# 新規イノシン－グアノシンキナーゼを用いたイノシン及びグアノシンのリン酸化による核酸系調味料の製造法

川崎　寿

目次

第一章 緒言 ……1

第二章 *Escherichia coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用いた ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化と本酵素の酵素学的解析 ……6

2－1 緒言

2－2 材料と方法

2－3 結果

2－3－1 試薬 ATP をリン酸基供与体としたイノシン及びグアノシンのリン酸化

2－3－2 ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化

2－3－3 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの大量発現と精製

2－3－4 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの性質

2－3－5 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの生成物による阻害

2－3－6 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの最終産物による調節

2－4 考察

第三章 新規イノシンキナーゼ探索法の開発とその探索 ……35

3－1 緒言

3－2 材料と方法

3－3 結果

3－3－1 新規イノシンキナーゼ探索法の開発

3－3－2 新規イノシンキナーゼの探索

3－3－3 *Exiguobacterium acetylicum* 類縁菌におけるイノシンキナーゼの

存在分布

3－4 考察

第四章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製と性質 ……49

4－1 緒言

4－2 材料と方法

4－3 結果

4－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

4－3－2 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの性質

4－4 考察

第五章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングとその解析 ……62

5－1 緒言

5－2 材料と方法

5－3 結果

5－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の取得

5－3－2 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の塩基配列決定とその解析

5－3－3 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの growth phase 依存的発現

5－4 考察

第六章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用いたイノシン及びグアノシンのリン酸化 ……75

6－1 緒言

6－2 材料と方法

6－3 結果

6－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドの構築

6－3－2 ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化

6－4 考察

第七章 総合考察 ……89

引用文献 ……92

謝辞 ……103

# 第一章　緒言

核酸は遺伝物質であり、生命現象の根幹を成す物質である。従って、その構成要素であるモノヌクレオチドの生合成機構は現在の生物の発生初期に形成されたものと考えられる。実際、核酸生合成経路及びその調節機構の基本は、多くの生物種で保存されており、生合成酵素のアミノ酸配列も高度に保存されている。一方、特にサルベージ経路と言われる細胞内外に既に存在する核酸骨格を利用する系や、核酸相互変換系では生物種間で差異が認められる。サルベージ系、核酸相互変換系は、核酸濃度の調節に大きく関与しているが、先述のように核酸生合成経路の基本が共通しており、その全貌が明らかにされていることから、生物間の差異に関する研究は注目されてこなかった。しかし、生物進化の過程で獲得されたのであろうこの差異を理解することは、核酸生合成調節機構、進化、生物の多様性への更なる理解への一助となろう。

DNA や RNA の構成成分であるヌクレオチドの生合成中間体であるイノシン 5'-モノリン酸（5'-IMP, イノシン酸）ナトリウム、グアノシン 5'-モノリン酸（5'-GMP, グアニル酸）ナトリウムは、それぞれ、鰹節のうま味成分（Kuninaka 1996）、椎茸のうま味成分として知られている（Kuninaka 1996）。これらは、昆布のうま味成分であるグルタミン酸ナトリウム（Kuninaka 1996）とのうまみの相乗効果（Kuninaka 1996）が知られており、核酸系調味料として、グルタミン酸ナトリウムと共に広く世界中で利用されている。近年、グルタミン酸受容体と考えられる分子がラット舌において発現していることが報告され（Chaudhari et al. 2000）、うま味感知の分子機構解明の端緒が開かれた。核酸をうま味として認識する分子機構やグルタミン酸ナトリウムと核酸との相乗効果の分子機構解明の手がかりは得られていないが、タンパク質源であるアミノ酸の一種や DNA や RNA 源である核酸に対して嗜好性を示すことは生存にとって合目的性があり、その分子機構解明は大変興味深い。

核酸系調味料の需要は拡大の一途を辿っており、今後も継続した需要増が見込まれていることから、その製造方法についても更なる改善が求められている。イノシン酸の工業的生産法としては、次の2種の方法が知られている。それは、(1)イノシン酸を直接発酵する方法(Teshiba et al. 1984)、(2)発酵生産したイノシンを $POCl_3$ を用いてリン酸化する方法である(Yoshikawa et al. 1969)。グアニル酸の工業的生産法としては、次の2種の方法が知られている。それは、(1)発酵生産したキサンチル酸をグアニル酸合成酵素によりアミノ化する方法(Fujio et al. 1997)、(2)発酵生産したグアノシンを $POCl_3$ を用いてリン酸化する方法である(Yoshikawa et al. 1969)。数量面で、現在主流となっている方法は、イノシン酸の製造においても、グアニル酸の製造においても、発酵生産したヌクレオシドを $POCl_3$ を用いてリン酸化する方法である。これは、ヌクレオシド発酵(Matsui et al. 1982, Matsui et al. 1979)及びヌクレオシドの $POCl_3$ を用いたリン酸化の効率が高いからである。しかし、この方法は、ヌクレオシド発酵用の培養槽とリン酸化用の反応槽が必要であること、リン酸化のために発酵液よりヌクレオシドを分離する必要があることなど、直接発酵する方法や、発酵生産したキサンチル酸をグアニル酸合成酵素によりアミノ化する方法に比較し、工程が複雑であるという短所が存在する。新製法開発の第一段階として、直接発酵に比較し高収率であるイノシン及びグアノシン発酵の利点を生かし、リン酸化設備の簡略化が期待できる酵素的なイノシン及びグアノシンのリン酸化法の開発が望まれている。

近年、サルベージ系酵素の一種である *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し、菌体の持つ ATP 再生反応と共役させてイノシンのリン酸化を行うという新しいイノシン酸製造方法が報告された(Mori et al. 1997)。イノシン－グアノシンキナーゼ(ATP: guanosine 5'-phosphotranferase [EC 2.7.1.73])は、ATP の $\gamma$ 位のリン酸基をイノシン及びグアノシンの 5'位の水酸基に転移する反応を触媒し、5'モノヌクレオチド、すなわち、イノシン酸(5'-IMP)、グアニル酸(5'-GMP)を生成する。

イノシン、グアノシン + ATP → GMP, IMP + ADP

真核細胞には、通常、2種のヌクレオシドキナーゼ、すなわち、アデノシン特異的キナーゼ、ウリジン及びシチジン特異的キナーゼが存在する。原核細胞については報告例が少ないが、真核細胞と同様と推定されている。しかしながら、*Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* にはアデノシンキナーゼは存在せず、代わりにイノシン－グアノシンキナーゼが存在し、この推定に当てはまらない。原核細胞において、プリンヌクレオシドキナーゼ活性についての報告が非常に限定された種に留まっている理由のひとつは、その活性の検出が困難であることと考えられる。生物におけるプリンヌクレオシド利用経路は2種知られている(イノシン及びグアノシンの例を図1に示した)。一方は、プリンヌクレオシドを加リン酸分解し、核酸塩基とリボース 1-リン酸を生成するプリンヌクレオシドフォスフォリラーゼが関与する経路である(図1, 経路 A)。ここで生成したリボース 1-リン酸は、フォスフォリボムターゼによりリボース 5-リン酸に変換された後、リボースリン酸ピロフォスフォキナーゼによって 5-フォスフォリボシル 1-ピロリン酸となり、フォスフォリボシルトランスフェラーゼにより核酸塩基と結合し、プリン核酸が生成する。もう一方の経路では、プリンヌクレオシドキナーゼにより、直接リン酸基が転移され、プリンヌクレオチドが生成する(図1, 経路 B)。すなわち、同一基質より同一生成物を生じる経路が 2 種類存在する。しかも、同一細胞がこれら 2 経路の活性を併せ持つ例が報告されている。従って、プリンヌクレオシドキナーゼ活性検出の酵素源として細胞や粗酵素抽出液などの混合系を用いた場合、いずれの経路によってヌクレオチドが生成したのかを判別する必要がある。また、イノシン－グアノシンキナーゼ活性は微弱であると考えられており、感度の高い検出系が必要である。

本研究では、これらの背景を踏まえ、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し菌体の持つ ATP 再生反応と共役させてイノシンのリン酸化を行うという新しいイノシン酸製造方法(Mori et al. 1997)の実用性を評価した。また、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの酵素学的諸性質を明らかにすることにより、本酵素を利

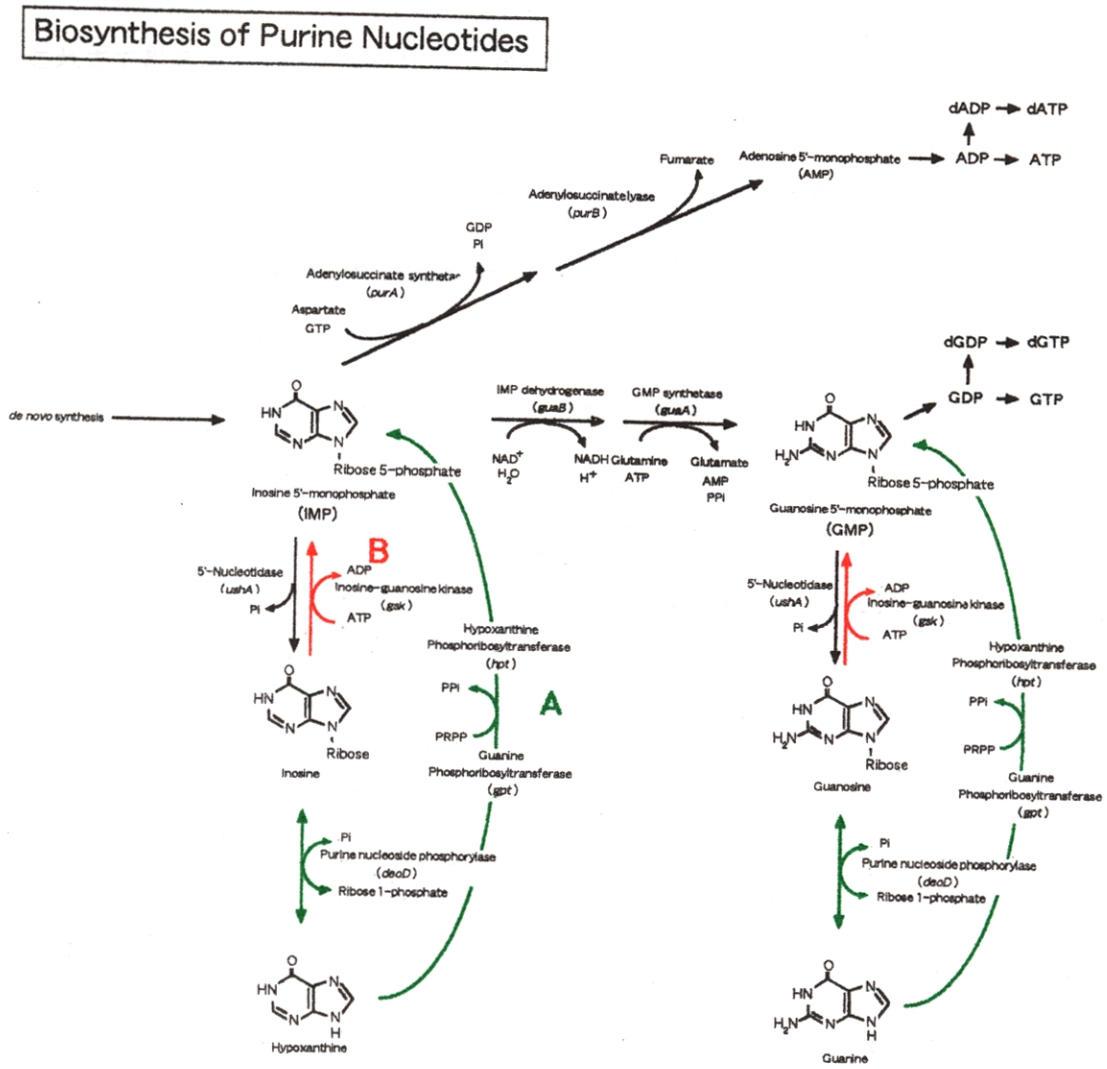


図１　２種のイノシン（グアノシン）利用経路とその周辺の代謝経路

A：イノシン（グアノシン）を加リン酸分解し、核酸塩基とリボース 1-リン酸を生成するプリンヌクレオシドフォスフォリラーゼが関与する経路，B：イノシン（グアノシン）に直接リン酸基が転移される経路

用したヌクレオシドリン酸化法における課題を考察すると共に、*E. coli* における核酸代謝調節機構について新たな知見を得た。さらに、活性の検出が困難であることから、これまで報告が少なく、その存在が稀とされていたイノシン-グアノシンキナーゼ活性の選択的かつ高感度な新規アッセイ系を構築し、自然界より新規な性質を有するイノシン-グアノシンキナーゼを見出し、遺伝子クローニングによる塩基配列、アミノ酸配列解析並びに発現解析、及び近縁種での活性の存在を検討し、イノシン-グアノシンキナーゼの生理的意義、その進化について議論した。更に、この新規な特徴を有するイノシン-グアノシンキナーゼを利用し、従来報告されていなかったグアノシンのリン酸化にも成功した。

## 第二章 *Escherichia coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用いたATP再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化と本酵素の酵素学的解析

### 2－1 緒言

第一章で述べたように、核酸系調味料の需要は拡大の一途を辿っており、今後も継続した需要増が見込まれていることから、その製造方法についても更なる改善が求められている。新製法開発の第一段階として、直接発酵に比較し高収率であるイノシン発酵の利点を生かし、リン酸化設備の簡略化が期待できる酵素的なイノシンリン酸化法の開発が望まれていた。近年、サルベージ系酵素の一種である *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し、菌体の持つATP再生反応と共役させてイノシンのリン酸化を行うという新しいイノシン酸製造方法が報告された(Mori et al. 1997)。

イノシン－グアノシンキナーゼ(ATP: guanosine 5'-phosphotranferase [E.C. 2.7.1.73])は、ATPのγ位のリン酸基をグアノシン及びイノシンの5'位の水酸基に転移する反応を触媒し、5'-モノヌクレオチド、すなわち、イノシン酸(5'-IMP), グアニル酸(5'-GMP)を生成する。

イノシン、グアノシン + ATP → GMP, IMP + ADP

リン酸基供与体として使用するATPを試薬ATPの添加で行う方法は、そのコストから工業的製造法としては成立しない。そこで、生物に備わっているADPからATPを再生する反応と本反応を共役させることが実用面からは重要となる。

このATP再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化反応について検討を行った結果、イノシンのリン酸化には成功したが、グアノシンのリン酸化は認められなかった。そこで、この原因が酵素の特性に起因するのかについて検討を行った。イノシン－グアノシンキナーゼは、これまで精製された例がなく、詳細な解析はなされ

ていなかった。近年、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子(*gsk*)がクローニングされ、*E. coli* にて大量発現させた酵素を用いてその性質の一部については検討が行われた(Harlow et al. 1995, Mori et al. 1995)ものの充分な解析はなされていなかった。また、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、その反応における末端最終生成物であると考えられる GTP により阻害を受けることが報告された(Peterson 1999)が、精製酵素を用いた詳細な解析はなされていなかった。

本章では、以上の背景に基づいて行った、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し、菌体の持つ ATP 再生反応と共役させてイノシン及びグアノシンのリン酸化を行うという新しい核酸系調味料の製造方法(Mori et al. 1997)の評価、及び *Escherichia coli* 由来グアノシン－イノシンキナーゼの大量発現と精製、及び得られた精製酵素を用いて行った酵素の性質についての詳細な解析について述べる。また、その結果明らかとなった本酵素活性の最終産物による調節と、反応速度実験から得られた酵素反応機構について論じる。

## 2－2 材料と方法

### 材料

[$^{14}$C]guanosine、[$^{14}$C]inosine 及び[$^{14}$C]2'-deoxyguanosine は、Moravec 社(Brea, CA, USA)より購入した。

[$\gamma$-$^{32}$P]ATP は Amersham 社(Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom)より購入した。その他のヌクレオシド類、ヌクレオチド類及びアシクロビル(acyclovir; 9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-guanine (ACV))は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA)より購入した。 DEAE-Toyopearl 及び Butyl-Toyopearl は東ソー社より、Superdex 200pg 及び gel filtration calibration kit は Pharmacia 社(Uppsala, Sweden)より購入した。

菌株、培地及びバッファー

イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子高発現菌として、後節に述べる*E. coli*株を使用した。ATP 再生菌としては、工業的に ATP 再生菌として実績のある *Corynebacterium amoniagenes*(Mori et al. 1997, Furuya et al. 1971, Fujio et al. 1997a, 1997b, Nakayama et al. 1973)よりプリンヌクレオシド分解活性弱化株として誘導された ATCC 21477 株(Nakayama et al. 1973)を使用した。*E. coli*の培養には LB 培地を使用し、*C. ammoniagenes*の通常の培養には、CM2G (Miwa et al. 1985)培地を使用した。尚、CM2G 培地の組成は、5 g/l glucose, 10 g/l polypeptone(第五栄養), 10 g/l yeast extract(Difco), 5 g/l NaCl (pH 7.2)である。*C. ammoniagenes*を ATP 再生菌として用いる場合は、前培養培地として、10 g/l polypeptone, 5 g/l beef extract, 5 g/l yeast extract , 2.5 g/l NaCl (pH 7.2)を用い、本培養培地として、150 g/l glucose, 5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 3 g/l $K_2HPO_4$, 0.1 g/l casein hydrated, 7 g/l yeast extract, 10 μg/l biotin, 10 mg/l adenine, 10 mg/l guanine (pH 7.2)を用いた(Mori et al. 1997)。バッファーとしては、以下のものを使用した。Buffer A: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, Buffer B: 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM DTT, 100 mM KCl, 20% (w/v) glycerol

*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌株の構築と培養

*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子(*gsk*)を、*E. coli* W3110 株の染色体 DNA を鋳型として以下の 5'端に制限酵素認識部位を付加したプライマーを用いて PCR により増幅した。使用したプライマーの配列は、

5'-GG<u>CTGCAG</u>CCATGAAATTTCCCGGTAAACG-3'

(下線部は付加した *Pst*I 認識部位)

5'-GG<u>AAGCTT</u>AACGATCCCAGTAAGACTCTTC-3'

(下線部は付加した *Hin*dIII 認識部位)である。PCR 産物を *Ps* I 及び *Hin*dIII にて切断し、pUC18 に連結した。構築したプラスミドの *Bam*HI 認識部位と *Pst*I 認識部位間に化学合成した *E. coli trp* オペロンプロモーターを挿入した。この挿入配列は、プロモーター配列と共に *E. coli trp* オペロンの Shine-Dalgarno 配列を有する。このように構築した *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドを *E. coli* JM109 に導入した。得られた形質転換体を 100 μg/ml のアンピシリンを含有する 50 ml の LB 培地を用い、37℃にて 12 時間培養した。この培養液を 100 μg/ml のアンピシリンを含有する1l の LB 培地に移し、pH を 6.5 に維持しつつ 37℃にて 8 時間、Jar 培養を行った。

ATP 再生菌 *C. ammoniagenes* の培養

保存プレートより CM2G プレートに植菌し、30℃にて一晩培養後、10 ml の前培養培地に植菌し、30℃にて 30 時間、試験管培養を行った。この培養液 5 ml を 50 ml の本培養培地に加え、30℃にて 24 時間、坂口フラスコを用いて培養した(Mori et al. 1997)。得られた培養液より遠心分離して得られた菌体をイノシンまたはグアノシンのリン酸化反応に用いた。

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを大量発現させた菌体より本酵素の精製を行った。特に記述しない限り、操作は全て 4℃にて行った。湿重量 50gの凍結菌体を 100 mM KCl を含む Buffer A に懸濁し、bead-beater(Biospec 社、Bartlesville, OK, USA)にて破砕した。破砕残渣の除去を遠心分離により行った後、50%飽和となるよう硫安を添加し、遠心分離後、沈殿画分を回収した。得られた沈殿を 100 mM KCl を含む Buffer A に懸濁し、予め同 Buffer にて平衡化した DEAE-Toyopearl を用いたカラムクロマトグラフィーによる分画を行った。溶出は、

KCl のリニアグラジェント(100 mM→400 mM)により行った。活性画分に 20%飽和となるよう硫安を添加し、遠心分離により沈殿画分を除去した。得られた上清を、予め 100 mM KCl 及び 20%飽和硫安を含む Buffer A により平衡化された Butyl-Toyopearl を用いたカラムクロマトグラフィーによる分画に供した。硫安のリニアグラジェント(20%→0%)により溶出を行った。活性画分に 50%飽和となるよう硫安を添加し、遠心分離により沈殿の回収を行った。得られた沈殿は、Buffer B に懸濁し、同 Buffer に対して透析を行った。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

前項で得られた精製酵素溶液 200 μl(タンパク質濃度 12 mg/ml)を、予め 300 mM KCl を含有する Buffer A にて平衡化された Superdex 200pg を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、同 Buffer にて溶出を行った。分子量マーカーとして、aldolase, albumin, ovalbumin, chymotripsin A, ribonuclease A を用いた。

試薬 ATP をリン酸基供与体としたイノシンおよびグアノシンリン酸化反応

20 ml の次の組成の反応液にて行った。報告(Mori et al. 1997)に準じ、菌体内酵素と基質(イノシン、グアノシン、ATP、ADP)との接触を促進させることを目的として有機溶媒(xylene)及び界面活性剤(Nymeen S-215 (polyoxyethylene stearylamine, Nippon Oil and Fats, Tokyo, Japan))を添加した。反応液組成は、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ml/l xylene, 4 g/l Nymeen S-215 (polyoxyethylene stearylamine, Nippon Oil and Fats, Tokyo, Japan), 10 g/l phytic acid, 20 g/l ATP 及び 20 g 湿重量/l *E. coli* イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌である。30℃にて攪拌しつつ反応を行った。反応開始後一定時間毎に反応液 pH の測定を行い、4 M NaOH を用いて調整を行った。また、一定時間毎にサンプリングを行い、基質及び生成物の分析

