

氏名	野崎博之
----	------

(論文内容の要旨)

本論文は、 $\alpha$ -メチル-L-セリンの酵素的合成に利用しうる $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼの2種の酵素を研究対象として、その酵素化学的諸性質の解明、当該遺伝子の取得、 $\alpha$ -メチル-L-セリン及びその誘導体の大量合成への有用性を示したものである。

(1)  $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼは、D-アラニンを基質としてテトラヒドロ葉酸を介したヒドロキシメチル基の転移反応を触媒し、 $\alpha$ -メチル-L-セリンを生成する酵素として、1960年代に報告されていたが、その後の研究例は皆無であった。本酵素による立体選択的な $\alpha$ -メチル-L-セリンの合成法に着目して、新たに本酵素を産生する微生物を自然界より分離することに成功した。高活性を示した *Paracoccus* 属細菌、*Aminobacter* 属細菌、*Ensifer* 属細菌より、目的酵素の単離に成功した。本酵素が $\alpha$ -メチル-L-セリンに特異的に作用して、 $\alpha$ -メチル-D-セリン、L-セリン、D-セリンには作用しないことを明らかにし、反応速度定数などの諸性質を明らかにした。また、本酵素がピリドキサルリン酸含有酵素であり、アラニンラセマーゼ活性を有することを示した。さらに、遺伝子のクローニングに成功し、本酵素の一次構造を初めて明らかにし、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼと相同性があることを示した。次いで、当該遺伝子を *Escherichia coli* によって発現させ、菌体反応によるD-アラニンから $\alpha$ -メチル-L-セリンへの変換について検討し、ホルムアルデヒドとテトラヒドロ葉酸の自発的縮合による5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の再生系を利用して、立体選択的に収率65モル%(対D-アラニン)にて $\alpha$ -メチル-L-セリンが合成可能なことを示した。

(2) 前述酵素を利用した  $\alpha$ -メチル-L-セリン合成には、ヒドロキシメチル基の転移にテトラヒドロ葉酸が必要であるが、テトラヒドロ葉酸は工業的な観点では光や酸素に感受性を有する不安定な化合物である。そこで、テトラヒドロ葉酸を介さないヒドロキシメチル基の転移反応を触媒する新規な酵素  $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼの存在の可能性に着目した。自然界より、目的酵素を産生する微生物を探索し、*Ralstonia* 属細菌、*Variovorax* 属細菌、*Bosea* 属細菌に活性を見出した。本酵素を精製し、本酵素がヒドロキシメチル基の転移を伴う  $\alpha$ -メチル-L-セリンと L-アラニンの相互変換を触媒することを示し、 $\alpha$ -メチル-L-セリン合成反応においては基質であるホルムアルデヒドによる阻害を明らかにした。本酵素も前述酵素と同様に、ピリドキサーリン酸含有酵素であり、アラニンラセマーゼ活性を示すことを解明した。さらに、遺伝子のクローニングに成功し、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼと相同性があることを示した。当該遺伝子を発現させた *Escherichia coli* を用い、L-アラニン及びホルムアルデヒドから  $\alpha$ -メチル-L-セリンへの変換について検討し、立体選択的に収率 90 モル%以上(対 L-アラニン)にて  $\alpha$ -メチル-L-セリンが合成できることを示した。さらに、本酵素の基質特異性を利用し、L-2-アミノ酪酸を基質とした  $\alpha$ -エチル-L-セリン変換反応においても収率 90 モル%以上の高収率で変換可能なことを示した。

以上の結果より、 $\alpha$ -メチル-L-セリンの合成に関与する  $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼあるいは  $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼが関与する反応を利用することにより、立体選択的に  $\alpha$ -メチル-L-セリンを大量合成できることが示された。とりわけ、 $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼの利用により高収率での合成が可能であり、これにより酵素法による  $\alpha$ -メチル-L-セリンの工業的生産法の基盤が確立された。

氏名	野崎博之
----	------

(論文審査の結果の要旨)

$\alpha$ -メチルアミノ酸は非タンパク質構成アミノ酸の1種であり、四級炭素を有する構造的に安定な化合物である。それゆえ、ペプチドへの導入により、インヒビター等への利用が期待され、効率的な合成法に関する研究は有意義である。酵素反応を利用した $\alpha$ -メチル-L-セリンの合成研究は $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼによるものはあったが、収量や酵素自体の性質解明は限定的であった。本研究では本酵素の酵素化学的性質の解明と、その応用を研究対象としている。加えて、本酵素の基質となるテトラヒドロ葉酸の安定性を考慮し、テトラヒドロ葉酸を介さない新規酵素 $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼの存在の可能性に着目し、アルドラーゼ反応による、新規で効率的な $\alpha$ -メチル-L-セリンの酵素合成法の確立を目指したものである。以下、本研究の主な成果を挙げる。

- (1)  $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを産生する微生物を探索し、新たに分離された3種の微生物から酵素を精製し、遺伝子の同定に成功しており、微生物学、酵素化学的に意義のある知見が得られている。酵素化学的な諸性質の解明により、アラニンラセマーゼ活性の検出など新たな知見が見出されている。また、本酵素の一次構造の解明は初めての知見であり、これは一連のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ族酵素の立体構造解析等による機能改変の基礎となり得る成果である。さらに、本酵素遺伝子を高発現させた *Escherichia coli* を触媒として利用する、立体選択的な $\alpha$ -メチル-L-セリンの合成法が示されており、工業的に応用可能な実用性の高い成果も含まれている。

(2) 類似反応を触媒するスレオニンアルドラーゼなどの研究例の知見を踏まえ、新規な酵素である $\alpha$ -メチルセリンアルドラーゼの存在の可能性に着目し、その存在を実証したことは、微生物学、酵素化学的に有意義で、興味深い知見である。アミノ酸に作用する既知のアルドラーゼは、その多くがグリシンに作用するが、本酵素はL-アラニンに作用し、グリシンには作用しない特徴ある性質を有する。これは、微生物の産生する酵素が多様な可能性を有していることを示唆するものである。また、本酵素の酵素化学的諸性質の解明と遺伝子の同定がなされており、前述の $\alpha$ -メチルセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの研究で得られた成果と合わせて、同族に分類可能なヒドロキシメチルトランスフェラーゼやアルドラーゼの構造機能解析の基礎情報を提供するものである。 $\alpha$ -メチル-L-セリンの合成については、ホルムアルデヒドによる基質阻害を考慮し、基質濃度を制限する方法を採用することによって、立体選択的かつ高効率な合成が可能となることを示しており、応用的観点からも価値の高い知見が得られている。合わせて、 $\alpha$ -エチル-L-セリン合成への応用についても、立体選択性や収量の点で満足できる結果が示されており、本論文で確立された方法は、 $\alpha$ -アルキル-L-セリン化合物の一般的な合成法となり得るものである。

以上の成果は、微生物学、酵素化学という基盤研究と、酵素反応を利用した $\alpha$ -メチルアミノ酸の工業的製法という応用研究にまたがる応用微生物学領域での価値ある成果として評価できる。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年12月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。