらに解明するために、従来までの生化学的手法のほか本菌において初めて遺伝子工学的手法を応用し、遺伝子レベルで研究し、テトラピロール化合物の生合成に関する新たな知見を得ている。得られた結果を要約すると以下の通りである。

- (1) テトラピロール生合成の研究に必要な *P. freudenreichii* の染色体遺伝子ライブラリーを構築している。
- (2) テトラピロール生合成の主な前駆体である δ -アミノレブリン酸 (ALA) の生合成経路を明らかにするために、大腸菌の ALA 生合成能欠損変異株を用いて ALA 生合成に関与する遺伝子を単離、解析し、単離した遺伝子を *hemL* と推定し、*Propionibacterium* では以前報告されていたコハク酸を前駆体とする C 4 経路ではなくグルタミン酸を前駆体とする C 5 経路を経て ALA を生合成しているという新知見を得ている。
- (3) テトラピロール生合成に共通の経路の中で、ALA から PBG を合成する酵素 ALA dehydratase をコードする遺伝子を単離、解析し、この遺伝子を *hemB* と同定している。
- (4) 上記 *hemB* 遺伝子を大腸菌内で発現させ、その生産物である ALA dehydratase を精製し、この菌由来のものは分子量36,000のサブユニットの8量体から構成されていることを示唆している。
- (5) 上記 *hemL* 遺伝子、*hemB* 遺伝子、両方を相補する変異株の解析および8 kb の DNA 塩基配列を決定することにより、他のヘム生合成系遺伝子と共にクラスターを形成していることを発見している。*P. freudenreichii* の *hemYHBXPL* クラスターは、テトラピロール生合成系の初期段階の遺伝子と、ヘム生合成系の最終段階の遺伝子が1つのクラスターを構成する最初の例であることを発見している。
- (6) ビタミンB₁₂合成へ分岐する酵素、urogen III methyltransferase をコードする遺伝子を単離、解析し、単離した遺伝子を *cobA* と同定し、*cbiO* 遺伝子とオペロンを構成していることを明らかにしている。
- (7) 上記 *cobA* 遺伝子を大腸菌内で発現させ、この菌の酵素は基質に2つのメチル基だけではなく、3つあるいは4つ付加する反応も触媒でき、また、urogen I も基質とするという知見を得ている。

以上、本論文においてビタミンB₁₂を生産するプロピオン酸菌において初めて ALA 生合成系を C 5 経路と同定するとともに、ポルフィリン生合成に関わるいくつかの遺伝子を分離し、その位置づけを明確にした。これらの結果はポルフィリン生合成系の基礎知見に貢献するのみならず、ビタミンB₁₂をはじめ有用なポルフィリン化合物の生産に寄与する可能性を示している。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。