を行った。消費されたATPの補充は、1 M ATP (pH 7.4)の添加により行った。

ATP再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンリン酸化反応

20 mlの次の組成の反応液にて行った。20 g/l $KH_2PO_4$, 30 g/l glucose, 5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ml/l xylene, 4 g/l Nymeen S-215, 10 g/l phytic acid, 10 mM AMP, 20 g 湿重量/l *E. coli* イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌及び 200 g 湿重量/l ATP再生菌。反応は、32 ℃、pH 7.2 、170-175 rpmにて攪拌しつつ行った。反応pHは、4 M NaOHを用い、適宜調整を行った。また、リン酸の定量をフォスファ B－テストワコー(和光純薬)を用いて行い、リン酸化により消費されたリン酸基の補充を$KH_2PO_4$添加により行った(Mori et al. 1997)。

イノシン－グアノシンキナーゼ活性測定法

標準的な反応液としては以下の組成のものを用いた。100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP, 0.02 mM [$^{14}$C]guanosineまたは、0.2 mM [$^{14}$C]inosine及び酵素溶液。反応液中の精製酵素濃度は、グアノシンをリン酸基受容体とした場合には、35.6 ng/l、イノシンをリン酸基受容体とした場合には、3.56 μg/lである。反応液を30℃にて2分間インキュベートし、その2 μlをシリカゲルプレート Art 5715(Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。1-butanol-ethanol-water (2:1:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000にて行った。リン酸化部位の特定には、[$\gamma$-$^{32}$P]ATP をリン酸基供与体として用い、反応液を PEI-cellulose plate (Merck Art 5725)にスポットした後、0.5 M LiCl及び1M formic acidよりなる溶媒にて展開した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmli の方法(Laemmli 1970)に基づき、4-20%のグラジェントゲルを用いて行った。等電点電気泳動は、非変性条件にて pH レンジ 3-10 にて行った。等電点マーカーとして、carbonic anhydrase II, carbonic anhydrase I, lentillectin を使用した。電気泳動後のゲルは、coomassie brilliant blue または銀染色により染色を行った。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Bio-Rad 社(Hercules, CA, USA)の protein assay kit を用い、bovine serum albumin を標準タンパク質として行った。ヌクレオチドを

核酸類の定量

Asahipak GS-220 カラムを用いた HPLC にて核酸類の分離・定量を行った。溶離液は、0.2 M $NaH_2PO_4$ (pH 4.0)を使用し、カラム温度は、50℃、流速は、1.5 ml/min にて分離を行い、波長 254 nm の UV 吸収により検出を行った。IMP は IMP・2Na・7.5$H_2O$ 換算、GMP は GMP・2Na・6.5$H_2O$ 換算で表示した。

アミノ末端アミノ酸配列の決定

精製酵素のアミノ末端アミノ酸配列の決定は、PE biosystems 社(Foster City, CA, USA)の気相プロテインシーケンサー477A を用いて実施した。

## 2－3 結果

### 2－3－1 試薬 ATP をリン酸基供与体としたイノシン及びグアノシンのリン酸化

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌の培養菌体を酵素源とし、試薬 ATP をリン酸供与体としたイノシンのリン酸化反応を行い、そのリン酸化能の評価を

行った。反応は4連で実施し、サンプリングによる反応液の減少を避ける目的で、4反応のうち2反応より2時間毎にサンプリングを行い、核酸類(基質イノシン及びATP,生成物イノシン酸及び ADP)の定量を行った。定量を行った2反応のうち、一つについて結果を図2－1に示す。定量後、測定した2反応の進行がほぼ同等であることを確認した上で、残り2反応の進行も同等であると仮定し、4 反応全てについて消費されたATPの補充を行った。基質イノシンを消費した時点(反応開始後 20 時間)で反応終了とした。反応終了時の反応液容量を測定し、ATP 溶液添加による容量増と反応中の蒸発等に起因する容量減を考慮し、濃度補正を行った。その結果、4.47 mmolのイノシンより4.37 mmolのイノシン酸の生成が確認された(4反応平均値)。この時のモル変換率は、約 97%という非常に高いものであった。これらの結果から、*E. coli* イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌体を用いたイノシンのリン酸化が有用であると考えられた。

イノシンリン酸化と同様の条件にて、試薬 ATP をリン酸供与体としたグアノシンのリン酸化反応についても評価を行った(反応は1連で実施)。その結果、1.41 mmol のグアノシンより反応 4 時間で 1.40 mmol のグアニル酸の生成が確認された(モル転換率 99.3%)。

2－3－2 ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化

前節にて *E. coli* イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌体を用いたイノシン及びグアノシンのリン酸化が有用であったことから、ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化について検討を行った。リン酸基供与体として使用する ATP を試薬ATPの添加で行う方法はそのコストから工業的製造法としては成立しないため、ATP 再生反応との共役の可否は工業的製造法としての評価には必須である。ATP を必要とする酵素反応において *C. ammoniagenes* を ATP 再生菌として工業的に利用する方法が確立されている(Mori et al. 1997, Furuya et al. 1971, Fujio

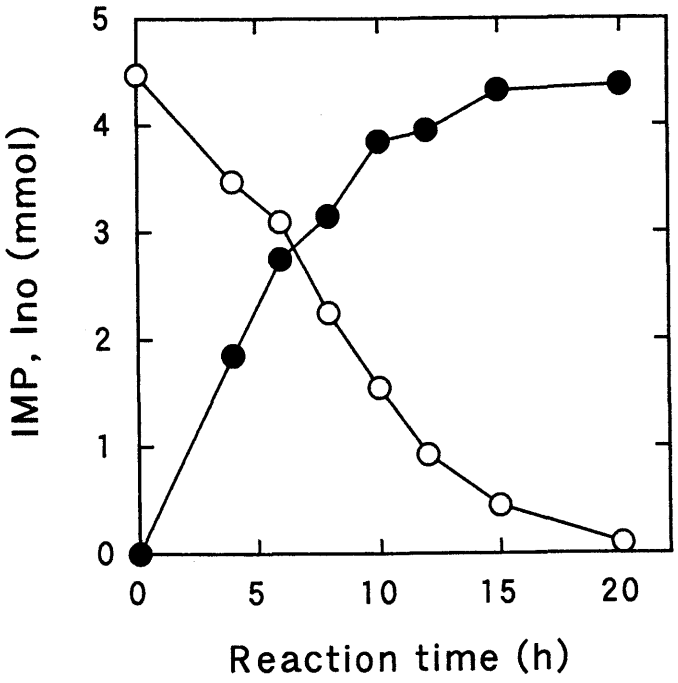


図２－１　試薬ATPをリン酸基供与体とした *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼによるイノシンのリン酸化反応経時変化

4連の反応の内の一つを代表例として示した。基質イノシン量は、4.47 mmolである。

●, IMP; ○, イノシン

et al. 1997a, 1997b)。その概略は、菌体を適度な濃度の界面活性剤や有機溶媒で処理することにより、グルコースを利用しADPからATPを生成する能力を維持したまま、ATP, ADPを膜透過可能にするというものである(Nara et al. 1969, Furuya et al. 1971)。*C. ammoniagenes* ATCC 21477はイノシン生産菌として育種されているため、転換反応の基質であるプリンヌクレオシド分解能が弱化されている(Nakayama et al. 1973)。そこで、この株を本実験におけるATP再生菌として用いた。既報に準じ材料と方法の項に記載した方法にてイノシンまたはグアノシンのリン酸化反応を行ったところ、イノシンを基質とした場合には(図2－2)、1.86 mmol(反応液中 93 mmol/l(懸濁液))のイノシンより0.933 mmol(反応液中 46.7 mmol/l)のイノシン酸の生成が認められた(モル転換率 50.2%)が、グアノシンを基質とした場合には、グアニル酸の生成は認められなかった(データ示さず)。

2－3－3 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの大量発現と精製

材料と方法の項で記述した方法でイノシン－グアノシンキナーゼを大量発現させた*E. coli*菌体からの*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製の概要を表2－1に示した。50 gの湿菌体より300 mgの精製酵素が得られた。精製酵素をSDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び等電点電気泳動に供したところ、いずれの泳動においても、単一バンドが得られ、本酵素の精製が電気泳動的に確認された(図2－3 A, B)。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から算出された本酵素の分子量、約45,000は、塩基配列より推定される分子量、約48,400とよく一致した。一方、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーより算出された非変性状態での分子量は、約 85,000であった。従って、本酵素は、同一サブユニットからなる二量体であると考えられた。等電点電気泳動より算出された本酵素の等電点は、6.0 であった。精製酵素のアミノ末端のアミノ酸配列の決定により、塩基配列より推定されるアミノ酸配列と一致したMKFPGの単一の配列が得られたことから、正常に発現した酵素を均一に精製

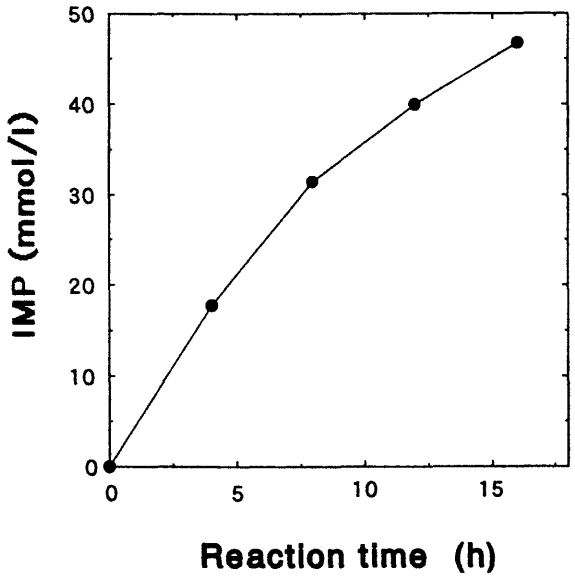


図2－2 ATP再生反応と共役させたイノシンのリン酸化反応

*C. ammoniagenes* ATCC 21477 を ATP 再生菌として、ATP再生反応と共役させたイノシンのリン酸化反応を行った。基質イノシン量は、1.86 mmol(反応液中 93 mmol/l(懸濁液))である。

表２－１ *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

| Purification procedure | Total amount of protein (mg) | Specific activity (μmol $min^{-1}$ (mg of protein)$^{-1}$) | Recovery (%) |
|---|---|---|---|
| Crude extract | 4590 | 13.3 | 100 |
| Ammonium sulfate fractionation | 3440 | 16.8 | 95 |
| DEAE-Toyopearl | 936 | 30.6 | 47 |
| Butyl-Toyopearl | 302 | 40.3 | 20 |

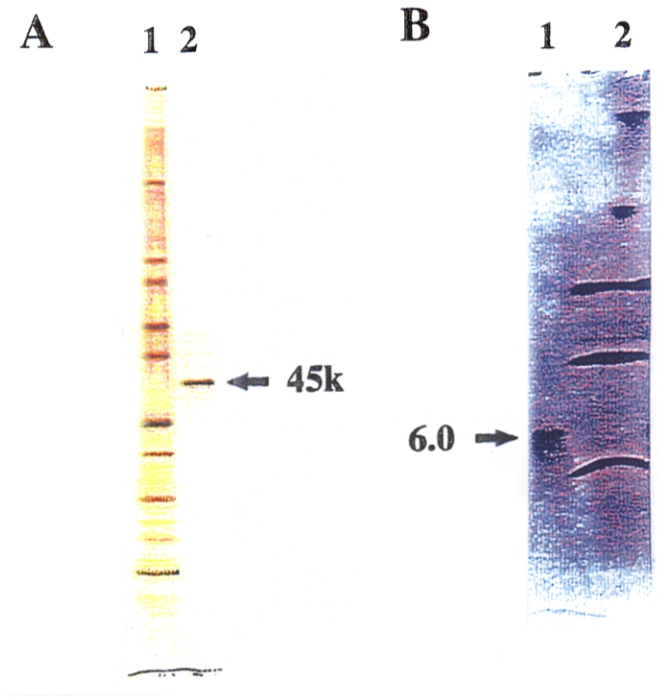


図２－３　精製した *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの SDS-PAGE と IEF

(A)精製した *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの SDS-PAGE

0.54 μgの精製酵素を4-20%グラジエントのポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、銀染色による染色を行った(レーン２)。分子量マーカー(レーン１)は、myosin (200k), β-galactosidase (116k), phosphorylase B (97.4k), bovine serum albumin (66.3k), glutamic dehydrogenase (55.4k), lactate dehydrogenase (36.5k), carbonic anhydrase (31.0k), trypsin inhibitor (21.5k), lysozyme (14.4k), aprotinin (6.0k)を用いた。

(B)精製した *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの IEF

4.7 μgの精製酵素を非変性条件下にてpHレンジ3-10の等電点電気泳動に供し、Coomassie brilliant blue による染色を行った(レーン１)。等電点マーカー(レーン２)は、carbonic anhydrase II (5.9), carbonic anhydrase I (6.6), lentil lectin (7.2, 8.2, 8.8)を用いた。

し得たことが確認された。

### 2－3－4 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの性質

得られた精製酵素を用いて、反応初速度解析を行った。本酵素は、ATP の $\gamma$ 位のリン酸基をグアノシン及びイノシンの 5'位の水酸基に転移する反応を触媒する酵素である。図２－4に示したように、Mg-ATP 濃度を一定にしグアノシン濃度を変化させた場合も、その逆にグアノシン濃度を一定にし、Mg-ATP 濃度を変化させた場合も平行線パターンが得られた。本酵素のような2基質を利用する酵素反応においては、このような平行線パターンは、ping-pong 反応機構に特有のものである(Fromm 1979)。しかしながら、後の項で記述する生成物による阻害パターンからは、本酵素の反応機構は、ping-pong 機構ではなくordered Bi Bi 機構であることが示された。また、反応初速度解析から、本酵素のグアノシン、イノシン、デオキシグアノシン及びATP に対する $K_m$ 値は、それぞれ、7.8 μM, 1.5 mM, 4.3 mM, 0.49 mM と算出された。

リン酸基供与体特異性の検討を行ったところ、ATP に加え、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)、UTP、CTP は基質となるが、GTP、ADP、AMP、及び *p*-ニトロフェニルリン酸(*p*-NPP)は基質とならないことが判明した(表２－２)。[$\gamma$-$^{32}$P]ATP を用い、リン酸基受容特異性の検討を行ったところ、グアノシン、デオキシグアノシン、イノシンに加えて、キサントシンが基質となり得ることが判明したが、リン酸化効率は、イノシンをリン酸基受容体とした場合の約 30%であった。アデノシン、ウリジン、シチジン、及びデオキシチミジンは、リン酸基受容体とはならなかった。さらに、グアニン部分を有するヌクレオシドアナログであるアシクロビルはリン酸基受容体とはならなかった。

ATP 濃度と $Mg^{2+}$濃度が本酵素活性に与える影響を検討した。$Mg^{2+}$濃度が 1 mM の場合、イノシンのリン酸化は認められなかった。種々の ATP 濃度と $Mg^{2+}$濃度が本酵素活性に与える影響を検討したところ、図２－5に示すように、[ATP]/[ $Mg^{2+}$]＝

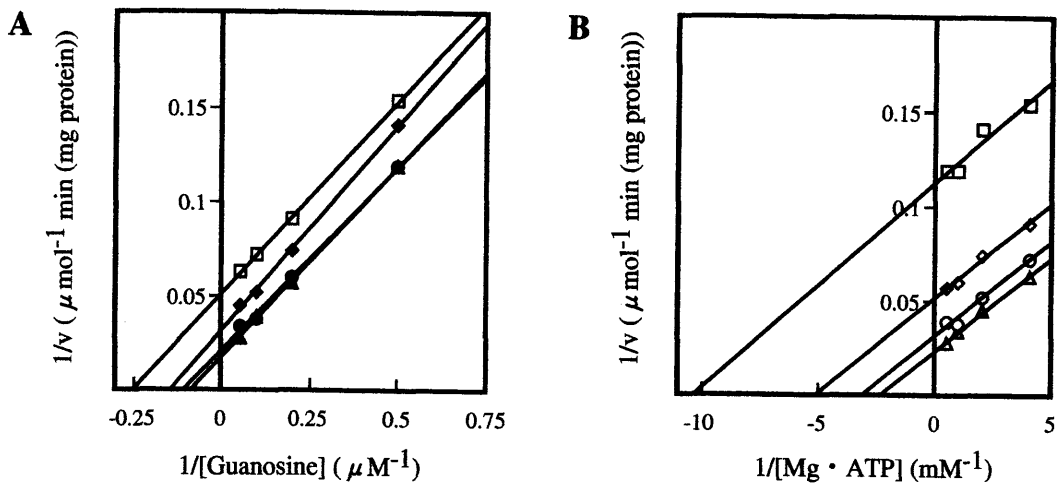


図２－４ 生成物非存在下での反応初速度解析

(A)種々の Mg-ATP 濃度におけるグアノシン濃度変化の反応初速度に及ぼす影響

Mg-ATP 濃度：□, 0.25mM; ◆, 0.5mM; ●, 1.0mM; ▲, 2.0mM

(B)種々のグアノシン濃度における Mg-ATP 濃度変化の反応初速度に及ぼす影響

グアノシン濃度：□, 2μM; ◇, 5μM; ○, 10μM; △, 20μM

表2－2 リン酸基供与体特異性 [a]

| Phosphate Donor[b] | Relative activity (%) |
|---|---|
| None | 0 |
| ATP | 100 |
| GTP | 0 |
| CTP | 19 |
| UTP | 12 |
| dATP | 34 |
| ADP | 0 |
| AMP | 0 |
| p-Nitrophenyl phosphate | 0 |

[a] 35.6 μgの精製酵素を用い、グアノシンをリン酸基受容体とした場合のキナーゼ活性を、材料と方法に示した方法で測定した。

[b] 各化合物は終濃度 5 mM となるよう添加した。

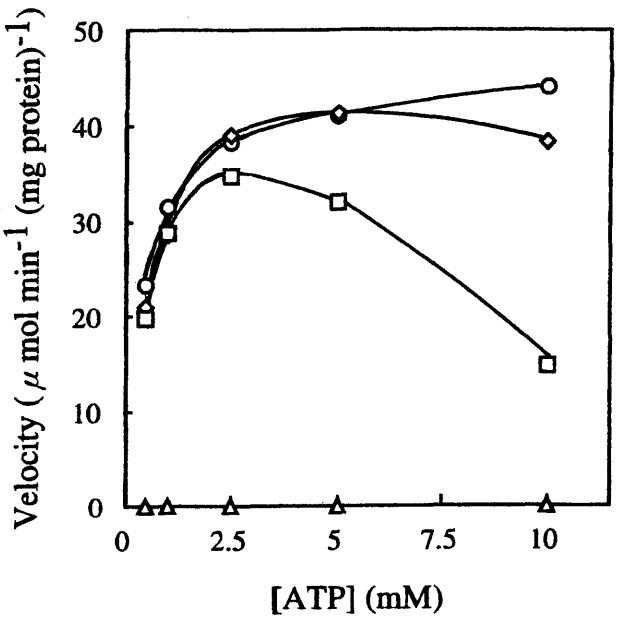


図２－５ 種々の $Mg^{2+}$濃度においてATP濃度変化が *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ活性に及ぼす影響

リン酸基受容体としてイノシンを用いた。$Mg^{2+}$濃度：△, 1mM; □, 5mM; ◇,10mM; ○, 20mM

0.5 の時、最大活性を示すことが観察された。また、この結果より、過剰の $Mg^{2+}$は本酵素活性を阻害しないが、フリーの ATP は本酵素活性を阻害することが判明した。

種々のヌクレオチドが本酵素活性に与える影響の検討を行った。表２－3に示したように僅かではあるものの、CMP、UMP、dTMP などのピリミジン系モノヌクレオチドによって本酵素は活性化された。プリン系ヌクレオチドに関しては、AMP は実施した条件では本酵素活性に影響を及ぼさなかったが、ADP は本酵素活性を阻害し、グアニンヌクレオチド類は強力な阻害効果を有することが明らかとなった。

### ２－３－５ *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの生成物による阻害

反応生成物存在下、次の4条件での反応速度論的解析を行った。すなわち、(1)GMP 存在下、グアノシン濃度一定の時 Mg-ATP 濃度変化が反応初速度に及ぼす影響、(2)GMP 存在下、Mg-ATP 濃度一定の時グアノシン濃度が反応初速度に及ぼす影響、(3)ADP 存在下、グアノシン濃度一定の時 Mg-ATP 濃度変化が反応初速度に及ぼす影響、(4)ADP 存在下 Mg-ATP 濃度一定の時グアノシン濃度が反応初速度に及ぼす影響を観測した。その結果、上記(1)、(3)、(4)の場合、混合型の阻害様式を、(2)の場合、拮抗型阻害様式を示した。これらの結果は、本酵素の反応機構が ping-pong 機構ではなく、グアノシンが酵素に最初に結合し、GMP が最後に解離する ordered Bi Bi 機構であることを示している(図２－６)。これらの結果を表２－4に阻害定数と共にまとめて示した。

### ２－３－６ *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの最終産物による調節

本酵素反応の生成物である GMP は、生体内では GDP や GTP へと変換され核酸やタンパク質の生合成に利用される。この末端最終生成物である GDP や GTP が本酵素活性を強力に阻害することが２－３－４節で明らかとなった。そこで、GDP や GTP による阻害の程度を明らかにする目的で、これらの濃度変化が酵素活性に

