

氏名	しば さき たけし 柴 崎 剛
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2356 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	SCREENING AND APPLIED STUDIES OF MICROBIAL PRO- LINE HYDROXYLASES (微生物におけるプロリン水酸化酵素の探索とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 清水 昌 教授 加藤 暢 夫 教授 江崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は医薬品合成原料、化粧品原料となるトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (Hyp) 生産法の開発に関するものである。プロリンの水酸化反応により L-プロリンから Hyp への実用的酵素変換法を確立するために行った、Hyp 微量定量法の開発、微生物からのプロリン 4 位水酸化酵素のスクリーニング、本酵素の諸性質の解明と遺伝子クローニング、および Hyp 生産系の構築に関する成果をまとめたものである。本論文は、3 章よりなり、主な内容は以下に示すとおりである、

1. ヒドロキシプロリン、プロリンの全ての光学異性体をピコモル量で分離検出するために、光学分割カラムによる分離と 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole による蛍光誘導体化に基づくイミノ酸の高感度高速液体クロマトグラフィー微量定量法を確立した。
2. 上記の定量法を用いて、プロリン水酸化酵素を広く微生物界に探索し、*Streptomyces* 属、*Dactylosporangium* 属、*Amycolatopsis* 属などヒドロキシプロリン含有抗生物質エタマイシン生産菌を含む 8 株の放線菌に活性を見いだした。最も高い活性を示した *Dactylosporangium* sp. RH 1 株より本酵素を収率 12.8% で 3,300 倍に精製し、分子量約 30,000 のタンパク質をプロリン水酸化酵素本体と結論した。精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列をもとに染色体 DNA ライブラリーから 272 アミノ酸残基から成るタンパク質 (推定分子量 29,715) をコードする遺伝子をクローン化した。推定一次構造上には 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼの保存配列 His モチーフ (...His · X · Asp ...) が保存されていたが、全一次構造を通じて高い相同性を示す配列は報告がないことを示した。
3. 放線菌由来遺伝子の高発現化のために 5' 末端 26 アミノ酸に相当する部分のコドンのカセット変異法により大腸菌での多用コドンに置換し、トリプトファンプロモーターを直列に二つ連結したプロモーターの支配下に置くことで、本酵素活性を元株の約 1,600 倍に上昇させることに成功した。さらに、宿主大腸菌のプロリン分解酵素遺伝子 *putA* を P1 トランスダクション法によりトランスポゾンで破壊した株を造成し、本株をグルコース含有栄養培地で培養することで培地に添加した L-プロリンが定量的に Hyp (41 g/l) へ転換できることを示した。また、培養液中には Hyp 以外のヒドロキシプロリン異性体は検出されず、水酸化反応が位置および立体特異的に進行することも確認した。この際、反応に必要な 2-オキソグルタル酸はグルコースから効率的に供給されること、反応産物のコハク酸は代謝的にリサイクルされることも示唆した。よって、Hyp の工業生産プロセスが確立された。
4. プロリン 4 位水酸化酵素に換えて宿主大腸菌にプロリン 3 位水酸化酵素遺伝子を導入することで、上記と同様の方法によりシス-3-ヒドロキシ-L-プロリンの生産が可能であることを示した。
5. グルコースから直接発酵的に L-プロリンが生成する条件下でも Hyp の生産を可能にするため、L-プロリンによるフィードバック阻害が解除されたプロリン生合成酵素をコードする *proB74* および *proA* をプラスミド上に導入し、宿主大腸菌で発揚させた株を造成した。本株を用いると、発酵生産的に生成した L-プロリンが効率よく Hyp に変換し、96 時間の培養で、25 g/l の Hyp が蓄積することを明らかにした。これにより、基質である L-プロリンを培地に添加することなく、グルコースから Hyp を直接発酵生産できるプロセスが確立された。

