

氏名	とやま ひろ ひで
	外山 博 英
学位(専攻分野)	博士 (農学)
学位記番号	農博第 714 号
学位授与の日付	平成 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Studies on Structure and Function of Thermostable Alanine Racemase from <i>Bacillus stearothermophilus</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> の耐熱性アラニンラセマーゼの構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 左右田健次 教授 山田秀明 教授 熊谷英彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

アラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1) はピリドキサルリル酸を補酵素とし、アラニンを特異的にラセミ化する酵素である。本酵素は細菌独特の D-アミノ酸代謝や、細胞壁のペプチドグリカン合成に中心的役割を果たしており、新規抗生物質開発の重要な標的酵素と目されている。本酵素は細菌に広く分布しているが、中でも好熱性細菌 *Bacillus stearothermophilus* のアラニンラセマーゼは高い耐熱性を示すことから、興味深い研究対象となっている。

本研究においては、本耐熱性酵素の高次構造と耐熱性機構ならびに触媒機能との相関性の解明を主目的としている。まず、ホモ二量体のサブユニット構造形成が本酵素の機能発現に必須であることを明らかにし、さらに各サブユニットは大小二つのドメインより構成されることを示した。各ドメインに相当するペプチドをそれぞれ別個に発現させる系を確立した。各ドメインに相当する二種のペプチド二組からなる断片酵素は野生型酵素とほぼ同様の高次構造を持ち、生体内でも試験管内でも高次構造形成の単位となっていることを明らかにした。また、断片酵素の安定性の若干の低下はペプチド鎖間の結合力の低下に起因することを示した。以上の結果から、本耐熱性アラニンラセマーゼの高い安定性は、ペプチド鎖内及びペプチド鎖間の結合力の強さに基づくことを明らかにした。研究の具体成果の主な内容は次の通りである。

1. 特定の濃度以上の塩酸グアニジン存在下で本酵素の電子スペクトル及び見かけの分子量が大きく変化することを見いだした。本酵素の塩酸グアニジンによる変性過程を解析した結果、二量体が単量体に解離すると共に、酵素活性が消失することを明らかにした。このようにサブユニット構造形成が酵素機能発現に必須であることを示した。

2. ズブチリシンなどによる限定分解を行い、二つのペプチドに分断されること、及び分断された酵素も活性をもつことを示した。また、生成する二つのペプチド断片は酵素サブユニットの構造上のドメインに相当すると推定した。一方、常温菌、*Salmonella typhimurium* 由来の酵素も同様の処理により断片化

されるが、ほぼ完全に失活することから、分断酵素における活性は各酵素の安定性と関連すると推論した。

3. ドメインに相当すると考えられる大小両ペプチドをそれぞれ別個に発現させる系を確立した。両者を同じ大腸菌細胞内で同時に発現させ、両ペプチド各々二個より構成される複合体（断片酵素）を単離、精製した。断片酵素の活性や熱安定性は野生型酵素に比べ若干劣るものの、その高次構造は野生型酵素とほぼ同様であることを示した。各ドメインに相当するペプチドをそれぞれ別個の大腸菌内で発現させることはできなかったが、同時に同一の大腸菌内で発現させると両者は高次構造形成の単位となって、互いに会合して安定化され、活性な複合体である断片酵素を形成することを明らかにした。

4. 断片酵素の塩酸グアニジンによる変性過程を野生型酵素の場合と比較した。断片酵素の安定性の低下は、主に二種のペプチドの会合体である断片サブユニット相互の結合力の低下に起因し、野生型酵素の高い安定性はサブユニット間の強固な結合力に基づくことを示した。

5. 断片酵素において大ペプチドがピリドキサルリン酸と結合している。しかし、大ペプチド単独では、ピリドキサルリン酸と反応させてもシッフ塩基を形成せず、活性も示さない。これに別個に単離、再生させた小ペプチドを添加すると、大小ペプチドは会合し、活性を発現した。すなわち活性発現のためには両ペプチドが適正なヘテロ四量体として会合し、より安定な立体構造を取る必要のあることを明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

アラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1) はピリドキサルリン酸を補酵素としてアラニンの両エナンチオマーのラセミ化を触媒する。本酵素は細菌に広く分布しており、細菌の D-アミノ酸代謝や細胞壁のペプチドグリカン合成に不可欠な役割を果たしている。しかし、本酵素の重要性と裏腹に、その構造や機能に関する詳細は研究はほとんど行われていない。

本論文において著者は、好熱性細菌、*Bacillus stearothermophilus* の耐熱性アラニンラセマーゼのサブユニット及びドメイン構造と活性の相関について調べ、さらに本酵素の耐熱性の機構についても検討している。本研究の成果として評価すべき点は次の通りである。

1. 本酵素の塩酸グアニジンによる変性過程を、種々の電子スペクトル及び見かけの分子量の変化に基づいて解析し、二量体が単量体に解離すると共に、酵素活性が消失することを明らかにした。サブユニット構造形成が本酵素の機能発現に必須であることを示した。

2. 本酵素のプロテアーゼによる限定分解の結果から、サブユニット中に大小二つのドメインが存在すること、さらにドメインに相当するペプチドに分断された酵素も活性を持つことを示した。常温菌 *Salmonella typhimurium* 由来の酵素も同様の処理によって断片化されるが、ほぼ完全に失活することから、本耐熱性酵素の高い耐熱性はペプチド鎖内及びペプチド鎖間の強固な相互作用に基づくことを明らかにした。

3. ドメインに相当する両ペプチドを遺伝子工学的手法を用いてそれぞれ発現させる系を確立した。各ドメインに相当する両ペプチドを大腸菌の別個の細胞で発現させることはできなかった。しかし、それぞれを同一の細胞内で発現させた場合には、活性な複合体（断片酵素）を形成させることができた。ドメインに相当する別個のペプチドから活性な複合体を形成させたのは、これが初めての例である。両ペプチド

各々二個より構成される断片酵素を単離、精製した。断片酵素の活性や熱安定性は野生型酵素より若干低いものの、その高次構造は野生型酵素と同様であることを示した。これら両ペプチドは単独では細胞内で不安定であるが、共存すると会合して、安定で活性なヘテロ四量体構造を形成することを明らかにした。

4. さらに、断片酵素の塩酸グアニジンによる変性過程を野生型酵素の場合と比較した。断片酵素の安定性の低下は、主として二種のペプチドの会合体である断片サブユニット相互の結合力の低下に起因することを示した。野生型酵素の安定性はサブユニット内だけでなく、サブユニット間の強固な結合力に基づくことを明らかにした。

5. 断片酵素からドメインに相当する両ペプチドを単離した。断片酵素においては、大ペプチドがピリドキサルリン酸と結合するが、大ペプチド単独ではピリドキサルリン酸とシッフ塩基を形成せず、活性も示さない。しかし、別個に再生させた小ペプチドをこれに添加すると、大小両ペプチドは正しい分子認識のもとに会合し、活性が発現することを示した。ドメインに相当するペプチドを試験管内で会合させ、活性をもつ断片酵素を形成させたのは、これが初めての例である。

以上のように本論文は、耐熱性アラニンラセマーゼのサブユニット及びドメイン構造に関しての新事実を明らかにすると共に、耐熱性酵素の耐熱性発現機構に関しても新知見を加えたものであり、酵素化学及び微生物化学に寄与するところが大きい。

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4年2月21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。