表2－3　種々のヌクレオチドが *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ活性に及ぼす影響

| Nucleotide | Relative activity (%) |
|---|---|
| None | 100 |
| AMP | 100 |
| ADP | 88 |
| GMP | 80 |
| GDP | 4 |
| GTP | 12 |
| CMP | 121 |
| UMP | 118 |
| dTMP | 117 |

各ヌクレオチドは終濃度 2 mM となるよう添加した。基質として 5 mM イノシン、5 mM ATP を用いた。また、10 mM $MgCl_2$ 添加にて実施した。

表2－4 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの生成物阻害

| Product | variable substrate | Type of inhibition | Inhibition constant (mM) |
|---|---|---|---|
| GMP | Mg-ATP | Mixed-type | 1.2 |
| GMP | Guanosine | Competitive | 1.0 |
| ADP | Mg-ATP | Mixed-type | 2.3 |
| ADP | Guanosine | Mixed-type | 14 |

グアノシン濃度を変化させた場合のMg-ATP濃度は0.5 mM、Mg-ATP濃度を変化させた場合のグアノシン濃度は5 μMとした。

図２－６　*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの反応機構

及ぼす影響を検討した。その結果、図2－7に示すように、GDP は GTP に比し、より強力な阻害効果を有することが明らかとなった。GDP は生体内では、GTP、デオキシグアノシン二リン酸(dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)の前駆体であることから、グアニンヌクレオチド生合成において、GDP が末端最終生成物としてその調節に関与している可能性は合理的であると考えられる。反応速度論的解析からは、GDP による阻害様式は、グアノシン非飽和条件下において Mg-ATP に対し非拮抗型であった(data not shown)。これに対し、GTP による阻害様式は、グアノシン非飽和条件下において Mg-ATP に対し拮抗型であった(データ示さず)。

## 2－4 考察

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し、菌体の持つ ATP 再生反応と共役させてイノシンのリン酸化を行う新しいイノシン酸製造方法は、工業生産的観点からも有用であることが確認された。一方、同一条件でのグアノシンのリン酸化は認められず、本法によるグアニル酸の製造には大きな課題が存在することが明らかとなった。この原因が酵素特性に起因する可能性を検討する目的で、精製標品を用いて酵素の性質を詳細に解析した。その結果、本酵素は、反応生成物であるグアニル酸の他、GDP や GTP によって強く阻害を受けることが明らかとなり、このことがグアノシンのリン酸化が認められなかった原因のひとつと推定された。この課題の解決には、副生 GDP,GTP の低減、またはこれらによって阻害を受けない酵素の創製または探索が考えられた。

イノシンのリン酸化には成功したが、今回用いた条件では転換収率は約 50%に留まった(図2－2)。反応停止時点においても、反応系内には基質イノシン及びイノシン－グアノシンキナーゼ活性は共に残存していることから、ATP 再生に問題があるものと考えられた。今回、ATP 再生菌体の培養をフラスコで行い培養時の pH 調整を

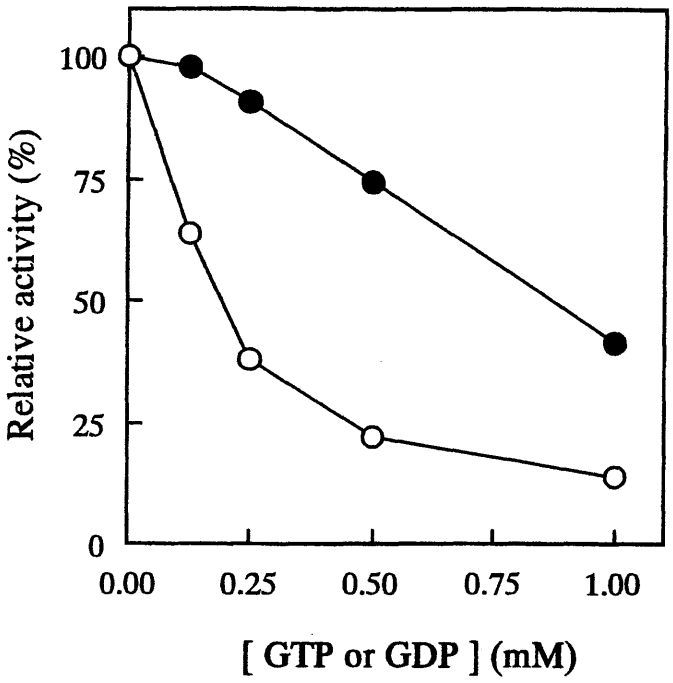


図２－７ *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの最終産物による阻害

36 μMのグアノシンをリン酸基受容体とし、最終産物無添加での活性を 100%とした場合の相対活性を示した。●, GTP; ○, GDP

行わなかったために培養終了時の培養液 pH が 5 程度まで低下しており、このことが ATP 再生活性に影響を及ぼした可能性が考えられた。今後、pH 制御培養を行った菌体を用いることによって収率向上が期待される。

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼのリン酸基受容体に対する $K_m$ 値は、イノシンに対しては 1.5 mM、グアノシンに対しては 7.8 μM であり、生体内での本酵素の基質はグアノシンであると考えられる。従って、工業的生産の見地からはイノシンのリン酸化のみ報告されているものの(Mori et al. 1997)、本法はグアノシンのリン酸化にも適用可能なものと考えられた。実際、*E. coli* イノシン－グアノシンキナーゼ高発現菌体を酵素源とした試薬 ATP をリン酸基供与体としたグアノシンリン酸化反応は速やかに進行した。しかしながら、ATP 再生反応と共役させたグアノシンのリン酸化反応は進行せず、本法によってグアニル酸の製造を行うためには大きな改善が必要であることが判明した。この原因としては、ATP 再生反応との共役反応の場合、反応液中に ATP 再生菌として用いた大量の菌体(菌体由来酵素群)と ATP とが存在することから、生成したグアニル酸がさらにリン酸化され、GDP や GTP が生成し、これらが *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを阻害している可能性が考えられた。これに対し、イノシンのリン酸化の場合は、生成したイノシン酸の代謝には ATP 再生反応系では供給されない基質や補酵素(アデニンヌクレオチド方向へはアスパラギン酸と GTP、グアニンヌクレオチド方向へは $NAD^+$)を必要とすることから、生成イノシン酸の代謝はほとんど進行せず、この目的産物を著量蓄積することが可能なのであろう。今回用いた分析系では、GDP や GTP と近接したリテンションタイムを持つ多数のピークの中から GDP、GTP のピークを同定するには至らず、この仮説の検証は今後の課題である。GDP、GTP による *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの調節は、核酸代謝調節観点からは合目的性があり、非常に興味深い機構であるが、本法のグアニル酸製造への適用には大きな障壁となる。

本法のグアニル酸製造への適用には、グアニル酸の GDP への変換経路の弱化

が有効と考えられるが、この経路は GDP 生成の唯一の経路であり生育に必須であること、また、培地中ヌクレオチドは菌体外フォスファターゼまたはヌクレオチダーゼによって脱リン酸化されヌクレオシドとして菌体内に取り込まれることから、この経路の完全欠失株を取得すること、及び栄養要求変異株として取得することは不可能である。そこで、温度感受性変異株のような条件致死変異株としての取得と利用が考えられるが、併せて、GDP、GTP 等による阻害を受けないイノシン－グアノシンキナーゼの探索あるいは改変も有効と考えられる。

*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを *E. coli* にて大量生産させることによって、50 g の湿菌体より 300 mg の酵素を精製することができた。精製過程での活性回収率が約 20%、タンパク質回収率が約 6.5%であることから、本酵素の発現量は、菌体総タンパク質の約 30%に達したものと考えられた。精製した酵素標品は、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び等電点電気泳動にて単一バンドを形成したこと、及びアミノ末端アミノ酸配列決定において単一の配列を示したことから、単一タンパク質からなるものと考えられた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により算出された分子量（約 45,000）及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより算出された分子量（約 85,000）より、本酵素は同一サブユニットよりなる二量体であると考えられた。

グアノシン、デオキシグアノシン、イノシン、及びキサントシンはリン酸基受容体となるが、アデノシン、シチジン、ウリジン、デオキシチミジンはリン酸基受容体とならないことから、プリン塩基の 6 位の水酸基が本酵素の基質認識に必須であると考えられた。また、グアノシン、デオキシグアノシン、イノシンに対する $K_m$ 値が大きく異なることより、リボース部分の 2'位の水酸基、及び、プリン塩基の 2 位のアミノ基が本酵素と相互作用しているものと考えられた。さらに、グアニン残基構造を有するヌクレオシドアナログであるアシクロビルはリン酸基受容体とならないことからも、ヌクレオシドのリボース部分が活性発現に重要な要素であることが示された。以上のことから、イノシン－グアノシンキナーゼの *in vivo* での基質は、グアノシンであると考えられた。

ATP 濃度と $Mg^{2+}$濃度が本酵素活性に与える影響を検討したところ、$Mg^{2+}$濃度が 1 mM の場合、イノシンのリン酸化は認められなかった。種々の ATP 濃度と $Mg^{2+}$濃度が本酵素活性に与える影響を検討したところ、[ATP]/[ $Mg^{2+}$]＝0.5 の時、最大活性を示すことが観察された。この時、ATP と $Mg^{2+}$の解離定数より、ほとんど全ての ATP は $Mg^{2+}$と複合体を形成しているものと考えられるが、ATP 濃度一定の下、$Mg^{2+}$濃度を増加させた場合、ATP と複合体を形成しない過剰の $Mg^{2+}$は、酵素活性を阻害しなかった。このことは、過剰の $Mg^{2+}$によって阻害を受けることが報告されている植物ミトコンドリア由来イノシン－グアノシンキナーゼ(Combes et al. 1989)や複数のアデノシンキナーゼ(Palella et al. 1980, Chang et al. 1983, Rotllan et al. 1985, Andres et al. 1979)とは対照的である。この相違の原因は明らかではないが、本研究により得られた結果は、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼが、Mg-ATP 複合体を基質とすること、及び ATP との複合体形成以外に $Mg^{2+}$を活性発現に必要とすることを示している。

CMP、UMP、dTMP などのピリミジン系ノヌクレオチドによって本酵素は活性化された。プリン系ヌクレオチドに関しては、AMP は実施した条件では本酵素活性に影響を及ぼさなかったが、ADP は本酵素活性を阻害し、特に本酵素反応における末端最終生成物であるグアニンヌクレオチドは強力な阻害効果を有することが明らかとなった。従って、本酵素は、菌体内ヌクレオチドプールによってその活性が調節され、菌体内ヌクレオチドプールの調節に関与していることが示唆された。

反応生成物非存在下での反応初速度解析からは、本酵素の反応機構は、ping-pong 機構であることが示唆された(Fromm 1979)が、反応生成物存在下での反応初速度解析からは、本酵素の反応機構は、ordered Bi Bi 機構であることが示された。このような現象は、反応速度式からも説明可能である。すなわち、ordered Bi Bi 反応式において最初に結合する基質の解離定数が他の定数に比し非常に小さく無視できる場合、見かけ上 ping-pong 機構の反応式となる(Fromm et al. 1968)。

実際、過去にもこのような例は複数報告されている(Fromm et al. 1962, Smith et al. 1969, Mannervik 1973, Minouni et al. 1994)。本酵素の場合、反応生成物存在下での反応初速度解析結果は、明確にordered Bi Bi機構を示したこと、最初に酵素と結合する基質であるグアノシンの $K_m$ 値がμM オーダーと他の基質のそれと比較して非常に小さく、従って、反応速度式もこの現象を表していることから、本酵素の反応機構は、ordered Bi Bi 機構であると考えられる。

本酵素の反応機構は、ordered Bi Bi機構であることから、本酵素は、リン酸基受容体結合部位とリン酸基供与体結合部位の2つの基質結合部位を持つものと考えられた。反応生成物存在条件下での反応初速度解析結果は、4種実験条件の内、3種の条件で混合型の阻害様式を示したが、本酵素の基質及び生成物は、その構造が類似しているため、それぞれが本来の結合部位とは異なる結合部位に結合することが考えられ、その結果、このような実験結果が得られたものと考えられた。

プリンヌクレオシドキナーゼの反応機構については、由来の異なる酵素を用いてping-pong 機構(Chang et al.1983, Miller et al. 1991)、ordered Bi Bi 機構(Rotllan et al. 1985,Minouni et al. 1994, Hawkins et al. 1987, Bhaunik et al. 1988, Henderson et al. 1972, Ikeda et al.1986)、random Bi Bi 機構(Park et al. 1995, Ikeda et al.1986)と様々な報告がなされており、酵素進化の観点からも興味深い。しかしながら、先に述べたように、本酵素の2つの基質と2つの生成物は互いに類似の構造を有することから、反応速度実験の解析には困難な面があり、そのことが多くの異なる報告の原因となっている可能性も否定できない。

イノシン－グアノシンキナーゼは、アミノ酸配列の相同性解析から、リボキナーゼファミリーのメンバーであることが提唱されている(Bork et al. 1993)。近年、*E. coli* 由来リボキナーゼのX線結晶構造解析結果が報告された(Sigrell et al. 1998)。この結果、リボキナーゼは、リン酸基受容体であるリボース結合部位とリン酸基供与体であるATP 結合部位の2つの基質結合部位を有することが明らかとなった。さらに、最

近、ヒト由来アデノシンキナーゼの X 線結晶構造解析結果が報告された(Mathews et al. 1998)。ヒト由来アデノシンキナーゼは、*E. coli* 由来リボキナーゼとのアミノ酸配列上の相同性は 22%と低いものの、その立体構造は *E. coli* 由来リボキナーゼと非常に類似しており、リン酸基受容体結合部位とリン酸基供与体結合部位の2つの基質結合部位を有することが明らかとなった。これまでに報告されている全てのアデノシンキナーゼ、リボキナーゼ、フルクトキナーゼ、デオキシグルコキナーゼ、グアノシンキナーゼ(*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼを含む)には、共通に存在する配列、DT(A,S,P)T(N,I)G(A)AGD が見出されており、立体構造が明らかとなった2つの糖キナーゼにおいてもこの配列は保存されている。従って、本研究の対象である *E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼも、ヒト由来アデノシンキナーゼ、*E. coli*由来リボキナーゼと類似した立体構造をとり、リン酸基受容体結合部位とリン酸基供与体結合部位の2つの基質結合部位を有している可能性が高い。このことは、本研究での反応速度論解析から示された、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼが、リン酸基受容体結合部位、リン酸基供与体結合部位の2つの結合部位を有し、反応過程で酵素・リン酸基受容体・リン酸基供与体より成る複合体を形成することとよく一致している。

植物ミトコンドリア由来イノシン－グアノシンキナーゼ(Combes et al. 1989)、哺乳類ミトコンドリア由来デオキシグアノシンキナーゼ(Park et al. 1995)、*Bacillus subtilis* 由来デオキシアデノシンキナーゼ(Mφllgaard 1980)は、それぞれ対応する最終生成物であるヌクレオチド三リン酸によって阻害を受けることが報告されている。ごく最近、粗酵素抽出液を用い *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼが GTP によって阻害を受けることが示された(Peterson 1999)。本研究では、精製酵素を用いて *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼが GTP により阻害を受けることを証明した。また、GDP が GTP よりも強力な阻害効果を示すことを明らかにした。GDP は生体内では、GTP、デオキシグアノシン二リン酸(dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸

(dGTP)の前駆体であることから、グアニンヌクレオチド生合成において、GDP が末端最終生成物としてその調節に関与している可能性は合理的であると考えられる。1 mM GDP 存在下では、本酵素活性は、非存在下での約 14%に低下する。この 1 mM という GDP 濃度は、*E. coli* 内で生理的に充分あり得る濃度である(Bochner et al. 1982)ことからも、本酵素が *E. coli* 内で調節を受け、菌体内ヌクレオチドプールの制御に関与している可能性は充分にあるものと考えられる。

## 第三章 新規イノシンキナーゼ探索法の開発とその探索

### 3－1 緒言

第二章で述べたように *E.coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用し ATP 再生反応と共役させたイノシンのリン酸化によるイノシン酸の製造方法は工業的観点からも有用と考えられたが、グアノシンを基質とした場合にはリン酸化が認められなかった。この原因として反応副生物による酵素の阻害が考えられた。この課題の解決策として、酵素特性の改善と反応副生物の低減が考えられる。しかしながら、第二章の考察で述べたように、反応副生物の低減は困難と考えられたため、酵素特性の改善により課題の解決を図ることとした。酵素特性の改善策としては、既存酵素の変異による改良と目的の特性を持つ新規酵素の探索が考えられるが、ここでは新規酵素の探索による課題解決を図ることとした。その理由は、第一章で述べたように、原核生物におけるプリンヌクレオシドキナーゼに関する報告は非常に限定された種に留まっているため、その生理機能や種による存在分布についての知見が充分でないことから、新規酵素の探索を行うことによって、核酸製造に有用な酵素を得るばかりでなく、これらについての新たな知見が得られると考えたからである。

プリンヌクレオシドキナーゼ活性は、真核細胞には広く認められている。アデノシンキナーゼは、哺乳類には豊富に存在し(Anderson 1973, Caputto 1951)、一部のカビや植物においてもその活性が検出されている(Magill et al. 1982, Chen et al. 1977, Schwartzenberg et al. 1998)。デオキシグアノシンキナーゼは、ミトコンドリアにその存在が報告されている(Meyers et al. 1976, Wang et al. 1996)。しかし、原核細胞におけるプリンヌクレオシドキナーゼの存在に関する報告は以下に述べるように限定された範囲に留まっているのが現状である。イノシン－グアノシンキナーゼ活性が、*Escherichia coli*(Tomisek et al. 1965, Jochimsen et al. 1975, Harlow et

al. 1995, Hove-Jensen et al. 1989, Mori et al. 1995), *Salmonella typhimurium*(Zimmerman et al. 1964), *Streptococcus faecalis*(Brockman 1963), *Spirulina platensis*(Ipata et al. 1995)に認められており、アデノシンキナーゼ活性が、*Bacillus cereus* に存在することが示唆されている(Ipata et al. 1985)。デオキシアデノシンキナーゼ活性が、*Bacillus subtilis, Bacillus megaterium,* 及び *Bacillus acidophilus*に存在することが見出されており、デオキシグアノシンキナーゼ活性が *Bacillus megaterium,* 及び *Bacillus acidophilus* に存在することが報告されている(Mφllgaard 1980, Wachsman et al. 1971, Durham et al. 1971)。

原核生物において、プリンヌクレオシドキナーゼ活性についての報告が限定された種に留まっている理由のひとつは、その活性を検出することが困難であるためと考えられる(Anderson 1973)。活性検出を困難にしている原因は、第一章でも述べた通り、プリンヌクレオシド利用経路が2種存在し、同一細胞が両経路を併せ持つ場合があること(Mφllgaard 1980, Hammer-Jespersen et al. 1971, Jensen 1978)及びプリンヌクレオシドキナーゼ活性が微弱であることである(Hove-Jensen et al. 1989)。2 種存在するプリンヌクレオシド利用経路の一方は、プリンヌクレオシドを加リン酸分解し、対応する核酸塩基とリボース 1-リン酸を生成するプリンヌクレオシドフォスフォリラーゼが関与する経路である。ここで生成したリボース 1-リン酸は、フォスフォリボムターゼによりリボース 5-リン酸に変換された後、リボースリン酸ピロフォスフォキナーゼによって 5-フォスフォリボシル 1-ピロリン酸となり、フォスフォリボシルトランスフェラーゼにより核酸塩基と結合し、プリン核酸が生成する。もう一方の経路では、プリンヌクレオシドキナーゼにより、直接リン酸基が転移され、プリンヌクレオチドが生成する。従来の活性測定法は、ラベルされたヌクレオシドのヌクレオチドへの取り込みを測定するものであり、経路の判別のためには、酵素を部分精製するか、一方の活性が欠失した変異株を使用する必要があった(Anderson 1973)。

本章では、上記のプリンヌクレオシドキナーゼ活性を検出する際の課題を克服し、細胞や粗酵素抽出液などの混合系を用いた場合でも微弱な活性を簡便に判定することが可能なプリンヌクレオシドキナーゼ活性のスクリーニング方法について述べる。また、この方法を用いて、実際にイノシンキナーゼ活性のスクリーニングを行い、その活性を検出したことを報告する。さらに、活性を検出した菌株の類縁菌株についても活性の有無を検討し、その分布について論じる。

## 3－2 材料と方法

### 材料

[$^{14}$C]inosine は、Moravec 社(Brea, CA, USA)より購入した。ATP 及び AMP は Sigma 社(St. Louis, MO, USA)より購入した。

### 菌株及び培地

イノシンキナーゼのスクリーニングには、表３－１に記載した菌株を用いた。*Bacillus megaterium*と*Bacillus alcalophilus*の培養には、それぞれ、Nutrient broth (pH 6.8)、Nutrient broth (pH 8.0)を使用した。*Bacillus pasteurii*の培養には、$NH_4$-YE 培地(ATCC medium number 1376, 20 g/l yeast extract, 10 g/l $(NH_4)_2SO_4$ in Tris-HCl (pH 9.0))を用いた。その他の菌株の培養には、CM2G(Miwa et al. 1985)培地(10 g/l yeast extract, 10 g/l polypeptone, 5 g/l NaCl, 5g/l glucose)を使用した。但し、好アルカリ菌の培養の際は、1% $Na_2CO_3$を添加した。