6. プロリン 4 位水酸化酵素と同時に新たに見いだされたプロリン 3 位水酸化酵素のアイソザイム遺伝子を、プロリン 3 位水酸化酵素 type I の起源株である *Streptomyces* sp. TH 1 株よりクローン化し、type II と命名した。Type I と II 遺伝子は共に 870bp であり、推定アミノ酸の相同性は 76.2% であった。いずれも 2-オキソグルタル酸ジオキシゲナーゼの保存配列である His モチーフの保存が確認された。3 位と 4 位水酸化酵素の間には相同性は認められなかった。また、組換え大腸菌から精製した 3 位水酸化酵素と 4 位水酸化酵素は、比活性が 7,150 U/mg および 12,700 U/mg と異なる以外は類似した性質を示すことも明らかとなった。

7. 上記 3 種のプロリン水酸化酵素はペプチド状プロリン、D-プロリン、イミノ基またはカルボキシル基が修飾された L-プロリンを基質としないこと、一方、環状 α -イミノ酸は 4 員環から 6 員環のものが基質となることを示し、それぞれの反応産物の単離同定結果から、各酵素がプロリンに対する反応性を良く反映した位置および立体特異性を保持していることが判明した。

論文審査の結果の要旨

トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (Hyp) は医薬品合成原料、化粧品原料などとして有用であるが、その製法は動物コラーゲンの加水分解法によっていた。しかし、動物起源の病原体混入の危険性、廃液による環境汚染などの問題があり、より安全で環境負荷の低い製法が求められていた。L-プロリンは発酵法により安価に製造されており、この 4 位を水酸化する Hyp 製造法が考えられるが、有機化学的方法での位置および立体特異的水酸化は困難である。そこで、著者は酵素的な水酸化法を選択し、遊離 L-プロリンを水酸化するプロリン 4 位水酸化酵素を微生物に求め、酵素的なプロリン水酸化による Hyp の工業的生産法を確立するに至った。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 高速液体クロマトグラフィーにより、光学異性体を区別し、かつ高感度なヒドロキシプロリンおよびプロリンの特異的定量法を確立することで、微小なプロリン 4 位水酸化酵素活性の探索を可能とした。
2. 上記微量定量法および静止菌体反応を用いて、広く微生物界にプロリン 4 位水酸化酵素活性を探索し、複数の属の放線菌に本酵素活性を見いだした。
3. プロリン 4 位水酸化酵素を精製し、その遺伝子を初めてクローン化した。放線菌由来の取得遺伝子を使用コドン改良などにより大腸菌中で高発現させた。自然界には微量しか存在しない酵素も、遺伝子組換え技術の利用により大量に発現させることで活性増強を行い、物質生産に利用できることを示した。
4. 酵素反応に必要な共役基質 2-オキソグルタル酸を、より安価で安定なグルコースから菌体内で代謝変換させることにより効率的に供給する反応システムを構築し、プロリンの酵素的な水酸化による Hyp の工業的製法を確立した。このプロセスでは、水酸化酵素の反応性が厳密であるため他の異性体を生じないこと、宿主大腸菌のプロリン分解酵素遺伝子の破壊によりプロリンから Hyp への転換反応が定量的に進行することを示した。
5. フィードバック阻害が解除された ProB タンパク質をコードする proB74, proA, およびプロリン 4 位水酸化酵素遺伝子を宿主大腸菌に導入することにより、大腸菌が本来生合成しない物質である Hyp の直接発酵生産法を確立した。
6. プロリン 3 位水酸化酵素のアイソザイム type II 遺伝子をクローン化した。プロリン 3 位水酸化酵素を組換え大腸菌より大量に取得し、詳細な性質を明らかにした。
7. プロリン水酸化酵素の基質特異性を調べ、本酵素がいわゆるプロリンヒドロキシラーゼとは異なる基質特異性を持つことを明らかにした。また、4 から 6 員環の環状 α -イミノ酸が本酵素の基質となることを見だし、反応産物を単離し、化学構造を決定した。プロリン水酸化酵素が Hyp だけでなく、光学活性な合成原料として有用な種々の水酸化環状 α -イミノ酸の生産にも使用できる可能性を示した。

以上のように本論文はスクリーニングにより新たにプロリン 4 位水酸化酵素を見だし、これを用いた Hyp の工業的生産法を確立したのみならず、プロリン水酸化酵素の基質特異性などの基礎的性質を解明したもので、応用微生物学、酵素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 13 年 1 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。