

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（学術）	氏名	Gamal Nasser Abdelhady Abdelhamid	
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当			
論文題目 Enzyme engineering of phosphite dehydrogenase and its applications for biotechnology (亜リン酸デヒドロゲナーゼの酵素工学的改変とバイオテクノロジーへの応用)				
論文審査担当者				
主査	准教授	廣田隆一	印	
審査委員	教授	加藤純一	印	
審査委員	教授	中島田豊	印	
審査委員	教授	黒田章夫	印	
〔論文審査の要旨〕 <p>亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) は、亜リン酸 (HPO_3^{2-}) をリン酸 (HPO_4^{2-}) に酸化し、酸化型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) を NADH に還元する酵素である。PtxD による亜リン酸の酸化および NADH 生成は、そのユニークな反応特性から、微生物の選択培養技術、補酵素再生系、さらには生物学的封じ込め技術など、様々なバイオテクノロジーのツールとして利用できることがこれまでに示されてきた。しかしながら、実用化における応用範囲を拡大するために、適用宿主域の拡張および PtxD の基質特異性の改変が望まれている。本博士論文では、これらの応用可能性を拡張するための研究に取り組んだ。</p> <p>第1章では、研究背景の基礎的知見から関連研究分野の最新の動向をまとめており、申請者の研究の目的と位置づけを明確にしている。</p> <p>第2章では、申請者のグループの先行研究によって開発された亜リン酸依存性を利用した生物学的封じ込め技術を <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 (藍藻) へ適用する研究について論じている。本封じ込め技術は、宿主細胞に PtxD と亜リン酸特異的輸送体 (HtxBCDE) を発現させ、さらに内在性リン酸輸送体を破壊することにより実現できるが、これまでは従属栄養細菌である大腸菌で実証されたのみであった。藍藻は光合成により CO_2 を有用物質に変換することができるサステナブルな物質生産の宿主生物として期待されているが、組換え体の屋外利用 (第一種使用) の承認を得ることは非常に困難であるため、本手法のように効果が高い拡散防止技術の開発が望まれている。申請者は、藍藻では <i>Pseudomonas</i> 属細菌由来 HtxBCDE が機能的に発現しないという問題を見出し、亜リン酸輸送体基質結合タンパク質 HtxB のシグナルペプチドを改変することによりこの問題を克服した。これを用いて構成した合成亜リン酸代謝系を藍藻に導入し、2種類の内在性リン酸輸送体を破壊することで、亜リン酸に依存性を示す封じ込め株の作製に成功した。以上の成果により、大腸菌以外のバクテリアにおいても、本生物学的封じ込め手法を適用できる</p>				

ことが示されたとともに、宿主細胞を拡張する際に考慮すべき重要なポイントが明らかにされた。

第3章では、PtxDの基質特異性の改変に関する研究成果を論じている。PtxDは生物学的封じ込めにおける利用のほか、*in vitro*におけるNADH再生酵素としても極めて有用な酵素である。申請者のグループでは、既報の中で最も活性の高いPtxDを土壌細菌*Ralstonia* sp. 4506株から取得しているが、本酵素はNAD⁺を基質として利用しNADP⁺を利用することができない。NADPHはNADH以上に高価であるため、PtxDの基質特異性をNADP⁺に変化させることができれば、さらにPtxDの利用範囲を拡大することが可能である。申請者はPtxDの立体構造モデル解析からNAD⁺結合に関わるアミノ酸を推定し、複数のアミノ酸を変化させた変異体を作製した。作製した変異体の酵素学的性質の生化学的な解析を行った結果、ある変異体が非常に高いNADP⁺利用能を示すことを明らかにした。さらにこのPtxD変異体は、NADP⁺と結合することにより熱耐性・有機溶媒耐性が大きく向上することを見出し、高効率かつ頑強なNADPH再生酵素であることを、モデル物質生産系を用いて実証した。

第4章では、本論文の総括としてPtxDの工学的利用における2つの拡張例の有効性について議論するとともに、その学術的な価値、実用利用の可能性および展望を述べている。

審査委員会は、本論文が学術的および実用的に新規且つ重要な成果を得たと判断し、申請者に博士（学術）を授与するに十分な価値があるものと認めた。

備考 審査の要旨は、1,500字程度とする。