### 粗酵素抽出液の調製法

各菌株を上記組成の寒天培地にて 30℃にて 24 時間培養した後、同一組成の

## 表3－1 イノシンキナーゼ活性のスクリーングに用いた菌株

| Strain | | Strain | |
|---|---|---|---|
| *Bacillus alcalophilus* | ATCC 27647 | *Corynebacterium alkanum* | ATCC 21194 |
| *Bacillus badius* | ATCC 14574 | *Corynebacterium ammoniagenes* | ATCC 6871 |
| *Bacillus coaagulans* | ATCC 7050 | *Corynebacterium ammoniagenes* | ATCC 6872 |
| *Bacillus megaterium* | ATCC 14581 | *Corynebacterium amycolatum* | JFO 15207 |
| *Bacillus subtilis* | ATCC 6051 | *Corynebacterium callunae* | ATCC 15991 |
| *Bacillus stearothermophilus* | ATCC 7953 | *Corynebacterium equi* | IAM 1038 |
| *Bacillus stearothermophilus* | ATCC 12016 | *Corynebacterium fasciens* | IAM 1079 |
| *Bacillus stearothermophilus* | ATCC 12980 | *Corynebacterium flaccumfaciens* | ATCC 6887 |
| *Brevibacterium acetylicum* | ATCC 953 | *Corynebacterium flaccumfaciens* | ATCC 7392 |
| *Brevibacterium albidum* | ATCC 15831 | *Corynebacterium flavescens* | ATCC 10340 |
| *Brevibacterium butanicum* | ATCC 21195 | *Corynebacterium glutamicum* | ATCC 13059 |
| *Brevibacterium casei* | IFO 14812 | *Corynebacterium glutamicum* | ATCC 13655 |
| *Brevibacterium citreum* | IFO 12677 | *Corynebacterium glutamicum* | ATCC 13826 |
| *Brevibacterium epidermidis* | IFO 14811 | *Corynebacterium glutamicum* | ATCC 13869 |
| *Brevibacterium frigoritolerans* | ATCC 25097 | *Corynebacterium glutamicum* | ATCC 15990 |
| *Brevibacterium halotolerans* | ATCC 25096 | *Corynebacterium glycinophilum* | ATCC 21341 |
| *Brevibacterium helvolum* | IAM 1637 | *Corynebacterium herculis* | ATCC 13868 |
| *Brevibacterium immariophilium* | ATCC 13665 | *Corynebacterium hoagii* | IAM 1117 |
| *Brevibacterium impariale* | IAM 1654 | *Corynebacterium hydrocarboclastus* | IAM 1642 |
| *Brevibacterium incertum* | ATCC 8363 | *Corynebacterium insidiosum* | ATCC 10253 |
| *Brevibacterium iodinum* | IFO 15230 | *Corynebacterium jeikeium* | ATCC 43473 |
| *Brevibacterium ketoglutamicum* | ATCC 15587 | *Corynebacterium kutsscheri* | ATCC 15677 |
| *Brevibacterium ketoglutamicum* | ATCC 15588 | *Corynebacterium liquefaciens* | ATCC 14929 |
| *Brevibacterium luteum* | IFO 12676 | *Corynebacterium matruchotii* | ATCC 14266 |
| *Brevibacterium lyticum* | ATCC 15921 | *Corynebacterium minutissimum* | ATCC 23348 |
| *Brevibacterium parafinoliticum* | ATCC 21195 | *Corynebacterium mycetoides* | ATCC 43995 |
| *Brevibacterium pusilium* | IFO 12674 | *Corynebacterium paurometabolum* | ATCC 15530 |
| *Brevibacterium roseum* | ATCC 13825 | *Corynebacterium pilosum* | ATCC 29592 |
| *Brevibacterium sacchrolyticum* | ATCC 14066 | *Corynebacterium pseudodiphtheritic* | ATCC 10700 |
| *Brevibacterium stationis* | IFO 12144 | *Corynebacterium renale* | ATCC 19412 |
| *Corynebacterium accolens* | ATCC 49725 | *Corynebacterium striatum* | ATCC 6940 |
| *Corynebacterium acetoacidophilum* | ATCC 13870 | *Corynebacterium variabilis* | ATCC 15753 |
| *Corynebacterium acetoacidophilum* | ATCC 21407 | *Corynebacterium vitarumen* | IFO 12143 |
| *Corynebacterium acetoglutamicum* | ATCC 15806 | *Corynebacterium xerosis* | ATCC 373 |
| *Corynebacterium aquaticum* | IFO 12154 | *Corynebacterium sp.* | ATCC 21084 |

寒天培地に塗布し、30℃にて 24 時間培養した。1/4 プレートの菌体を掻き取り、0.9% (w/v) NaCl にて 2 度洗浄を行った。菌体を 2 ml の buffer(100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 20% (w/v) glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁し、超音波により破砕を行った。破砕残渣を遠心分離により除去した後、PD-10 ゲルろ過カラム(Pharmacia 社、Uppsala, Sweden)を用い、低分子物質の除去を行ったものを粗酵素抽出液として使用した。

酵素活性測定法

反応容量は 50 μlで行い、以下の組成の反応液を用いた。100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$, 1 mM ATP, 0.2 mM [8-$^{14}$C]inosine 及び 5 μl 粗酵素抽出液。必要に応じ、2 mM または 4 mM のヒポキサンチンを添加した。反応液を 30℃にて 10 分間インキュベートし、その 2 μl をシリカゲルプレート Art 5715(Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。1-butanol-ethanol-water (2:1:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000 にて行った。リン酸化部位の特定の際には、展開溶媒として 1-propanol-$NH_4OH$-water(20:15:3(容量比))を用いた。

## 3－3 結果

### 3－3－1 新規イノシンキナーゼ探索法の開発

本章緒言で述べたように、プリンヌクレオシドの利用経路は 2 種類存在し(図3－1)、同一細胞がその両方を併せ持つ例も報告されている(Mφllgaard 1980, Hammer-Jespersen et al. 1971, Jensen 1978)。従って、細胞や粗酵素抽出液などの混合系を用いた場合、いずれの経路を経由してヌクレオチドが生成したのかを判別する必要が生じる。また、イノシン－グアノシンキナーゼ活性は微弱であると

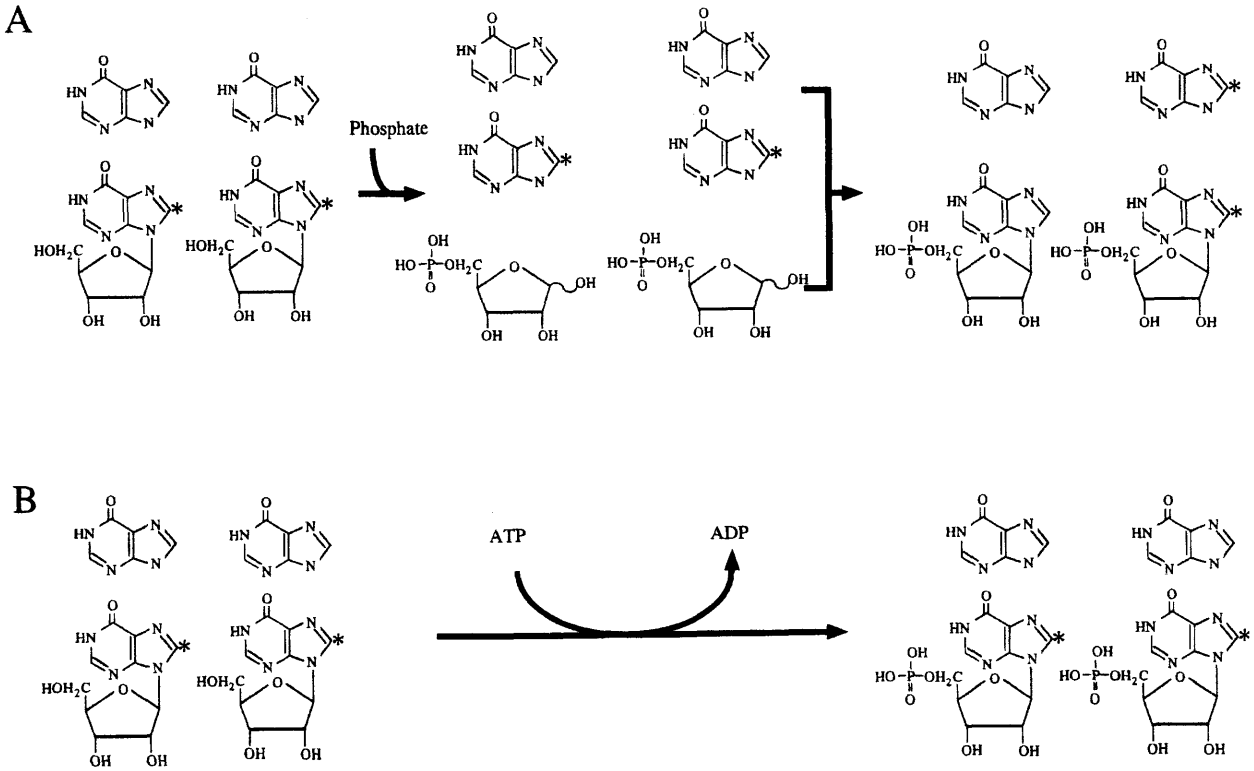


図３－１　プリンヌクレオシドキナーゼ特異的スクリーニング系の概略

Ａ：　ヌクレオシドの直接リン酸化によらないヌクレオチドの生成

Ｂ：　ヌクレオシドの直接リン酸化によるヌクレオチドの生成

ヌクレオシドの直接リン酸化を検出するために、核酸塩基のみがラベルされたヌクレオシドをリン酸基受容体として用いる。直接リン酸化によらない経路でヌクレオチドが生成した場合、ラベルされていない塩基の添加によって、ラベルされたヌクレオチドは希釈されるが（Ａ）、直接リン酸化によりヌクレオチドが生成した場合、希釈されない（Ｂ）。

＊はラベルされた原子を示す。

考えられており(Hove-Jensen et al. 1989)、感度の高い検出系が必要である。これらの課題を解決し、スクリーニングにも供し得る簡便な方法として以下に述べる方法を考案した。微弱と考えられる活性の検出を可能とする手段として、ラジオアイソトープラベルされたイノシンを使用し、2 経路の判別の手段として、塩基のみがラベルされたイノシンを用いてラベルされていないヒポキサンチン添加によるラベルされたイノシン酸の減少を測定するというものである。本章の目的は、緒言に述べたように GDP、GTP 存在下でもグアノシンのリン酸化が可能なヌクレオシドキナーゼを得ることであるが、本方法で添加の必要があるグアニンは非常に溶解度が低いためスクリーニングの実施は困難である。そこで、グアニンに比し溶解度の高いヒポキサンチンを添加する核酸塩基とし、リン酸化基質としてはヒポキサンチン残基を持つイノシンを用いることとした。本方法の概要を図３－１に示した。すなわち、イノシン酸がイノシンの直接のリン酸化によらず生成した場合(図３－１A)、ラベルされていないヒポキサンチン添加によりラベルされたイノシン酸は減少する。一方、イノシン酸が直接リン酸化されて生成した場合(図３－１B)、ラベルされていないヒポキサンチン添加によってもラベルされたイノシン酸は減少しない。この原理が機能すれば、イノシンを直接リン酸化する活性の検出は可能であると考えられたが、さらに、直接のリン酸化によらない経路の反応を抑制する目的で、粗酵素抽出液のゲルろ過により、この経路での反応に必要とされるリン酸等低分子物質の除去を行い、反応には Tris バッファーを使用することとした。

先ず始めに、ここで考案した方法が有効に機能することを検証した。検証の材料として、直接リン酸化によらない経路が強力であることが知られている *Corynebacterium ammoniagenes*(Furuya et al. 1970)及び、直接リン酸化する経路と直接リン酸化によらない経路の両者を併せ持つことが知られている *E. coli* (Hammer-Jespersen et al. 1971)を用いた。表３－２に示すように、*Corynebacterium ammoniagenes* より調製した粗酵素抽出液を用いた場合には

表3－2 ヌクレオシド直接リン酸化活性の選択的検出

| Strain | Concentration of unlabeled Hypoxanthine added (mM) | Inosine phosphorylating activity (pmol/min/mg protein) | Relative activity (%) |
|---|---|---|---|
| *E. coli* JM109 | 0 | 78 | 100 |
| | 2 | 61 | 78 |
| | 4 | 56 | 72 |
| *C. ammoniagenes* ATCC 6872 | 0 | 754 | 100 |
| | 2 | 67 | 9 |
| | 4 | 32 | 4 |

生成するラベルされたイノシン酸は、ラベルされていないヒポキサンチンの濃度に応じて減少した。一方、*E. coli*より調製した粗酵素抽出液を用いた場合には、ラベルされたイノシンに対して20倍濃度のラベルされていないヒポキサンチンが共存した場合も、ヒポキサンチン非共存区の 78%のラベルされたイノシン酸が検出された。従って、ここで考案した方法は、粗酵素抽出液を酵素源としたイノシンを直接リン酸化する活性の検出に効果があるものと判断された。

### 3－3－2 新規イノシンキナーゼの探索

考案したイノシン直接リン酸化活性特異的検出法の有効性が確認されたことから、表4－1に示した菌株についてその活性検出を試みた。菌株の選定に当たっては、核酸系化合物の発酵工業生産に用いられていることを考慮し、*Bacillus* 属細菌、*Brevibacterium* 属細菌、及び *Corynebacterium* 属細菌を対象とした。検討の結果、表4－1に挙げた 70 株のうち、2 株、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953（最近、*Exiguobacterium* 属に再分類された(Farrow et al. 1994)。）、*Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887 にイノシンの直接リン酸化活性が認められた。粗酵素抽出液中のイノシン直接リン酸化の比活性は、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953 が、1.2 nmol/min/(mg protein)、*Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887 が、1.4 nmol/min/(mg protein) であった。

イノシンを直接リン酸化する活性として、キナーゼ以外にもヌクレオシドフォスフォトランスフェラーゼ活性が知られている。この活性は、AMP のリン酸基を転移し、$Mg^{2+}$非依存的であることが知られている(Brunngraber et al. 1967, Brunngraber et al. 1973, Chao 1976)。そこで、得られた活性が、イノシンキナーゼ活性である可能性をより確かなものにするために、得られた活性の $Mg^{2+}$依存性及び ATP 依存性について検討を行った。表3－3に示すように、いずれの活性も $Mg^{2+}$依存性及び ATP

表３－３ イノシン直接リン酸化活性の性質

| Source | Reaction condition | Relative activity (%) |
|---|---|---|
| *Exiguobacterium* | No $Mg^{2+}$ addition | 0.1 |
| *acetylicum* ATCC 953 | 1mM $Mg^{2+}$ | 11 |
| | 10mM $Mg^{2+}$ | 100 |
| | 100mM $Mg^{2+}$ | 138 |
| | No ATP addition | 0.1 |
| | 1mM ATP | 100 |
| | 10mM ATP | 84 |
| | 1mM AMP | N.D. |
| | 10mM AMP | N.D. |
| *Corynebacterium* | No $Mg^{2+}$ addition | 11 |
| *flaccumfaciens* | 1mM $Mg^{2+}$ | 41 |
| ATCC 6887 | 10mM $Mg^{2+}$ | 100 |
| | 100mM $Mg^{2+}$ | 78 |
| | No ATP addition | 7 |
| | 1mM ATP | 100 |
| | 10mM ATP | 151 |
| | 1mM AMP | 7 |
| | 10mM AMP | 6 |

材料と方法の項で記述した標準反応条件で得られた活性に対する相対活性で示した。*E. acetylicum* 由来無細胞抽出液を酵素源とした場合の 100%の活性は、1.2 nmol/min/mg protein を、*C. flaccumfaciens* 由来無細胞抽出液を酵素源とした場合の 100%の活性は、1.4 nmol/min/mg protein を表している。$Mg^{2+}$濃度を変化させた場合は、ATP濃度は 1 mM、ATP濃度を変化させた場合は、$Mg^{2+}$濃度を 10 mMとした。N.D.: 検出されず。

依存性を示した。次に、生成したイノシン酸のリン酸化部位について検討を行った。図3－2に示すように、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953 に存在する活性により生成したイノシン酸も、*Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887 に存在する活性によって生成したイノシン酸も、いずれも、5'位がリン酸化されていることが明らかとなった。

以上より、得られたイノシンを直接リン酸化する活性は、イノシンキナーゼ活性である可能性が高いものと考えられた。

### 3－3－3 *Exiguobacterium acetylicum* 類縁菌におけるイノシンキナーゼの存在分布

前節でも述べたように、近年、*Brevibacterium acetylicum* は、16S rRNA 解析に基づき、*Exiguobacterium acetylicum* へと再分類された(Farrow et al. 1994)。この *Exiguobacterium* 属は、*E. acetylicum* と *E. aurantiacum* の 2 種より構成される。また、同じく 16S rRNA 解析より、*Exiguobacterium* 属は、*Kurthia* 属と近縁であり、また、*Bacillus spaericus, Bacillus pasteurii* ら球状胞子を形成する bacilli、*Sporosarcina ureae* 及び planococci よりなる一群との境界領域に位置していることが報告されている(Farrow et al. 1994)。そこで、これら *Exiguobacterium* 属と近縁の菌株における、イノシンキナーゼ(イノシン直接リン酸化活性)の有無につき検討を行った。その結果、*E. aurantiacum* ATCC 35652, *Kurthia gibsonni* ATCC 43195, *Kurthia zopfii* ATCC 33403 には、イノシンキナーゼ活性が認められた(比活性はそれぞれ、5.8 nmol/min/(mg protein)、0.45 nmol/min/(mg protein)、 0.24 nmol/min/(mg protein))。しかしながら、*Bacillus spaericus* ATCC 14577, *Bacillus pasteurii* ATCC 11895, *Sporosarcina ureae* ATCC 6473, *Planococcus citreus* ATCC 14404, *Planococcus kocurii* JCM 2569 (JCM: Japan Collection of

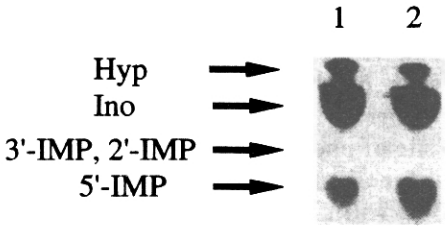


図３－２　見出したイノシン直接リン酸化活性によるリン酸基転移位置の特定

レーン１: *C. flaccumfaciens*,由来無細胞抽出液を酵素源とした場合，レーン２: *E. acetylicum* 由来無細胞抽出液を酵素源とした場合。スタンダードの位置を矢印で示した。

Microorganisms)には今回実施した条件ではイノシンキナーゼ活性は検出されなかった。

## 3－4 考察

従来、細胞や粗酵素抽出液などの混合系を酵素源とした場合、2種類存在するプリンヌクレオシドの利用経路を判別するアッセイ系は報告されていなかった。従って、経路の判別のためには、酵素を部分精製するか、一方の活性が欠失した変異株を使用する必要があった。本章において、2種類存在するプリンヌクレオシドの利用経路を、同一細胞がその両方を併せ持つ場合においても判別することが可能な簡便なアッセイ系を構築した。本章では、プリンヌクレオシドとしてイノシンを用いた場合についてのみ、その有効性を実証したにすぎないが、ここで用いた原理は、他のプリンヌクレオシドの場合にも適用可能と考えられる。

直接のリン酸化によらない経路の反応を抑制する目的で、粗酵素抽出液のゲルろ過により、この経路での反応に必要とされるリン酸等の低分子物質の除去を行い、反応にはTrisバッファーを使用することとしたが、*C. ammoniagenes*より調製した粗酵素抽出液を用いた場合には、ラベルされていないヒポキサンチンの添加に応じたラベルされたイノシン酸の減少が認められた(表3－2)。この理由としては、*C. ammoniagenes* はイノシンを加リン酸分解ではなく加水分解する活性を有するため反応液中のリン酸基の除去を行った場合でも、イノシンキナーゼ非依存的経路によってイノシン酸が生成したことが考えられた。イノシンの加リン酸分解活性の存在が知られている*E.coli*より調製した粗酵素抽出液を用いた場合には、粗酵素抽出液のゲルろ過処理を施さなかった場合、あるいはゲルろ過処理を施した場合でも反応にリン酸バッファーを使用した際は、ラベルされていないヒポキサンチンの添加に応じたラベルされたイノシン酸の希釈が認められたことから、粗酵素抽出液のゲルろ過処理と

Tris バッファーの使用は効果があるものと考えられた(データ示さず)。

本章では、この新たなアッセイ系を用いて、核酸系化合物の発酵工業生産に用いられており、その核酸代謝機構に興味が持たれる *Bacillus* 属細菌、*Brevibacterium* 属細菌、及び *Corynebacterium* 属細菌、計70株におけるイノシンキナーゼ活性の存在について検討を行った。その結果、*Brevibacterium acetylicum* ATCC 953 (最近、*Exiguobacterium* 属に再分類された(Farrow et al. 1994)。)、*Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887 の2株にのみ活性が検出された。従って、イノシンキナーゼ活性(イノシン直接リン酸化活性)は、従来報告されていた通り、特定の菌株にのみ存在するものと推定された。

16S rRNA 解析からは、*Exiguobacterium* 属と *Kurthia* 属とは近縁であるという系統樹とやや遠縁であるという系統樹の2種類の系統樹が報告されている(Farrow et al. 1994)。今回の得られたイノシンキナーゼ活性(イノシン直接リン酸化活性)の分布結果は、前者の系統樹、すなわち、*Exiguobacterium* 属と *Kurthia* 属とは近縁であることを支持している。

今後、本章にて開発したアッセイ系を用い、より広範な菌株におけるプリンヌクレオシド直接リン酸化活性の存在分布の検討を行うことは、新規活性の発見、本酵素の生理的役割の解明、本酵素の進化についての理解に繋がるものと期待される。

尚、本章で得られた活性が、緒言で述べた目的の活性であるか否かについては次章で検証を行う。

## 第四章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製と性質

### 4－1 緒言

第三章で、これまでイノシンを直接リン酸化する活性が報告されていなかった菌株にその活性を検出したことを述べたが、得られた活性がイノシンキナーゼ活性であることの証明には至っていなかった。また、得られた活性が GDP、GTP などのグアニンヌクレオチドで阻害を受けないという目的の性質を持つか否かの検証を行う必要があった。そこで、この新たに見出された活性の詳細を検討する目的で、この活性の精製を行うこととした。

これまで完全に精製されたイノシンキナーゼを用いた酵素諸性質についての報告は、本研究を除けば、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの性質の一部について報告があるのみである(Mori et al. 1995)。従って、仮にこの新たに見出された活性がイノシンキナーゼ活性であれば、得られた精製酵素を用いた酵素諸性質についての検討は、グアノシンのリン酸化という実用面ばかりでなく、生理的役割の解明といった学術面にも大きな役割を果たすものと考えられる。

### 4－2 材料と方法

#### 材料

[$^{14}$C]guanosine、[$^{14}$C]inosine 及び[$^{14}$C]2'-deoxyguanosine は、Moravec 社(Brea, CA, USA)より購入した。その他のヌクレオシド類、ヌクレオチド類は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA)より購入した。DEAE-Toyopearl、Butyl-Toyopearl 及び TSKgel HA-1000 は東ソー社より、MonoQ FPLC, Superdex 200HR 及び gel

filtration calibration kit は Pharmacia 社(Uppsala, Sweden)より購入した。

菌株、培地、及びバッファー

本章では、*Exiguobacterium acetylicum* 野生株 ATCC 953を使用した。本菌株の培養には、CM2G(Miwa et al. 1985)培地(10 g/l yeast extract, 10 g/l polypeptone, 5 g/l NaCl, 5g/l glucose)を使用した。バッファーは以下のものを使用した。Buffer C: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT; Buffer D: 10 mM potassium phosphate (pH 7.5), 1 mM DTT, 20% (w/v) glycerol; Buffer E: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 20% (w/v) glycerol

酵素活性測定法

標準的な反応液としては以下の組成のものを用い、反応容量 50 μl にて反応を行った。100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP, 0.04 mM [$^{14}$C]guanosine, 0.16 mM guanosine 及び酵素溶液。精製酵素を用いる場合には、変換率が約 10%となる程度に Buffer C にて希釈して使用した。また、酵素安定化のため 10 mg/ml bovine serum albumin 存在下にて反応を行った。反応液を30℃にて10分間インキュベートし、その2 μlをシリカゲルプレートArt 5715 (Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。1-butanol-ethanol-water (2:1:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000 にて行った。

*Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

特に記述しない限り、操作は全て4℃にて行った。100 ml の CM2G 培地にて30℃、24 時間培養した *E. acetylicum* を 1 l の CM2G 培地に接種し、30℃にて 24 時間培養した。この培養液を 20 l の CM2G 培地に移し、30℃にて 6 時間、pH を 7.0 に

維持しつつジャー培養を行った。菌体を遠心分離により回収し、0.9% NaClにて2度洗浄を行った。菌体を 100 mM KCl を含む 90 ml の Buffer C に懸濁し、bead-beater (Biospec 社、Bartlesville, OK, USA)を用いて破砕した。破砕残渣の除去を遠心分離により行った後、100 mM KClを含むBuffer Aに対して透析を行った。透析後、遠心分離を行い、上清を回収した。得られた上清を、予め 100 mM KCl を含む Buffer A にて平衡化された DEAE-Toyopearl を用いたカラムクロマトグラフィーによる分画に供した。溶出は、200 mM KCl により行った。得られた活性画分に30%飽和となるよう硫安を添加し、遠心分離により沈殿画分を除去した。得られた上清を、予め 100 mM KCl 及び 30%飽和硫安を含む Buffer C により平衡化された Butyl-Toyopearl を用いたカラムクロマトグラフィーによる分画に供した。硫安のリニアグラジェント(30%→15%)により溶出を行った。活性画分に終濃度 20%(w/v)となるよう glycerol を添加した。活性画分を Buffer D に対して透析を行った後、遠心分離を行い沈殿を除去した。得られた上清を、予め Buffer D にて平衡化された TSKgel HA-1000 を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。溶出は、potassium phosphate のリニアグラジェント(10 mM→200 mM)により行った。活性画分を 100 mM KCl を含む Buffer C に対し透析を行い、これを、予め 100 mM KCl を含む Buffer E により平衡化された MonoQ FPLC カラムクロマトグラフィーによる分画に供した。溶出は、KCl のリニアグラジェント(100 mM→300 mM)により行った。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

前項で得られた精製酵素のさらなる精製及び非変性状態での分子量算出を目的として、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを実施した。前項で得られた精製酵素溶液を、予め Buffer E にて平衡化された Superdex 200HR を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、同 Buffer にて溶出を行った。分子量マーカーとして、aldolase, albumin, ovalbumin, chymotripsin A, ribonuclease A を用いた。

タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Bio-Rad 社(Hercules, CA, USA)の protein assay kit を用い、bovine serum albumin を標準タンパク質として行った。

## 4－3 結果

### 4－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

前章にて *Exiguobacterium acetylicum* に検出されたイノシンを直接リン酸化する活性の精製を行った。材料と方法の項で述べたように、DEAE-Toyopearl、Butyl-Toyopearl、TSKgel HA-1000、MonoQ FPLC、Superdex 200HR を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素溶液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ、分子量約 36000 の単一なバンドが検出され、本酵素の精製が電気泳動的に確認された(図4－1)。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーより算出された非変性状態での分子量は、約 71,000 であることから、本酵素は、同一サブユニットからなる二量体であると考えられた。湿重量 92 g の菌体より 18 μg の酵素が得られた。精製の概要を表4－1に示す。

### 4－3－2 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの性質

#### 4－3－2－1 基質特異性

精製酵素を用い、[$\gamma$-$^{32}$P]ATP をリン酸基供与体として、リン酸基受容特異性の検討を行った。リン酸基受容体として検討したヌクレオシドは、グアノシン、イノシン、デオキシグアノシン、キサントシン、アデノシン、デオキシアデノシン、シチジン、

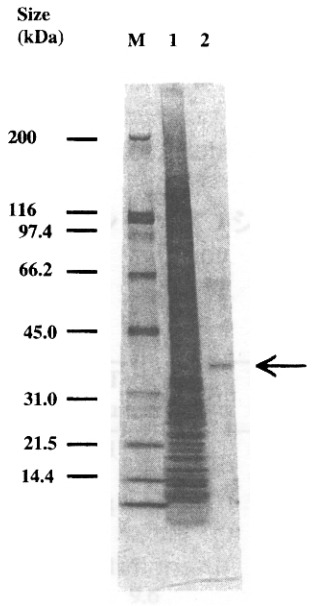


図４－１　精製した *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの SDS-PAGE

0.04 μgの精製酵素を4-20%グラジエントのポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、銀染色による染色を行った(レーン2)。レーン1は、6.5 μg の無細胞抽出液。分子量マーカー(レーンM)は、myosin (200k), β-galactosidase (116k), phosphorylase B (97k), bovine serum albumin (66k), ovalbumin (45k), carbonic anhydrase (31.5k), trypsin inhibitor (21.5k), lysozyme (14.4k)を用いた。

表4－1 *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの精製

| Fraction | Volume (ml) | Total protein (mg) | Total units [ab] | Recovery (%) [b] | Specific activity (U/mg) [b] | Purification (fold) [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Crude extract | 200 | 2600 | 177 | (100) | 0.068 | (1) |
| | | | 17.2 | (100) | 0.007 | (1) |
| 2. DEAE-Toyopearl | 195 | 864 | 196 | 111 | 0.227 | 3 |
| | | | 17.2 | 100 | 0.020 | 3 |
| 3. Butyl-Toyopearl | 120 | 15.7 | 105 | 60 | 6.70 | 99 |
| | | | 9.6 | 56 | 0.61 | 93 |
| 4. Hydroxyapatite | 6 | 0.498 | 11.8 | 6.7 | 23.6 | 350 |
| | | | 1.4 | 8.3 | 2.9 | 430 |
| 5. MonoQ FPLC | 1 | 0.046 | 10.3 | 5.8 | 224 | 3300 |
| | | | 1.0 | 6.0 | 22 | 3400 |
| 6. Superdex 200HR | 5 | 0.018 | 4.6 | 2.7 | 250 | 3700 |
| | | | 0.5 | 2.6 | 26 | 3900 |

[a] 1 unit は、1分間当り1 μmol の GMP または IMP の生成を表す。[b] グアノシンを基質とした場合の値を上段に、イノシンを基質とした場合の値を下段に示す。

デオキシシチジン、ウリジン、デオキシチミジンである。その結果、グアノシン、イノシン、デオキシグアノシンはリン酸基受容体となるが、アデノシン、デオキシアデノシン、シチジン、デオキシシチジン、ウリジン、デオキシチミジンはリン酸基受容体とはならないことが判明した。リン酸基受容体となったグアノシン、イノシン、デオキシグアノシンについて反応速度定数を求めた結果を表4－2に示す。グアノシンに対する $K_m$ 値は、イノシンやデオキシグアノシンに対する $K_m$ 値に比し非常に低く、*in vivo* での基質はグアノシンであると推定された。2 mM グアノシンをリン酸基受容体とした場合、Mg-ATP に対する $K_m$ 値は、0.54 ± 0.14 であり、$V_{max}$ は、267 ± 67 units/mg であった。

次に、リン酸基供与体の基質特異性について検討を行った。表4－3に示すように、ATP に加え、dATP, GTP, dGTP はよい基質となることが判明した。ITP, dTTP も基質とはなり得たが、XTP は基質とはならなかった。また、キナーゼではなくAMP 等をリン酸供与体とするヌクレオシドへのリン酸基転移酵素が知られているが(Brunngraber et al. 1967, Brunngraber et al. 1973, Chao 1976)、本酵素に対しては、AMP は基質とならなかった。

また、種々のATP濃度と$Mg^{2+}$濃度が本酵素活性に与える影響を検討したところ、[ATP]/[ $Mg^{2+}$]＝1 の時、最大活性を示し、$Mg^{2+}$と複合体を形成しない過剰の ATP 及び過剰の $Mg^{2+}$は本酵素活性を阻害することが観察された。

以上の結果より、*Exiguobacterium acetylicum* 由来のイノシンを直接リン酸化する活性は、イノシン－グアノシンキナーゼであると考えられた。

### 4－3－2－2 金属イオン要求性

本酵素活性は2価カチオンに依存し、マンガン、コバルトは、マグネシウムを用いた場合に比し反応速度は低下したものの、その代替となり得たが、カルシウム、ニッケル、亜鉛は代替とならなかった。

表4－2 *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの反応速度定数

| Substrate | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ (U/mg) | Efficiency ($V_{max}/K_m$) |
|---|---|---|---|
| guanosine | 0.022±0.006 | 217±24 | 9860 |
| inosine | 0.87±0.14 | 35.9±2.6 | 41 |
| deoxyguanosine | 2.83±0.14 | 59.3±11.7 | 21 |

$Mg^{2+}$濃度, ATP 濃度は共に 5 mM とした。

表４－３ *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼのリン酸基供与体特異性

| Phosphate donor [a] | Relative activity (%) |
|---|---|
| None | 0 |
| ATP | (100) |
| dATP | 71 |
| ADP | 1 |
| AMP | 0 |
| GTP | 59 |
| dGTP | 61 |
| GDP | 3 |
| GMP | 0 |
| ITP | 26 |
| XTP | 2 |
| CTP | 6 |
| UTP | 1 |
| dTTP | 12 |
| *p*-Nitrophenyl phosphate | 0 |
| Acetyl phosphate | 0 |
| Pyrophosphate | 0 |

[a] 各化合物は、終濃度 5 mM となるよう添加した。

### 4－3－2－3 反応pHの活性に及ぼす影響

本酵素活性はpH 7.5-9.8の弱アルカリ領域で活性が高く、至適pHは、8.3周辺であった。

### 4－3－2－4 共存ヌクレオチドが活性に与える影響

第二章で述べた通り、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、グアニンヌクレオチドにより阻害を受け、ピリミジン系ヌクレオチドにより活性化されることから、菌体内ヌクレオチドプールの制御に関与しているものと考えられた。そこで、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ活性が種々のヌクレオチドにより受ける影響について検討を行った。表4－4に示すように、本酵素活性は検討した条件においてはGDP、GTPによる阻害は認められず、*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼとは異なる性質を示した。また、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ同様、ピリミジンヌクレオチドによる活性化が認められた。特に、CMPやCTPは活性化効果が高く、それらが存在することによって、本酵素活性は、ピリミジンヌクレオチド非存在条件の約2－3倍に活性化された。

## 4－4 考察

前章にて*Exiguobacterium acetylicum*に検出されたイノシンを直接リン酸化する活性の精製を行い、その酵素の諸性質を明らかにすることで、その活性がイノシン－グアノシンキナーゼ活性であることを証明した。このことから、前章で提案、実施したイノシンを直接リン酸化する活性の検出系は、当初の目的通り機能することが確認された。

また、本酵素は*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼとは異なりGDP、GTPによる阻害を受けないことが判明し、ATP再生反応と共役させたグアノシンのリン酸化に

表4－4　種々のヌクレオチドが *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ活性に及ぼす影響

| Nucleotide [a] | Relative activity [a] (%) | |
|---|---|---|
| | 0.1 mM | 1 mM |
| None | (100) | (100) |
| AMP | 108 | 62 |
| ADP | 102 | 81 |
| GMP | 99 | 78 |
| GDP | 108 | 99 |
| GTP | 107 | 103 |
| IMP | 120 | 105 |
| ITP | 115 | 98 |
| XMP | 139 | 109 |
| XTP | 118 | 103 |
| CMP | 296 | 107 |
| CTP | 243 | 110 |
| UMP | 176 | 104 |
| UTP | 158 | 103 |
| dTMP | 165 | 103 |
| dTTP | 138 | 104 |

[a] 各ヌクレオチドは、終濃度 0.1 mM または、1 mM となるよう添加した。基質はとしては、0.2 mM グアノシン、5 mM ATP を用いた。

適した性質を有する目的の酵素が得られたものと考えられた。

精製した酵素標品は、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて単一バンドを形成したこと、及び次章で述べるようにアミノ末端アミノ酸配列決定において単一の配列を示したことから、得られた酵素標品は、単一タンパク質からなるものと考えられた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により算出された分子量(約 36,000)及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより算出された分子量(約 71,000)より、本酵素は同一サブユニットよりなるダイマーであると考えられた。

本酵素は、リン酸基受容体として、グアノシン、イノシン、デオキシグアノシンを基質とし、これは、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼと類似していた。リン酸基供与体としては、ATP に加え、dATP, GTP, dGTP がよい基質となった。また、1 mM GDP の共存及び 1 mM GTP の共存は、酵素活性にほとんど影響を与えなかった。これらのことは、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼにおいては、グアニンヌクレオチドは、リン酸基供与体として全く機能しなかったばかりか、GDP, GTP が強力に酵素活性を阻害したことと極めて対照的であった。一方、*Bacillus subtilis* のデオキシアデノシン/デオキシシチジンキナーゼにおいては、GTP が最良のリン酸基供与体であることが報告されている(Mφllgaard 1980)。16S rRNA 解析に基づく系統樹においては、*Exiguobacterium* 属と *Bacillus* 属は、遠縁ながらも類縁であることが示されており(Farrow et al. 1994)、リン酸基供与体特異性は、この類縁性の反映と考えられた。

本酵素は、過剰の $Mg^{2+}$ 及び ATP によって阻害を受けた。この現象は、植物ミトコンドリア由来イノシン－グアノシンキナーゼ(Combes et al. 1989)、及び複数のアデノシンキナーゼにおいても観察されている(Datta et al. 1987, Meyskens et al. 1971, Miller et al. 1979)。ATP による阻害は、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼにおいても観察されている。この原因は、第二章でも述べたように、$Mg^{2+}$ と複合体を形成していない過剰の ATP が、本来の基質である Mg-ATP 複合体結合部位に結

合し、Mg-ATP 複合体の結合を妨げることであると考えられる。

本酵素活性は、0.1 mM のピリミジンヌクレオチドによって活性化された。特に、CMP や CTP は活性化効果が高く、それらが存在することによって、本酵素活性は、ピリミジンヌクレオチド非存在条件の約2－3倍に活性化された。従って、本酵素が、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼと同様に、*in vivo* にて菌体内ヌクレオチドプールの制御に関与している可能性が考えられた。1 mM のピリミジンヌクレオチド存在条件での酵素活性化度は、0.1 mM ピリミジンヌクレオチド存在条件より低かった。この原因として、1 mM のピリミジンヌクレオチド存在下では、ピリミジンヌクレオチドが、リン酸基供与体である ATP と拮抗している可能性が考えられた。第二章で述べた *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼのピリミジンヌクレオチドによる活性化度は、本章で述べた *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの活性化度に比して低いものであったが、この原因として、第二章の実験においては、高濃度のピリミジンヌクレオチド(2 mM)を使用したことが考えられた。

# 第五章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングとその解析

## 5－1 緒言

第四章で述べたように *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、リン酸基受容体特異性においては *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼと極めて類似しているにもかかわらず、その他の性質においては、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼとの間に明瞭な差異が存在することが明らかとなった。特に、GDP や GTP といったグアニンヌクレオチドによる阻害を受けないことから、ATP 再生反応との共役によるグアノシンのリン酸化に適した性質を持つものと考えられた。実用的なリン酸化反応に用いるためには活性を増強した菌体を用いることが望ましく、そのためには遺伝子工学技術を用いる方法が有効である。そこで、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングを行った。

## 5－2 材料と方法

### 材料

[$^{14}$C]guanosine、及び[$^{14}$C]inosine は、Moravec 社(Brea, CA, USA)より購入した。[$\gamma$-$^{32}$P]ATP は Amersham 社(Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom)より購入した。

### 菌株、プラスミド及び培地

本章では、*Exiguobacterium acetylicum* 野生株 ATCC 953 を使用した。本菌株の培養は、CM2G(Miwa et al. 1985)培地(10 g/l yeast extract, 10 g/l

polypeptone, 5 g/l NaCl, 5g/l glucose)を使用し、30℃にて行った。遺伝子クローニング、塩基配列決定実験には、*E. coli* JM109を使用した。*E. coli* の培養はLB培地を用い、37℃にて行った。遺伝子クローニング、塩基配列決定には、pACYC184由来pSTV28(宝酒造)、pSC101由来pMW218(和光純薬)、pUC18及びその誘導体pHSG298、pHSG398の各プラスミドを使用した。

アミノ末端アミノ酸配列の決定

約2 μgの精製 *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼをセントリコン－10(Amicon 社、Beverly, MA, USA)を用い濃縮した後、PE biosystems 社(Foster City, CA, USA)のProSpinを用いて、PVDF(polyvinylidene fluoride)膜にブロットした。PE biosystems 社(Foster City, CA, USA)の気相プロテインシーケンサー477Aを用いてアミノ末端アミノ酸配列の決定を行った。

DNAハイブリダイゼーション

アミノ末端アミノ酸配列に対応する83塩基対よりなるDNA断片を、*E. acetylicum* 染色体DNAを鋳型としてPCRによって取得した。得られた断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼを用い、[$\gamma$-$^{32}$P]ATPによって標識を行い、サザンハイブリダイゼーションのプローブとして用いた。制限酵素処理を行った *E. acetylicum* 染色体DNAを0.8% アガロースゲルにて分離した後、GeneScreen Plus膜(Dupont社、Boston, MA, USA)にブロットした。*E. coli* を用いたコロニーハイブリダイゼーションの実施に際しては、*E. coli* コロニーをHybond-N膜にトランスファーした。ブロッティング、ハイブリダイゼーション、及び洗浄の方法は、Molecular Cloning 第2版(Sambrook et al. 1989)に準じた。

DNA 塩基配列の決定

DNA 塩基配列の決定は、dideoxy chain termination 法(Sanger et al. 1977)に基き Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit (PE biosystems 社 Foster City, CA, USA)及び PE biosystems 社 DNA シーケンサー model 373S を用いて行った。

尚、本章にて報告した、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子は、DDBJ、EMBL、及び GenBank に登録されており、その accession number は、AB005149 である。

酵素活性測定法

*E. acetylicum* または *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドにより形質転換された *E. coli* を 50 ml の培地にて培養を行った後、菌体を遠心分離により回収した。0.9% (w/v) NaCl にて 2 度洗浄を行った後、菌体を 2 ml の Buffer F(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM DTT)に懸濁し、超音波により破砕を行った。破砕残渣を遠心分離により除去した後、PD-10 ゲルろ過カラム(Pharmacia 社、Uppsala, Sweden)を用い、低分子物質の除去を行ったものを粗酵素抽出液として使用した。

イノシン－グアノシンキナーゼ活性測定には、以下の組成の反応液を用い、反応容量 50 μl にて反応を行った。100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP, 0.02 mM [$^{14}$C]guanosine または、0.2 mM [$^{14}$C]inosine 及び粗酵素抽出液。反応液を 30℃にて 10 分間インキュベートし、その 2 μl をシリカゲルプレート Art 5715(Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。1-butanol-ethanol-water (2:1:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000 にて行った。

グアノシンフォスフォリラーゼ活性測定には、以下の組成の反応液を用い、反応容

量 50 μl にて反応を行った。100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.04 mM [8-14C]guanosine, 0.16 mM guanosine 及び粗酵素抽出液。反応液を 30℃にて 10 分間インキュベートし、その 2 μl をシリカゲルプレート Art 5715(Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。2-propanol-$NH_4OH$-water (7:2:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000 にて行った。タンパク質の定量は、Bio-Rad 社(Hercules, CA, USA)の protein assay kit を用い、bovine serum albumin を標準タンパク質として行った。

## 5－3 結果

### 5－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の取得

第四章にて精製された *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼのアミノ末端アミノ酸配列の決定を行ったところ、Met-Asn-Lys-Ile-Ala-Val-Ile-Gly-Lys-Val-Phe-Val-Asp-Ile-Lys-Gly-Thr-Xaa-Phe-Ala-Pro-Leu-His-Lys-Asp-Ala-Lys-Asn の配列が得られた(18 番目のアミノ酸残基は決定できなかった。)。このアミノ酸配列の両端のアミノ酸配列に対応する PCR 用の混合プライマーを作製し、上記アミノ末端アミノ酸配列に対応する 83 塩基対よりなる DNA 断片を、*E. acetylicum* 染色体 DNA を鋳型として PCR によって取得した。得られた DNA 断片の塩基配列は、上記アミノ末端アミノ酸配列と完全に対応していた。DNA 断片の塩基配列から、アミノ末端アミノ酸配列決定の際に決定できなかった 18 番目のアミノ酸残基は、Ser であることが明らかとなった。この 83 塩基対よりなる DNA 断片をプローブとして、制限酵素により完全分解した *E. acetylicum* 染色体 DNA のサザンブロット解析を行ったところ、約 3.6 kb の *Eco*RI

切断断片、及び 5.9 kb の *Bam*HI 切断断片がハイブリダイズした。そこで、これらの断片の *E. coli*を用いたコロニーハイブリダイゼーションによる回収を試みたが、プローブとハイブリダイズするDNA断片を有するコロニーは得られなかった。このことから、これら断片の *E. coli*での増幅が、*E. coli*の生育に悪影響を及ぼす可能性が考えられたため、カセット PCR 法による遺伝子の取得を検討した。その結果、アミノ末端領域より上流約 2.2 kb 及びアミノ末端領域より下流約 1.2 kb の DNA 断片を増幅することができた。得られた DNA 断片のうち、アミノ末端領域より下流の約 1.2 kb の DNA 断片は pUC18 に連結することができたが、アミノ末端領域より上流の約 2.2 kb の DNA 断片は、低コピー数ベクターにも連結することはできなかった。約 2.2 kb 上流の DNA 断片中には、アミノ末端領域より上流約 0.6 kb の位置に *Kpn*I 認識部位が存在し、この 0.6 kb の DNA 断片はベクターに連結可能であった。従って、この *Kpn* I 認識部位よりさらに上流に *E. coli*の生育に悪影響を及ぼす領域が存在するものと考えられた。そこで、*Kpn*I 及び *Eco*RI により完全分解した *E. acetylicum* 染色体 DNA より回収した約 1.8 kb の DNA 断片を pSTV28 プラスミドに連結、*E. coli* JM109 に導入し、アミノ末端領域より下流の *Eco*RI 認識部位までの約 1.2 kb の DNA 断片とハイブリダイズするコロニーを選択することにより、目的遺伝子の取得を行った。さらに、同様の手法により、*Kpn*I－*Bam*HI 断片を取得した。

### 5－3－2 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子(*gsk*)の塩基配列の決定とその解析

前節にて得られた *Kpn*I－*Bam*HI 断片の塩基配列を図5－1に示す。ORF として、塩基番号 522-1454、543-1454、1483-1911 が存在したが、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼのアミノ末端アミノ酸配列より、塩基番号 543-1454 の ORF が本酵素遺伝子であると考えられた。塩基配列から、本酵素は 303 アミノ酸残基よりなる分子量 32,536 のタンパク質と推定された。この推定分子量は、精製

```
   1 GGTACCAGTCGCCATCTTGA TCGGCTCGATCCTGCTTGCG AATAACATTCGGGACTTGGA TAATGATAAGGTCAACGGAC GAAAAACGATTGCCTGTCTC
      KpnI
 101 GTCGGACATCGCCGTGCTGT TTACGTCTTGATCGGATTTT TTGCGGCAGCTGTCCTGTCT CTCATTATTGCTGTACTCGC ATTCGAAGTCTCATGGTTTG

 201 CGTTACTCGCGTTGTTAAGT ATTCCACTCATGATCAAAGC AGTCCGTCTCTTCTGGGAAG ACTTGCCACCGGAAAAACTG ATGCCTGGTATGGCACAGAC

 301 TGGTAAAGTGAATACGATTT TCGGACTTTTACTCGCAATC AGTCTCGTGATCGCGAATAT CTAATCTTAATTTAAAGTAG CAGGCGATTCGCTTGCTGCT

 401 TTTTTTACGTGAAGATAGGG AACAGTTAGAAAAAAAGTAC TTCGGTTGTCACTGATTTAA AATTTACTATAATTGAAGC AATGTGCCTGAAAGATCAAA
                                                  -35                 -10        *
 501 CAAGGTCGGAAATCAGGAAA TATGGTTAGAGGTGGAACTG AAATGAATAAAATCGCGGTA ATCGGAAAAGTATTCGTCGA CATAAAAGGAACTTCGTTCG
   1                            RBS             M  N  K  I  A  V   I  G  K  V  F  V  D   I  K  G  T  S  F  A
                                                ➡gsk                             SalI
 601 CTCCTTTGCATAAGGATGCG AAAAACGTAGGAGACATCAC GTTTTCAAATGGAGGAACAG GACGCAACGTAGCACAAAAT CTAGCCGTCCTCGGGAATGA
  21  P  L  H  K  D  A   K  N  V  G  D  I  T   F  S  N  G  G  T  G   R  N  V  A  Q  N   L  A  V  L  G  N  E

 701 AGTTCGCTTTATCTCGACGG TTACGAATGATCAGATTGGC GTGGGAGTGCTCGATGAGCT GAAATCCTACGGTGCGAATG TGGATCACGTCGAAATGTTA
  54  V  R  F  I  S  T  V   T  N  D  Q  I  G   V  G  V  L  D  E  L   K  S  Y  G  A  N  V   D  H  V  E  M  L

 801 GAAGATCATGGAATGGGTAT GTGGCTAGCTGTCATGGATA ACGAGGGTGACTTGCAAACA TCGATCTCGAAACAACCGGA TGCCAAGTTGCTCGAAGAGG
  87 E  D  H  G  M  G  M   W  L  A  V  M  D  N   E  G  D  L  Q  T   S  I  S  K  Q  P  D   A  K  L  L  E  E  A

 901 CGATTTTACGTCAATCGATC TATGCACTCGATGGAGTCGA TGCCGTTGCAATCGATTTGG ATTTGTCCGTCACGGTCTTA GAACGTTTGATTCATTTATG
 121  I  L  R  Q  S  I   Y  A  L  D  G  V  D   A  V  A  I  D  L  D   L  S  V  T  V  L   E  R  L  I  H  L  C

1001 TCGTAAGATGGAGTTGCCAT TGTTTGGTGTTTGTGGTCAC TTGAGCGTCATCGAACGAAA TCGTCATCTGCTACAAGGGT TCACTGGATTCATTTGTAGC
 154  R  K  M  E  L  P  L   F  G  V  C  G  H   L  S  V  I  E  R  N   R  H  L  L  Q  G  F   T  G  F  I  C  S

1101 CGAGAAGAGGCTGAAATTCT GTCTGATCTATCGATCGTGA CGGTCGAAGATGCGATTCAT GTAGCAAATGAGCTAGCGAA AAAGGGCGCTCCGTTTACGG
 187 R  E  E  A  E  I  L   S  D  L  S  I  V  T   V  E  D  A  I  H   V  A  N  E  L  A  K   K  G  A  P  F  T  V

1201 TCGTGACGATGAGTGAACTG GGGGCGGTCTACGTTGATCG TCGTACGGCGACATCAGGTC ACGTCGGAACGAAAAAAGTG AAGGTTGTCGACTCAACGGG
 221  V  T  M  S  E  L   G  A  V  Y  V  D  R   R  T  A  T  S  G  H   V  G  T  K  K  V   K  V  V  D  S  T  G
                                                                                              SalI
1301 AGCAGGCGATTCCTTCTTCT CCGCAGTCTTGTCCGAATTG ACACAGGAAAAGTCAGCAGA AGAGGCTTTGAAGCTTGGTA TGAAGGTCGCAGCAGAAGTC
 254  A  G  D  S  F  F  S   A  V  L  S  E  L   T  Q  E  K  S  A  E   E  A  L  K  L  G  M   K  V  A  A  E  V

1401 ATCGCTTCAACAGAGAATGG ACTCGTTCCTGAAATGCTAG ATGCTCTTCAATAAGTAGAA ATGATAAAAGGGAGGTGGCG TCATGCCGATTCAACGAAGT
287-1 I  A  S  T  E  N  G   L  V  P  E  M  L  D   A  L  Q  *                       RBS      M  P  I  Q  R  S
                                                                                          ➡orf2
1501 GCAATCATTTTACGAAACGA ACAGGATGAAATTGCGTTGA TCCGACGGGATAAACCGAAC GAAACGTATTATGTCTTTCC AGGCGGTGGGAAAGATGACG
   7 A  I  I  L  R  N  E   Q  D  E  I  A  L  I   R  R  D  K  P  N   E  T  Y  Y  V  F  P   G  G  G  K  D  D  G

1601 GAGAATCGTTAGAAGAAACA GCGATTCGCGAAGCACATGA AGAACTTGGCATCGACGTGG AGTTGACCGGTATTGCCGCC ATCGTCCGTTTTAATGGATT
  41  E  S  L  E  E  T   A  I  R  E  A  H  E   E  L  G  I  D  V  E   L  T  G  I  A  A   I  V  R  F  N  G  F

1701 CGATAATCCTTATTTTTGGG CGAAAACAATTGGTGGTCAG TTTGGCACGGGTACGGGTGA AGAATTCGAAGAGGAAGGAT CGGGTTATACACCGGTCTGG
  74  D  N  P  Y  F  W  A   K  T  I  G  G  Q   F  G  T  G  T  G  E   E  F  E  E  E  G  S   G  Y  T  P  V  W
                                                                   EcoRI
1801 ATCAAGCGTTCGGAGCTACC TTCGTTGCCAATTCGTCCAC CGTCACTTGCCAAACAACTG GCAGAAATGACAGAACCATT CTATGAATTAATCCTTTCTG
 107 I  K  R  S  E  L  P   S  L  P  I  R  P  P   S  L  A  K  Q  L   A  E  M  T  E  P  F   Y  E  L  I  L  S  E

1901 AAAACGAATGAGGTTTTAGT TGAAATAAAATGGAAAAAGT ATATTAAAACAATGAGGTGG TCTTCGACTGCCTCTTTTTC ATGAAGGAGAGATGACGATG
 141  N  E  *

2001 GCGCATTCACGCGATCCAAA AGGGCTTGCCCTTAACTTAA AGCAGCGAATGTCCGATCAT AATATCACGGATTATGCAGG GACACTCGCCTATTACTGGT

2101 TTTTATCCATTTTCCCAGGA ATCATTTTCGTCATTTCGGT CTTATCATTCTTTGATATCG ATCGTCAGACACTCGAGTCA CAAATTCGGGACCTAGCGCC

2201 AGGCGGAGCCGTTAATACGT TCACGGATACAATTTTCCAA GCCATCAAAGAACCGCAGGG TGGTCTGTTATCGATCGGTG CGATTCTTGCTGTCTGGTCC

2301 GCTTCCAAAGGAGTCGATCG TTTGATCACGACAGCAAACC ATGCCTATGGTGACTTCTCT CCCCGTGGTTTTGTCGCAGC GCGTGGGATTGCCTTGTTAC

2401 TCACGATCGTGCTCGGAGTC GGGATGTTGTTGCTGATCGT CTTGAATGTGCTCGGTGGTC CGATCATTACGTATCTTGCC AACTTCGTGTTGCCGATCGA

2501 TATGGGGCAAAAAATCCTAC TGACGGTCTTACGATATGTC GTATCGACGATTCTATTGAT TGGTATCCTGTCGATTTTTT ACCGCGTCGCACCAAAGCGC

2601 CCGATTACATTTAAAGAGGC AATTCCAGGAGCCGTCTTTG GTGTCATCGTCTGGCAATTA TTATCGGTTGGATTCGGATT TTACGTCTCGAACTTCTCGA

2701 ACTACAATCAGACCTACGGT TCGCTCGGTAGTGTCGTCAT CTTGTTATTATGGCTCTACT TCACAGGGCTGATCATCTTG CTCGGTTCTGAATTGAACGC

2801 ATCATGGGAACGGTTCATGA AAAAAGCGGATCC
                                BamHI
```

図5－1 *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子を含む

2833-bp *Kpn*I－*Bam*HI 断片の塩基配列

*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼと機能未知 ORF の推定されるアミノ酸配列を示した。推定されるプロモーター配列と及びリボソーム結合配列を下線で示した。決定した精製酵素の N 末端アミノ酸配列部分を下線で示した。

酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動より算出された値、約 36,000 とよく一致した。リボソーム結合部位と考えられる配列(GAGGT)が、開始コドンの約 9 塩基上流に存在した。

コドン使用頻度は、他のグラム陽性細菌、*Brevibacterium lactofermentum* (Malumbres et al. 1993)や、*Bacillus subtilis* (Shields et al. 1987)での報告と相違が見られ、Gln に対しては CAA が、Asn に対しては AAU が、Asp に対しては GAU が、Cys に対しては UGU が使用頻度が高かった。

取得した遺伝子がイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子であることを確認する目的で、この遺伝子を *E coli* にて発現させ、その粗酵素抽出液中のイノシン－グアノシンキナーゼ活性について検討を行った。*E coli* での発現は、前節で述べた、*Kpn*I－*Eco*RI 断片を pSTV28 に連結した pKE1.8、及び、*Kpn*I－*Bam*HI 断片を pMW218 に連結した pKB2.8 を *E. coli* JM109 に導入することで行った。表５－１に示すように、いずれの発現プラスミドを導入した場合でも、イノシン－グアノシンキナーゼ活性の顕著な増大が認められ、取得した遺伝子がイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子であることが確認された。

得られた塩基配列より推定されるアミノ酸配列についての解析を行った。ホモロジー検索の結果(Altschul et al. 1990)、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、リボキナーゼ、ケトヘキソキナーゼ、2-デヒドロ-3-デオキシグルコノキナーゼなどの糖キナーゼと相同性をもつことが判明した。これら糖キナーゼは、リボキナーゼファミリーに属し、3種の保存領域が知られているが(Bork et al. 1993)、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼには、これらのうち、2種が存在した(図５－２)。これらは、*E. coli* リボキナーゼ(Sigrell et al. 1998)及びヒト アデノシンキナーゼ(Mathews et al. 1998)の立体構造解析結果から、それぞれリン酸基受容体結合とリン酸基供与体(Mg-ATP)結合に関与する領域が考えられる。図５－２に示すように、*E. coli* リボキナーゼとは、アミノ末端、カルボキシ末端を除くタンパク質

表５－１ *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の *E. coli* での発現

| Strain | Sp act (U/mg of protein)[a] | |
|---|---|---|
| | Guanosine | Inosine |
| JM109/pSTV28 | 0.011 | 0.005 |
| JM109/pKE1.8 | 3.1 | 0.55 |
| JM109/pMW218 | 0.013 | 0.004 |
| JM109/pKB2.8 | 2.7 | 0.39 |

[a] １ U は、1分間あたり 1 μmol の GMP または IMP を生成する活性を表す。基質としては、0.2 mM グアノシンまたはイノシン、及び 5 mM ATP を用いた。

```
B. acet. Gsk       MNKIAVIGKVFVDIKGTSFAPLHKDAKNVGDITFSNGGTGRNVAQNLAVLGNEV   54
                                                   ...*.. *....**.. .  *...
E. coli RbsK MQNAGSLVVLGSINADHILNLQSFPTPGETVTGNHYQVAFGGKGANQAVAAGRS--GANI   58

B. acet. Gsk RFISTVTNDQIGVGVLDELKSYGANVDHVEMLEDHGMGMWLAVMDNEGDLQTSISKQPDA  114
              **. ...* ** .* ..* . . ....*....... *. *  ...**.  ..*   ..*
E. coli RbsK AFIACTGDDSIGESVRQQLATDNIDITPVSVIKGESTGVALIFVNGEGENVIGIHAGANA  118

B. acet. Gsk KLLEEAILRQSIYALDGVDAVAIDLDLSVTVLERLIHLCRKMELPLFGVCGHLSVIERNR  174
               *. *.. .    .....*. ..*. ... .    .. .. . .. .. .. .. *
E. coli RbsK A-LSPALVEAQRERIANASALLMQLESPLESVMAAAKIAHQ-NKTIVAL-NPAPARELPD  175

B. acet. Gsk HLLQGFTGFICSREEAEILSDLSIVTVEDAIHVANELAKKGAPFTVVTMSELGAVYVDRR  234
             .**.  . .. . .*** *..... . *** ..*. * .** . ...*... * *. ..
E. coli RbsK ELLALVDIITPNETEAEKLTGIRVENDEDAAKAAQVLHEKGIRTVLITLGSRG-VW-ASV  233

B. acet. Gsk TATSGHVGTKKVKVVDSTGAGDSFFSAVLSELTQEKSAEEALKLGMKVAAEVIASTENGL  294
             .... .* . .*..**...***.* .*....* .**.  **....  .** ...
E. coli RbsK NGEGQRVPGFRVQAVDTIAAGDTFNGALITALLEEKPLPEAIRFAHAAAAIAVTRKGAQP  293

B. acet. Gsk VPEMLDALQ                                                    303

E. coli RbsK SVPWREEIDAFLDRQR                                             309
```

図５－２　*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ（*E. acet.* Gsk）と *E. coli* リボキナーゼ（*E. coli* RbsK）のアミノ酸配列の比較

アステリスクは同一アミノ酸残基を、ドットは類似のアミノ酸残基を示す。リボキナーゼファミリーで保存されている領域を四角で囲った。

全体にわたって相同性があり、この 249 アミノ酸残基よりなる領域での相同性は 21.7%であった。本酵素が、リボキナーゼと低いながらも相同性を示したことから、リボキナーゼ活性を保持しているかどうか検討を行ったが、リボキナーゼ活性は検出されず、本酵素が、グアノシン及びイノシン特異的なキナーゼであることが確認された(データ示さず)。本酵素は、*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼ等他のヌクレオシドキナーゼとは低い相同性または、部分的な相同性を示したのみであった。また、*Lactobacillus acidophilus* デオキシグアノシンキナーゼ(Ma et al. 1995)やヒトミトコンドリア由来デオキシグアノシンキナーゼ(Wang et al. 1996)に存在しているWalker 型 ATP 結合モチーフは、本酵素には見出されなかった。

### 5－3－3 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの growth phase 依存的発現

*Exiguobacterium acetylicum* にはキナーゼ非依存経路の存在が既に知られており(Shirae et al. 1991)、本研究によりキナーゼ経路が見出されたことから *E. coli* と同様、2 種のプリンヌクレオシド利用経路の両方を併せ持つことが明らかとなったが、この生理的意義は不明である。そこで、2 種のプリンヌクレオシド利用経路の活性と growth phase との関係について検討を行った。2 種のプリンヌクレオシド利用経路のうち、一方を担うイノシン－グアノシンキナーゼ活性と、もう一方の経路を代表する活性として、グアノシンフォスフォリラーゼ活性の growth phase との関係を調べることとした。その結果、図5－3に示すように、これら 2 つの活性と growth phase との関係は、対照的であった。すなわち、イノシン－グアノシンキナーゼ活性は、対数増殖期初期に増大するのに対し、グアノシンフォスフォリラーゼ活性はこの時期に減少した。比活性の比較においては、活性減少時のグアノシンフォスフォリラーゼ活性は、活性増大時のイノシン－グアノシンキナーゼ活性より高いレベルであるが、*Exiguobacterium acetylicum* ATCC 953 のプリンヌクレオシドフォスフォリラーゼの

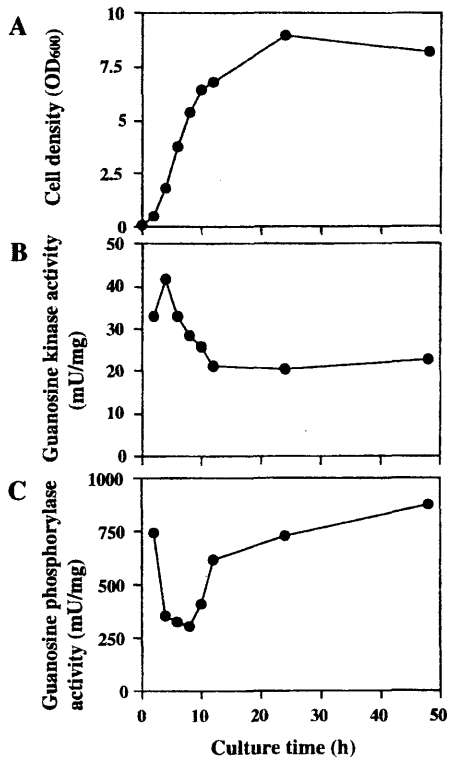


図5－3 各生育段階における *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ活性及びグアノシンフォスフォリラーゼ活性

Aは生育を、Bはイノシン－グアノシンキナーゼ活性を、Cはグアノシンフォスフォリラーゼ活性を示す。

グアノシンに対する $K_m$ 値は、2.4 mM であること(Shirae et al. 1991)、イノシン－グアノシンキナーゼのグアノシンに対する $K_m$ 値は、0.022 mM であることを考慮すると、*in vivo* でのグアノシン利用経路には、ここで観察された活性の増減が反映されている可能性が考えられた。

## 5－4 考察

*Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングとその解析を行った。塩基配列から推定される本酵素アミノ酸配列は、リボキナーゼを始めとする、リボキナーゼファミリーに属する糖キナーゼと相同性を示し、本酵素自身、リボキナーゼファミリーに属するものと考えられた。*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼとは塩基配列レベルにおいてもアミノ酸配列レベルにおいても高い相同性は示さなかったが、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼもリボキナーゼファミリーに属すことから、両イノシン-グアノシンキナーゼは、祖先を同一にすると考えられ、進化の過程での異なる調節機構獲得の経緯は、核酸代謝調節機構全体の進化という観点からも非常に興味深い。今後、酵素立体構造解析などを通じ、さらに理解が深まることを期待する。

*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドを導入した *E. coli* の生育速度は大幅に低下した。これは、*E. coli* にて *E. coli* 自身のイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子を発現させた場合と対照的であった。これは、これら由来の異なる 2 種のイノシン－グアノシンキナーゼの性質の差異に起因するものと考えられた。既に述べた通り、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、グアニンヌクレオチドにより阻害を受けないが、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは強力な阻害を受ける。従って、両菌株間では、異なる核酸代謝調節機構が機能しているものと考えられる。核酸代謝は、生物の営みにとって極めて重要な事項である

ため、その調節は非常に厳密になされているものと推定される。グアニンヌクレオチドにより阻害を受けない *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの存在によって、*E. coli* の核酸代謝系に混乱が生じ、生育速度低下をもたらされたものと考えられる。実際、*E. coli* においては、グアニンヌクレオチドによる阻害を受けなくなった変異型 *E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼの導入による生育阻害が報告されている(Peterson 1999)。

本論文では述べないが、転写解析実験により、本遺伝子の転写開始点は、塩基番号 481 番の A であることが明らかとなった。この転写開始点直近には、*E. coli* $\sigma^{70}$(Rosenberg et al. 1979)及び *B. subtilis* $\sigma^{A}$(Moran et al. 1982)認識配列と相同性の高い配列、TTGTCA(-35)並びに TATAAT(-10)が存在した。これは、本遺伝子が *E. coli* にて高発現したことと合致する。

*Exiguobacterium acetylicum* ATCC 953 は、 *E. coli* と同様、2 種のプリンヌクレオシド利用経路の両方を併せ持つことが明らかとなった。2 種のプリンヌクレオシド利用経路の活性と growth phase との関係について検討を行ったところ、2 種の経路は growth phase によって使い分けられていることが示唆された。すなわち、イノシン-グアノシンキナーゼによる経路は、増殖期に、もう一方の経路は、定常期に利用されている可能性が考えられた。イノシン－グアノシンキナーゼによる経路は、一分子のヌクレオシドーリン酸生成に一分子の ATP を消費する。これに対し、もう一方の経路では、一分子のヌクレオシドーリン酸生成に二分子の ATP を消費する。従って、増殖期において、エネルギー効率の高いキナーゼ経路を利用することは合理的である。定常期においては、もう一方のヌクレオシド利用系は、ヌクレオチドの生成ばかりでなく、その第一段階にてヌクレオシドより生成するリボースをエネルギー源として利用するためにも機能しているものと考えられる。

## 第六章 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用いたイノシン及びグアノシンのリン酸化

### 6－1 緒言

本研究にて見出されたグアニンヌクレオチドによって阻害を受けない *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用いることによって、グアノシンのリン酸化が進行する可能性が考えられた。そこで、この酵素を用いたATP再生反応と共役させたヌクレオシドのリン酸化について検討を行った。

### 6－2 材料と方法

#### 材料

[$^{14}$C]guanosine、及び[$^{14}$C]inosineは、Moravec社(Brea, CA, USA)より購入した。

#### 菌株、プラスミド及び培地

ATP再生菌として野生株 *Corynebacterium amoniagenes* ATCC 6872株よりイノシン生産菌(イノシン分解弱化菌)として誘導された *Corynebacterium amoniagenes* ATCC 21477株を使用した。*Corynebacterium glutamicum* は、野生株 ATCC 13869 株より誘導された AJ 12036 株を使用した。*Corynebacterium glutamicum* 及び *Corynebacterium ammoniagenes* での *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の発現には、pHSG299とpAM330(Miwa et al. 1984, Yamaguchi et al. 1986)より構築された *E. coli* とのシャトルベクターである pVK7(杉本ら、未発表)を用いた。*C.*

*glutamicum* 及び *C. ammoniagenes* の通常の培養には、CM2G(Miwa et al. 1985)培地を使用した。尚、CM2G 培地の組成は、5 g/l glucose, 10 g/l polypeptone(第五栄養), 10 g/l yeast extract(Difco), 5 g/l NaCl (pH 7.2)である。

*Corynebacterium glutamicum* 及び *Corynebacterium ammoniagenes* の形質転換

既報(Stuible et al. 1996)に基き、エレクトロポレーション法により行った。

酵素活性測定法

*Corynebacterium glutamicum* にて発現させたイノシン-グアノシンキナーゼ活性測定は、以下に述べる方法にて行った。形質転換体を、50ml の 20 g/l glucose, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/l urea, 1 g/l $KH_2PO_4$, 0.01 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.4 mg/l $MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$, 2 mg/l thiamine-HCl, 10 mg/l biotin, 0.1 g/l DL-methionine, 40 mg/ml カナマイシンより成る培地を用い、32℃にて培養した。 菌体を遠心分離により回収し、0.9% (w/v) NaCl にて 2 度洗浄を行った後、2 ml の Buffer F(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM DTT)に懸濁した。超音波により破砕を行い、破砕残渣を遠心分離により除去した後、PD-10 ゲルろ過カラム(Pharmacia 社、Uppsala, Sweden)を用いて低分子物質の除去を行ったものを粗酵素抽出液とした。イノシン－グアノシンキナーゼ活性測定は、以下の組成の反応液を用い、反応容量 50 μl にて反応を行った。100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP, 0.04 mM [$^{14}$C]guanosine, 0.16 mM guanosine 及び 5 μl 粗酵素抽出液。反応液を 30℃にてインキュベートし、その 2 μl をシリカゲルプレート Art 5715(Merck, Whitehouse, NJ, USA)にスポットした。1-butanol-ethanol-water (2:1:1(容量比))にて展開し、風乾後、標識化合

物の検出と定量を富士写真フィルム社製 Bio-Image analyzer BAS2000 にて行った。

*Corynebacterium ammoniagenes* にて発現させたイノシン-グアノシンキナーゼ活性測定は、以下に述べる方法にて行った。形質転換体を、50ml の 50 g/l glucose, 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 5 g/l urea, 1 g/l $KH_2PO_4$, 3 g/l $K_2HPO_4$, 0.01 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.004 g/l $MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$, 0.1 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 mg/l thiamine-HCl, 0.01 g/l Ca-D-pantothenic acid, 30 μg/l biotin, 0.02 g/l L-Cys-HCl, 10 g/l polypepton, 10 g/l yeast extract, 0.3 g/l アデニン, 40 μg/ml カナマイシンより成る培地(Kotani et al. 1978)を用い、32℃にて培養した。以後の操作は、上記 *C. glutamicum* を用いた場合と同様に行った。

ヌクレオシドリン酸化反応

形質転換体を 0.1 g/l アデニン及び 40 μg/ml カナマイシンを含む CM2G 寒天培地を用いて 32℃にて 24 時間培養した。1/6 プレートの菌体を、50 ml の酵素活性測定法の項で述べた培地を用いて 32℃にて 24 時間培養し、得られた菌体を用いてヌクレオシドリン酸化反応を行った。リン酸化反応は、20 ml の次の組成の反応液(Mori et al. 1997)にて行った。50 g/l inosine または 25 g/l guanosine, 20 g/l $KH_2PO_4$, 30 g/l glucose, 5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ml/l xylene, 4 g/l Nymeen S-215 (polyoxyethylene stearylamine, Nippon Oil and Fats, Tokyo, Japan), 10 g/l phytic acid, 及び 200 g 湿重量/l 形質転換体。反応は、32 ℃、pH 7.2 、700 rpm にて攪拌しつつ行った。反応 pH は、4 M NaOH を用い、適宜調整を行った。また、リン酸の定量をフォスファ B－テストワコー(和光純薬)を用いて行い、リン酸化により消費されたリン酸基の補充を $KH_2PO_4$ 添加により行った。

核酸類の定量

Asahipak GS-220カラムを用いたHPLCにて核酸類の分離・定量を行った。溶離液は、0.2 M $NaH_2PO_4$ (pH 4.0)を使用し、カラム温度は、50℃、流速は、1.5 ml/minにて分離を行い、波長254 nmのUV吸収により検出を行った。

## 6－3 結果

### 6－3－1 *Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドの構築

*Corynebacterium ammoniagenes*における遺伝子発現に関する報告は数例しかないことから、*Exiguobacterium acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現にあたって、表6－1に挙げた4種類のプロモーターをそのリボソーム結合配列と共に用い、その発現量の検討を行った。検討に使用した4種類のプロモーターは、*C. glutamicum*にて機能することが報告されている*E. coli tac*プロモーター、*E. coli trp* プロモーター、*C. glutamicum* にて高発現することが報告されている *C. glutamicum* 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*odhA*)プロモーター、及び、*E. coli* $\sigma^{70}$ 認識配列(Rosenberg et al., 1979)と高い相同性を有する *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子自身のプロモーターである。*E. coli tac* プロモーターは、市販の発現プラスミド pDR540(Amersham-Pharmacia社)の *Pst* I 及び *Bam* HI 切断により得られた断片を利用した。*E. coli trp*プロモーターは、次のプライマー、

5'-GG<u>CTGCAG</u>CAAATATTCTGAAATGAGCT-3' (下線部 *Pst*I 認識部位) 及び

5'-CC<u>GGATCC</u>ACCCTTTTTACGTGAACTTG-3' (下線部 *Bam*HI 認識部位)を用い、PCRにより増幅した。

*C. glutamicum odhA* 遺伝子プロモーターは、次のプライマー、

5'-GG<u>CTGCAG</u>CGAAGCCGTTATCCTCAACG-3' (下線部 *Pst*I 認識部位)

表６－１　本研究で使用したプロモーター配列とリボソーム結合配列

| Promoter | promoter sequence | | | ribosome binding sequence |
|---|---|---|---|---|
| | -35 | (space) | -10 | |
| *E. coli tac* | TTGACA | (16) | TATAAT | AGGAAA |
| *E. coli trp* | TTGACA | (18) | TAACTA | AGGGGT |
| *Coryne. glutamicum odhA* | TTGGCA | (20) | TATTCT | AGGAGA |
| *Exiguo. acetylicum gsk* | TTGTCA | (16) | TATAAT | AGGTGG |

及び、

5'-CCGGATCCACAGTTCTCCTAAAAATAAC-3' (下線部 *Bam*HI 認識部位)を用い、PCR により増幅した。

*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ構造遺伝子は、次のプライマー、5'-CCGGATCCAAATGAATAAAATCGCGGTA-3' (下線部 *Bam*HI 認識部位)及び、5'-CCGGTACCACCTCCCTTTTATCATTTCT-3' (下線部 *Kpn*I 認識部位)を用い、PCR により増幅した。

得られたそれぞれのプロモーター及び *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ構造遺伝子を制限酵素で切断した後、pVK7 に連結し、発現ベクターを構築した。構築した発現プラスミドを、それぞれ、pVKP$_{tac}$*gsk*、pVKP$_{trp}$*gsk*、pVKP$_{odh}$*gsk* と呼ぶこととする。プロモーター領域を含む *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子としては、第五章で述べた *E. acetylicum* 染色体より得た *Kpn*I-*Eco*RI 断片を用いた。しかし、この断片を pVK7 に連結した発現ベクターを構築することはできなかった。

構築した発現プラスミドを、エレクトロポレーション法により *C. glutamicum* AJ 12036 株に導入した。得られた形質転換体より粗酵素抽出液を調製し、イノシン-グアノシンキナーゼ活性の測定を行った。その結果を表６－２に示す。いずれのプロモーターを用いた場合にも、イノシン-グアノシンキナーゼ活性が検出され、従来報告されていた通り、これらのプロモーターが *C. glutamicum* において機能することが確認された。従って、発現プラスミドは目的通り構築されているものと考えられた。今回の実験の範囲では、*E. coli trp* プロモーターを利用した pVKP$_{trp}$*gsk* を導入した場合に最も高い発現が認められた。

そこで、次に、得られた発現プラスミドをエレクトロポレーション法により *C. ammoniagenes* ATCC 21477 株に導入した。得られた形質転換体より粗酵素抽出液を調製し、イノシン-グアノシンキナーゼ活性の測定を行った。その結果を表６－３に

表６－２ *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の *C. glutamicum* での発現

| Plasmid | Specific activity (mU/mg protein) | |
|---|---|---|
| | Guanosine | Inosine |
| pVK7 | 0.4 | 0.4 |
| pVKP$_{tac}$*gsk* | 56 | 8.2 |
| pVKP$_{trp}$*gsk* | 1,500 | 200 |
| pVKP$_{odh}$*gsk* | 48 | 6.5 |

表６－３ *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の *C. ammoniagenes* での発現

| Plasmid | Specific activity (mU/mg protein) | |
|---|---|---|
| | Guanosine | Inosine |
| pVK7 | 18 | 10 |
| $pVKP_{tac}$ *gsk* | 337 | 48 |
| $pVKP_{trp}$ *gsk* | 7,200 | 1,381 |
| $pVKP_{odh}$ *gsk* | 100 | 9.4 |

示す。*C. glutamicum* に導入した場合と同様、いずれのプロモーターを用いた場合にも、イノシン-グアノシンキナーゼ活性が検出され、これらのプロモーターが *C. ammoniagenes* において機能することが確認された。*C. ammoniagenes* を宿主とした場合においても、今回の実験の範囲では、*E. coli trp* プロモーターを利用した $pVKP_{trp}gsk$ を導入した場合に最も高い発現が認められた

### 6－3－2　ATP 再生反応と共役させたイノシン及びグアノシンのリン酸化

前節にて述べた通り、ATP 再生菌 *C. ammoniagenes* での *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の発現を検討した結果、*E. coli trp* プロモーターを利用した $pVKP_{trp}gsk$ を導入した場合に最も高い発現が認められたことから、この株を用いて、ヌクレオシドのリン酸化反応を行った。結果を表6－4に示す。

イノシンリン酸化反応においては、図6－1に示したように、反応は速やかに進行し、30 時間の反応で、186 mmol/l イノシンより 152 mmol/l のイノシン酸が生成した。この時のモル転換率は、82%であり、イノシンのリン酸化法としても有効であることが明らかとなった。グアノシンのリン酸化反応においては、88.3 mmol/l グアノシンより 14 mmol/l のグアニル酸の生成を確認することができた。イノシンリン酸化によるイノシン酸生成に比し、グアノシンリン酸化よるグアニル酸生成の転換率は、蓄積したグアニル酸より算出した場合、低い値となるが、これは、反応液中に多数の菌体と、ATP が存在することにより、生成したグアニル酸が、さらにリン酸化を受け、GDP や GTP へと変換されるためであると推定された。実際、反応 24 時間後には基質グアノシンの残存は認められず、また、グアニル酸の生成に伴い反応液中に GDP 及び GTP が生成することが認められた(図6－2)。

表６－４ *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子を発現させた *C. ammoniagenes*を用いたATP再生反応との共役によるイノシン及びグアノシンのリン酸化

| origin of the *gsk* gene introduced | IMP (mM) | GMP (mM) |
|---|---|---|
| none | n.d. | n.d. |
| *E. coli* | 44 | 0.8 |
| *E. acetylicum* | 150 | 14 |

186 mmol/l のイノシン、88.3 mmol/l のグアノシンを基質として用いた。

n.d.: 検出されず。

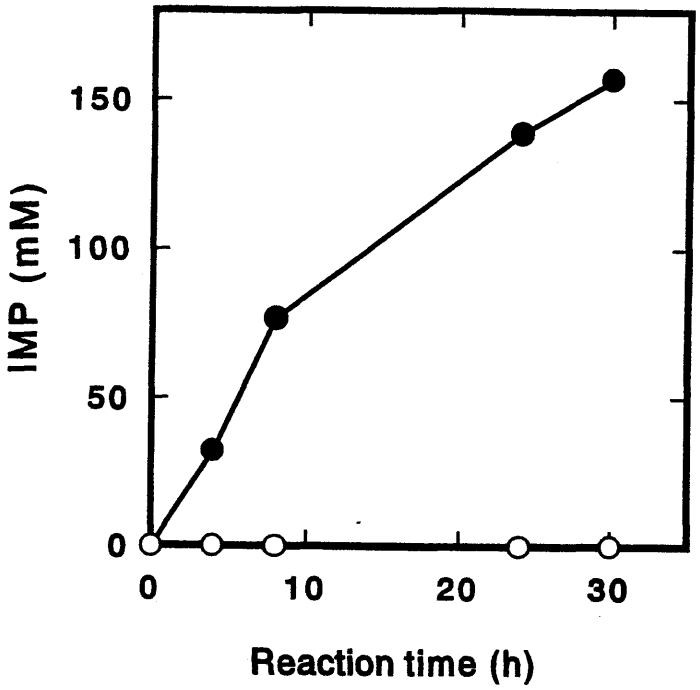


図６－１　*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子を発現させた *C. ammoniagenes* を用いた ATP 再生反応との共役によるイノシンのリン酸化
○はベクターのみ導入した *C. ammoniagenes* を使用した場合、●は、*E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子を発現させた *C. ammoniagenes* を使用した場合を示す。

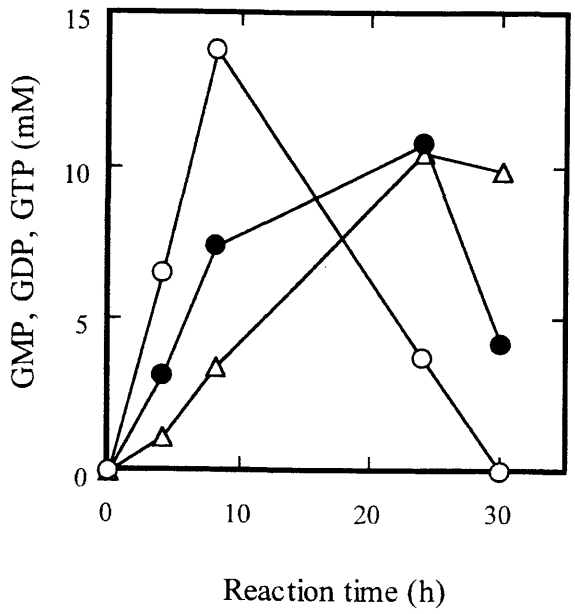


図６－２　グアノシンリン酸化反応時に生成する 5'-GDP 及び 5'-GTP

○はグアニル酸、●は GDP、△は GTP を示す。

## 6－4 考察

グアニンヌクレオチドで阻害を受けない *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを利用することにより、これまで報告の無かったイノシン－グアノシンキナーゼを用いたATP再生反応との共役によるグアノシンのリン酸化に成功した。しかしながら、生成したグアニル酸は速やかに消失することから、実用には改善の必要がある。このグアニル酸消失の主原因は、グアニル酸の GDP、GTP への変換と考えられた。

本章では ATP 再生菌として工業的に使用されている *C. ammoniagenes* での *E.acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の発現を行った。実際の検討に使用した既存の3種類のプロモーター(それ自身のリボソーム結合配列と共に用いた)のうち、*E. coli trp* プロモーターを用いた場合に最も高い発現が認められた。本菌株は、イノシン、イノシン酸、キサンチル酸、ATP等の核酸類の製造(Kotani et al. 1978, Teshiba et al. 1984, Misawa et al. 1969, Fujio et al. 1983, Fujio et al. 1985)やイノシン酸、グアニル酸、CDP コリン等の製造における ATP の再生反応(Mori et al. 1997, Furuya et al. 1971, Fujio et al. 1997a, Fujio et al. 1997b)などにおいて工業利用されている菌株であることから、本菌株での遺伝子発現に関する知見は、利用価値が高いと考えられる。

最も高い発現が認められた *E. coli trp* プロモーターを利用した *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドを導入した株を用いて、ヌクレオシドのリン酸化反応を実施した。イノシンリン酸化反応は速やかに進行し、モル転換率 82%を得たことから、イノシンのリン酸化法としても有効と考えられた。これまで報告の無かったイノシン－グアノシンキナーゼを用いたグアノシンのリン酸化についても、グアニル酸の生成を確認することが出来た。しかしながら、モル転換率は16%とイノシンのイノシン酸への転換率と比較した場合、低いものであった。この低収率の主原因は、反応液中に多数の菌体(菌体由来酵素群)と、ATP が存在することにより、

生成したグアニル酸が、さらにリン酸化を受け、GDP や GTP へと変換されるためであると推定され、実際、グアニル酸の生成に伴い、反応液中に GDP 及び GTP が生成することが認められた。図6－2において、生成グアニンヌクレオチドの総和(グアニル酸＋GDP＋GTP)は、添加した基質の総和に満たないが、反応 24 時間後には基質グアノシンが既に検出されないことから、この原因として、GDP、GTP がさらにリン酸化され ppGpp 等が生成した可能性、グアノシンが分解され基質が一部消失した可能性が考えられた。第二章で述べたように、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを用い ATP 再生系と共役させた方法では、グアノシンのリン酸化は確認されなかった。これは、この酵素が、微量の GDP、GTP で強力に阻害を受けること、この反応液中には大量の菌体(菌体由来酵素群)と ATP が存在し、生成したグアニル酸がさらにリン酸化を受け、GDP や GTP へと変換されると考えられることから、これら反応副生物が、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼを阻害しているためと考えられる。第四章で述べたように、本研究で新たに見出した *E. acetylicum* 由来イノシン－グアノシンキナーゼは、GDP、GTP で阻害を受けないことから、これら反応副生物存在条件下においてもグアノシンのリン酸化に成功したものと考えられる。

本章では ATP 再生菌 *C. ammoniagenes* でイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の発現を行うことにより1種類の菌株で反応を行っている。この方法は、第二章で述べたイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子高発現菌体を別途添加し2種の菌株で反応を行う方法に比較し有利な点が存在する。そのひとつは、一種類の菌株を用いることから、基質や生成物の分解を抑制するための菌株の育種が容易であることである。本論文ではデータを示していないが、2種菌株反応では、加えたイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子高発現菌株(*E. coli*)に由来する基質分解活性のため、添加基質に対する生成物収率が1種菌株反応に比較して低い。もう一つは、反応プロセスの簡略化である。2種類の菌株を用いる方法では、イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子高発現菌株を別途培養する必要がある。このことは、実用的観点からは、反応

工程と培養設備の両面から負担となる。従って、今後、ATP 再生菌 *C. ammoniagenes* での発現量制御や発現時期制御など遺伝子発現技術を高度化させることによって、本プロセスをより効率的なものへと改善していくことが可能と考えられる。

## 第七章　総合考察

核酸系調味料であるイノシン酸、グアニル酸の世界的規模での需要増に対応した増産体制構築のため、抜本的新製法の開発の基盤を検討した。

現行の核酸系調味料の工業生産方法の中で直接発酵に比較し高収率であるイノシン及びグアノシン発酵の優位性を生かし、リン酸化設備の簡略化が期待できる酵素的なイノシン及びグアノシンのリン酸化法を、核酸系調味料需要増に早期に対応可能かつ競争力ある方法として選択し、その開発を行った。

その基盤を開発することには成功したものの、イノシンのイノシン酸へのモル転換率及びグアノシンのグアニル酸へのモル転換率はそれぞれ、82%、16%と工業化観点からは充分とは言えず、改善の必要がある。イノシンのイノシン酸への転換率向上には、第二章の考察で述べたように、ATP再生菌の培養方法変更が有効と考えられる。グアノシンのグアニル酸への転換率向上には、第六章の考察で述べたように、GDP、GTPの副生を抑制することが有効と考えられる。

また、ATP再生菌 *C. ammoniagenes*でイノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子の発現を行う1菌株法を採用した。これは、従来報告されている2菌株法に比し、反応収率向上や反応工程および反応設備簡略化といった点で有利と考えられる。

さらに、本研究は以下のように学術的にも興味深い知見を見出した。

第一に、*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼがグアニンヌクレオチドでフィードバック阻害を受け、ピリミジンヌクレオチドで活性化されることを見出し、本酵素が菌体内ヌクレオチドプールを制御している可能性を示した。

第二に、これまでその存在が稀とされていたイノシン－グアノシンキナーゼ活性を特異的に検出する方法を確立し、新規なイノシン－グアノシンキナーゼを見出した。

第三に、精製した新規イノシン－グアノシンキナーゼの性質を検討し、*E. coli*由来イノシン－グアノシンキナーゼとは異なり、グアニンヌクレオチドで阻害されないことを見

出した。

第四に、新規イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列が、これまでに報告されている糖キナーゼと相同性を持つが、*E. coli* 由来イノシン－グアノシンキナーゼ遺伝子とは高い相同性は持たないことを見出した。

第五に、イノシン－グアノシンキナーゼ活性は対数増殖期初期に高く、その後減少し、他のプリンヌクレオシド利用経路の活性と対照的であることを見出した。

本研究は、核酸系調味料の新製造法開発を主眼とした研究であるが、別の観点からは、従来の化学反応プロセスの酵素反応プロセスへの置換研究ということができる。近年、環境問題の顕在化から、従来の化学反応プロセスの生物反応プロセスへの置換といった環境調和型プロセスや、生物反応を活用した環境修復が重要視されてきている。一方、有用微生物探索研究の進展、培養が困難な微生物からの遺伝子取得技術の開発、ゲノム配列解読研究の急速な進展による新規遺伝子の発見など有用遺伝子資源の充実と、酵素立体構造に基づく酵素改変技術、進化分子工学、代謝工学など酵素創製技術や育種技術の高度化が相俟って、目的に応じた生物プロセス構築の基盤が整備されつつある。今後、これらを駆使し、微生物や酵素の探索と改変によって有用微生物や有用酵素を創製することを通じて社会の要請に応え、貢献していきたい。

## 引用文献


Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410 (1990)

Anderson, P. E., Nucleoside and nucleotide kinases. In "The enzymes", 3rd edn, eds. Boyer, P. D., Academic Press, New York, pp. 49-96 (1973).

Andres, C. H., and Fox, I. H., Purification and properties of human placental adenosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 254, 11388-11393 (1979).

Bhaunik, D., and Datta, A. K., Reaction kinetics and inhibition of adenosine kinase from *Leishmania dovovani. Mol. Biochem. Parasitol.*, 28, 181-187 (1988).

Bochner, B. R., and Ames, B. N., Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J. Biol. Chem.*, 257, 9759-9769 (1982).

Bork, P., Sander, C., and Valencia, A., Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Science*, 2, 31-40 (1993).

Brockman, W. R., Biochemical aspects of mercaptopurine inhibition and resistance. *Cancer Res* , 23, 1191-1201 (1963).

Brunngraber, E. F., and Chargaff, E., A nucleotide phosphotransferase from *Escherichia coli. Biochemistry*, 12, 3005-3012 (1973).

Brunngraber, E. F., and Chargaff, E., Purification and properties of a nucleoside phosphotransferase from carrot. *J. Biol. Chem.*, 242, 4834-4840

(1967).

Caputto, R., The enzymatic synthesis of adenylic acid; adenosine kinae. *J. Biol. Chem.*, 189, 801-814 (1951).

Chang, C. H., Cha, S., Brockman, R. W., and Bennet, L. L., Kinetic studies of adenosine kinase from L1210 cells: A model enzyme with a two-site ping-pong mechanism. *Biochemistry*, 22, 600-611 (1983).

Chao, H. M., Nucleoside phosphotransferase from *Erwinia herbicola*, a new membrane-bound enzyme. *J. Biol. Chem.*, 251, 2330-2333 (1976).

Chaudhari, N., Laudin, A. M., and Roper, S. D., A metabotropic glutamate reseptor varient functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience*, 3, 113-119 (2000)

Chen, C. M. and Eckert, R. L., Phosphorylation of cytokinin by adenosine kinase from wheat germ. *Plant Physiol.*, 59, 443-447 (1977).

Combes, A., Lafleuriel, J., and Folc'h, F. L., The inosine-guanosine kinase activity of mitochondria in tubers of Jerusalem artichoke. *Plant Physiol. Biochem.*, 27, 729-736 (1989).

Datta, A. K., Bhaumik, D., and Chatterjee, R., Isolation and characterization of adenosine kinase from *Leishmania donovani. J. Bio. Chem.*, 262, 5515-5521 (1987)

Durham, J. P., and Ives, D. H., The metabolism of deoxyribonucleosides in *Lactobacillus acidophilus. Biochim.Biophys. Acta.*, 228, 9-25 (1971).

Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., and Collins, M. D., Phylogenetic

interrelationships of round-spore-forming *Bacilli* containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon, Exiguobacterium, Kurthia*, and *Planococcus. Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 74-82 (1994).

Fromm, H. J., and Ning, J., Kinetic studies of solubilized brain hexokinase with D-fructose as a substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 672-677 (1968).

Fromm, H. J., and Zene, V., Kinetic studies of the brain hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.*, 237, 1661-1667 (1962).

Fromm, H. J., Summary of kinetic reaction mechanisms. In "Methods in enzymology vol. 63", Academic Press, New York, pp 42-53 (1979).

Fujio, T., and Furuya, A., Production of ATP from adenine by *Brevibacterium ammoniagenes. J. Ferment. Technol.*, 61, 261-267 (1983)

Fujio, T., and Furuya, A.,Effects of magnesium ion and chelating agents on enzymatic production of ATP from adenine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 143-147 (1985)

Fujio, T., and Maruyama, A., Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells: Enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (Part I). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 956-959 (1997)

Fujio, T., Nishi, T., Ito, S., and Maruyama, A., High level expression of XMP aminase in *Escherichia coli* and its application for industrial production of 5'-guanylic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 840-845 (1997).

Fujio, T., Teshiba, S., and Maruyama, A., Construction of a plasmide carrying

both CTP synthetase and a fused gene formed from cholinephosphate cytidylyltransferase and choline kinase genes and its application to industrial CDP-choline production: Enzymatic production of CDP-choline from orotic acid (Part II). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 960-964 (1997)

Furuya, A., Abe, S., and Kinoshita, S., Conversion of 5'xanthylic acid to guanine and guanine nucleotides by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Biotech. Bioeng.*, 13, 229-240 (1971)

Furuya, A., Abe, S., and Kinoshita, S., Production of nucleic acid-related substances by a fermentation process. *Appl. Microbiol.*, 20, 263-270 (1970).

Hammer-Jespersen, K., Munch-Petersen, A., Nygaard, P., and Schwartz, M., Induction of enzyme involved in the catabolism of deoxyribonucleosides and ribonucleosides in *Escherichia coli* K 12. *Eur. J. Biochem.*, 19, 533-538 (1971).

Harlow, K. W., Nygaard, P., and Hove-Jensen, B., Cloning and characterization of the *gsk* gene encoding guanosine kinase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177, 2236-2240 (1995).

Hawkins, C. F., and Bagnara, A. S., Adenosine kinase from human erythrocytes: Kinetic studies and characterization of adenosine kinase. *Biochemistry*, 26, 1982-1987 (1987).

Henderson, J. F., Mikoshiba, A., Chu, S. Y., and Caldwell, I. C., Kinetic studies of adenosine kinase from *Ehrlich* ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 247, 1972-1975 (1972).

Hove-Jensen, B., and Nygaard, P., Role of guanosine kinase in the utilization

of guanosine for nucleotide synthesis in *Escherichia coli. J. Gen. Microbiol.*, 135, 1263-1273 (1989).

Ikeda, S., Chakravarty, R., and Ives, D. H., Multisubstrate analogs for deoxynucleoside kinases. *J. Biol. Chem.*, 261, 15836-15843 (1986).

Ipata, P. L., Gini, S., and Tozzi, M. G., In vitro 5-phosphoribosyl 1-phosphate-independent salvage biosynthesis of ribo- and deoxyriboadenine nucleotides in *Bacillus cereus. Biochim. Biophys. Acta.*, 842, 84-89 (1985).

Ipata., P. L., Gualerzi, C., Scolozzi, C., Tozzi, M. G., Trinei, M., and Barsacchi, D., Occurrence of inosine kinase as a distinct enzyme in *Spirulina platensis. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209, 547-553 (1995).

Jensen, K. F., Two purine nucleoside phophorylases in *Bacillus subtilis.* Purification and some properties of the adenosine-specific phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 525, 346-356 (1978).

Jochimsen, B., Nygaard, P., and Vestergaard, T., Location on the chromosome of *Escherichia coli* of genes governing purine meabolism. *Mol. Gen. Genet.*, 143, 85-91 (1975).

Kotani, Y., Yamaguchi, K., Kato, F., and Furuya, A., Inosine accumulation by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes* strain improvement and culture conditions. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 399-405 (1978).

Kuninaka, A., Nucleotides and related compounds. In "Biotechnology", 2nd edn, eds.Rehm, H.-J., and Reed, G., VCH, Weinheim, pp. 561-614 (1996).

Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).

Ma, G. T., Hong, Y. S., and Ives, D. H., Cloning and expression of the heterodimeric deoxyguanosine kinase/deoxyadenosine kinase of *Lactobacillus acidophilus* R-26. *J. Biol. Chem.*, 270, 6595-6601 (1995)

Magill, J. M., Dalke, P., Lyda, T. S., and Magill, C. W., Adenosine kinase-deficient mutant of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 152, 1292-1294 (1982).

Malumbres , M., Gil, J., and Martin, J. F., Codon preference in corynebacteria. *Gene*, 134, 15-24 (1993)

Mannervik, B., A branching reaction mechanism of glutathione reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 1151-1158 (1973).

Mathews, I. I., Erion, M. D., and Ealick, S. E., Structure of human adenosine kinase at 1.5 A resolution. *Biochemistry*, 37, 15607-15602 (1998).

Matsui, H., Sato, K., Enei, H, and Hirose, Y., Production of guanosine by psicofuranine- and decoynine- resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1739-1744 (1979).

Matsui, H., Sato, K., Enei, H., and Takinami, K., 5'-Nucleotidase activity in improved inosine-producing mutants of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2347-2352 (1982)

Meyers, M. B., and Kreis, W., Purification of deoxycitidine kinase from two P815 murine neoplasms and their separation from deoxyguanosine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 177, 10-15 (1976).

Meyskens, F. L., and Williams, H. E., Adenosine metabolism in human

erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 240, 170-179 (1971)

Miller, R. L., Adamczyk, D. L., and Miller, W. H., Adenosine kinase from rabbit liver. I. Purification by affinitiy chromatography and properties. *J. Biol. Chem.*, 254, 2339-2345 (1979)

Miller, W. H., and Miller, R. L., Guanosine kinase from *Trichomonas vaginalis. Mol. Biochem. Parasitol.*, 48, 39-46 (1991).

Minouni, M., Bontemps, F., and Van den Berghe, G., Kinetic studies of rat liver adenosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 269, 17820-17825 (1994).

Misawa, M., Nara, T., Udagawa, K., and Kinoshita, S., Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. Part XXII. Fermentative production of 5'-xanthylic acid by a guanosine auxotroph of *Brevibacterium (Corynebacterium) ammoniagenes. Agric. Biol. Chem.*, 33, 370-376 (1969)

Miwa, K., Matsui, H., Terabe, M., Nakamori, S., Sano, K., and Momose, H., Cryptic plasmids in glutamic acid producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2901-2903 (1984)

Miwa, K., Matsui, K., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S., and Sano, K., Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum. Gene*, 39, 281-296 (1985).

Moran, C. P., Lang, Jr. N., Legrice, F. J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J., and Losick, R., Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus Subtilis. Mo. Gen. Genet.*, 186, 339-

346 (1982)

Mori, H., Iida, A., Fujio, T., and Teshiba, S., A novel process of inosine 5'-monophosphate production using overexpressed guanosine/inosine kinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 693-698 (1997).

Mori, H., Iida, A., Teshiba, S., and Fujio, T., Cloning of a guanosine-inosine kinase gene of *Escherichia coli* and characterization of the purified gene product. *J. Bacteriol.*, 177, 4921-4926 (1995).

Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Miwa, K., and Sano, K., Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003. *J. Biotechnol.*, 5, 305-312 (1987)

M$\phi$llgaard, H., Deoxyadenosine/deoxycytidine kinase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 255, 8216-8220 (1980).

Nakayama, K., Sagamihara, Furuya, A., Kawasaki, Kato, F., Process for producing inosine. US patent 3736228 (1973)

Nara, T., Misawa, M., Komuro, T., and Kinoshita, S., Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes Part XXX. Effect of antibiotics and surface active agents on 5'-purinenucleotide production by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric Biol. Chem.*, 33, 1198-1204 (1969)

Palella, T. D., Andres, C. M., and Fox, I. H., Human placental adenosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 255, 5264-5269 (1980).

Park, I., and Ives, D. H., Kinetic mechanism and end-product regulation of deoxyguanosine kinase from beef liver mitochondria. *J. Biochem.*, *117*, 1058-1061

(1995).

Peterson, P., Inhibition of cellular growth by increased guanine nucleotide pools. *J. Biol. Chem.*, 274, 5348-5356 (1999).

Rosenberg, M., and Court, D., Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.*, 13, 319-353 (1979)

Rotllan, P., and Miras Portugal, M. T., Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur. J. Biochem.*, 151, 365-371 (1985).

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harnor, N.Y. (1989)

Sanger F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467 (1977)

Schwartzenberg, K., Kruse, S., Reski, R., Moffatt, B., and Laloue, M., Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *The Plant J.*, 13, 249-257 (1998).

Shields, D. C., and Sharp, P. M., Synonymous codon usage in *Bacillus subtilis* reflects both translational selestion and mutational biases. *Nucleic Acids Res.*, 15, 8023-8040 (1987)

Shirae, H., and Yokozeki, K., Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Brevibacterium acetylicum* ATCC 954. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 493-499 (1991)

Sigrell, J. A., Cameron, A. D., Jones, T. A., and Mowbray, S., Structure of

*Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 A resolution: insights into a new family of kinase structure. *Structure*, 6, 183-193 (1998).

Smith, E., and Morrison, J. F., Kinetic studies of the arginine kinase reaction. *J. Biol. Chem.*, 244, 4224-4234 (1969).

Stuible, H. P., Wagner, C., Andreou, I., Huter, G., Haselmann, J., and Schweizer, E., Identification and functional differeciation of two type I fatty acid synthases in *Bevibacterium ammoniagenes. J. Bacteriol.*, 178, 4787-4793 (1996).

Teshiba, S., and Furuya, A., Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium (Corynebacterium) ammoniagenes.* IV. Excretion mechanisms of 5'-IMP. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1311-1317 (1984)

Tomisek, A. J., Hoskins, A. P. V., and Raid, M. R., Chromatographic studie of purine metabolism VI. inhibition of inosine phosphorylase by 6-mercaptopurine. *Cancer·Res.*, 25, 1925-1932 (1965).

Usuda, Y., Tsujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., and Matsui, H., Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* (*'Brevibacterium lactofermentum'*AJ 12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology*, 142, 3347-3354 (1996)

Wachsman, J. T., and Morgan D. D., Deoxynucleoside kinase of *Bacillus megaterium* KM. *J. Bacteriol.*, 105, 787-792 (1971).

Wang, L., Hellman, U., and Eriksson, S., Cloning and expression of human

mitochondrial deoxyguanosine kinase cDNA. *FEBS Lett.*, 390, 39-43 (1996).

Yamaguchi, R., Terabe, M., Miwa, K., Tsuchiya, M., Takagi, H., Morinaga, Y., Nakamori, S., Sano, K., Momose, H., and Yamazaki, A., Determination of the complete nucleotide sequence of *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and analysis of its genetic information. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2771-2778 (1986)

Yoshikawa, M., Kato, T., and Takenishi, T., Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 42, 3505-3508 (1969).

Yoshikawa, M., Kato, T., and Takenishi, T., Studies of phosphorylation. III. Selective phosphorylation of unprotected nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 42, 3505-3508 (1969)

Zimmerman, F. E., and Magasanik, B., Utilization and interconversion of purine base and ribonucleosides by *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, 239, 293-300 (1964).

謝辞

本論文の作成にあたり多大なご指導を賜りました、東京大学・分子細胞生物学研究所　徳田元教授にこころより御礼申し上げます。

本研究の遂行にご尽力頂いた味の素株式会社　西山徹博士、上田憲貞氏、田中崇博士に深く感謝致します。

本研究遂行にあたり、終始ご激励頂きましたタイ味の素　宇多川隆博士、味の素株式会社　倉橋修博士に深く感謝致します。

味の素株式会社発酵技術研究所　臼田佳弘博士、島岡恵氏には、共同研究者として多大なるご協力を頂きました。ここに深く感謝致します。

本研究にご助言、ご協力頂きました味の素株式会社　大西幾正博士、福田尚夫氏、山本洋子氏、山城章宏氏、村尾悟氏に感謝致します。

本研究に技術的なご協力を頂きました、味の素株式会社　福地直之博士、今井孝夫氏、長谷川修氏、石川武丕氏、阿部英樹氏、村田倫子氏、室野井登美子氏に感謝致します。

## 論文目録

(1) Kawasaki, H., Shimaoka, M., Usuda, Y., and Utagawa, T., End-product regulation and kinetic mechanism of guanosine-inosine kinase from *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 972-979 (2000).

(2) Kawasaki, H., Usuda, Y., Shimaoka, M., and Utagawa, T., Development of an improved assay for purine nucleotide kinase activity in cell extracts and detection of inosine kinase activity in *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953, related species, and *Corynebacterium flaccumfaciens* ATCC 6887. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 761-766 (2000).

(3) Kawasaki, H., Usuda, Y., Shimaoka, M., and Utagawa, T., Phosphorylation of guanosine using guanosine-inosine kinase from *Exiguobacterium acetylicum* coupled with ATP-regeneration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2259-2261(2000)

## 関連論文

(1) Usuda, Y., Kawasaki, H., Shimaoka, M., and Utagawa, T., Characterization of guanosine kinase from *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953. *Biochim. Biophys. Acta*, 1341, 200-206 (1997).

(2) Usuda, Y., Kawasaki, H., Shimaoka, M., and Utagawa, T., Molecular cloning and transcriptional analysis of a guanosine kinase gene of *Brevibacterium acetylicum* ATCC 953. *J. Bacteriol.*, 179, 6959-6964 (1997).

(3) Usuda, Y., Kawasaki, H., Shimaoka, M., and Utagawa, T., Molecular characterization of guanosine kinase gene from a facultative alkalophili, *Exiguobacterium aurantiacum* ATCC 35652. *Biochim. Biophys. Acta*, 1442, 373-379 (1998).