

氏名	あし 芦	うち 内	まこと 誠
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	論農博第2056号		
学位授与の日付	平成8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	STRUCTURE AND FUNCTION OF GLUTAMATE RACEMASE (グルタミン酸ラセマーゼの構造及び機能)		
論文調査委員	(主査) 教授 左右田健次	教授 加藤暢夫	教授 木村 光

論文内容の要旨

グルタミン酸ラセマーゼは、細菌細胞壁ペプチドグリカンを構成するD-グルタミン酸の生合成に関与しており、ピギドキサリリン酸を含まないユニークなアミノ酸ラセマーゼである。本論文は、グルタミン酸ラセマーゼの構造及び機能を生化学、分子生物学の立場から総合的に解析した結果をまとめたものである。本研究の主な成果は次の通りである。

1. 乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* 由来の本酵素遺伝子の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を決定した。データベースに登録されている各種タンパク質との相同性を調べたところ、本酵素と各種哺乳類のミオグロビンとの高い相同性が認められた。特に、ミオグロビンのヘム結合領域と高い類似性を示す領域が本酵素に見いだされた。本酵素活性はヘミンによって阻害され、また、本酵素のヘミンとの結合定数は $3.7\mu\text{M}$ と算出された。本酵素はヘミンと1:1のモル比で結合して複合体を形成し、ヘモグロビンと類似する電子スピン共鳴スペクトルを示した。これによって、本酵素にはヘミン結合部位が存在することが明らかになった。

2. 大腸菌をはじめとする真正細菌は、いずれもペプチドグリカンにD-グルタミン酸を含有するにもかかわらず、その生合成経路はこれまで不明であった。本研究において、大腸菌のD-グルタミン酸要求変異株のD-グルタミン酸要求性を相補する遺伝子産物の一次構造が *P. pentosaceus* のグルタミン酸ラセマーゼのそれと高い相同性を示すことを見いだした。大腸菌遺伝子ライブラリー由来の *murI* をクローニングし、その上流にリボソーム結合部位を導入したところ、このクローン株は顕著なグルタミン酸ラセマーゼ活性を示した。*murI* の上流には明確なりボソーム結合部位は存在せず、ビタミン B_{12} レセプタータンパク質遺伝子 *btuB* と重複したポリシストロニック構造を持つことから、*murI* は細胞内で特異な発現制御を受けていると推論された。三種のグルタミン酸ラセマーゼの一次構造を比較したところ、保存性の高い三つの領域が存在することが判明した。これらの領域に対応する混合プライマーを作製し、各種の細菌染色体を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、その増幅産物の塩基配列を調べた結果、*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* など、実験に供した全ての菌種でグルタミン酸ラ

セマーゼ遺伝子と考えられる遺伝子断片の増幅が認められた。これによって、本酵素遺伝子が広く細菌に分布することがはじめて実証された。

3. グルタミン酸ラセマーゼは疎水性アミノ酸を多く含むため、遺伝子を高発現させると不活性な封入体を形成し、本酵素調製の大きな障害となっていた。大腸菌の分子シャペロン遺伝子 *groESL* と本酵素遺伝子を同一宿主内で共発現させたところ、このクローン株の本酵素活性が著しく上昇することを見いだした。また、*groESL* 共発現系で生産された本酵素の大半は可溶性画分に存在することが判明した。さらに、本共発現系を利用すると、本酵素はイオン交換カラムクロマトグラフィー1段階で均一状態に精製できることを示した。これによって、大腸菌の本酵素の大量発現系が確立された。

4. グルタミン酸ラセマーゼの特異的阻害剤には抗菌剤としての応用が期待できる。本酵素の *O*-スルホセリンに対する作用を調べた結果、本酵素は *O*-スルホセリンの α, β -脱離反応を触媒するとともに、その反応過程で不活性化されることを見いだした。[1-¹⁴C]*O*-スルホセリンを用いて不活性化させた酵素には、酵素と等モルの *O*-スルホセリンが取り込まれていた。この不活性化酵素から2種類の放射活性ペプチドが単離され、活性発現に必須な73及び184番目のシステイン残基をそれぞれ含むことが明らかになった。両システイン残基を各々アラニン残基に置換した変異酵素 C73A 及び C184A はグルタミン酸のラセミ化を触媒しないが、*O*-スルホセリンの α, β -脱離反応を触媒し、反応の進行とともに不活性化された。これによって、本酵素によるグルタミン酸のラセミ化反応には73及び184番目の両システイン残基が共に必須であるのに対し、*O*-スルホセリンの α, β -脱離反応には必須でないことが示された。

論文審査の結果の要旨

D-グルタミン酸は、細菌のペプチドグリカンを構成するD-アミノ酸の一つである。細菌におけるD-グルタミン酸は、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、あるいはグルタミン酸ラセマーゼの作用で合成されると予想されていたが、これまで両酵素の細菌における分布はともに限られていたため、D-グルタミン酸の生合成経路は不明であった。それとともに、ピリドキサルリン酸を含まないユニークな本アミノ酸ラセマーゼの構造及び反応機構の解明が望まれていた。

本論文において、著者は、乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* 由来のグルタミン酸ラセマーゼの一次構造がアスパラギン酸ラセマーゼの他に各種哺乳類のミオグロビンのそれと高い相同性を示すことを見いだした。本酵素はヘミンによって不活性化されることを見だし、本酵素とヘミンの結合定数を求めるとともに、本酵素とヘミンの不活性化複合体を多角的に解析し、本酵素にヘミン結合部位が存在することを示した。

次に、大腸菌のD-グルタミン酸要求変異株のD-グルタミン酸要求性を相補する遺伝子 *murI* のクローニング及び発現に成功し、本遺伝子がグルタミン酸ラセマーゼをコードすることを明らかにした。さらに、起源の異なるグルタミン酸ラセマーゼの間で高度に保存されている領域に相当するプライマーを用いたPCR解析の結果、本酵素遺伝子は細菌に広く分布し、D-グルタミン酸生合成に重要な役割を果たすことを証明した。

一方、グルタミン酸ラセマーゼは総じて疎水性アミノ酸に富み、そのため、本酵素遺伝子を高発現させ

ると不活性な封入体を形成しやすく、このことが本酵素調製の大きな障害となった。分子シャペロン遺伝子 *groESL* と本酵素遺伝子を共発現させる新しい系を開発し、本酵素を可溶性画分に生産させることに成功するとともに、精製においても効率よく均一状態にできることを示し、本酵素の大量生産法を確立した。

さらに、筆者は、本酵素の新規不活性化剤として *O*-スルホセリンを取り上げ、速度的解析を行った。すなわち、*O*-スルホセリンの α, β -脱離反応を触媒するとともに、その反応過程で不活性化されることを見いだし、*O*-スルホセリンが本酵素の自殺基質として作用することを証明している。 ^{14}C 標識化 *O*-スルホセリンを用いるトレーサー実験によって、サブユニットあたり1分子の *O*-スルホセリンの修飾を受けて不活性化することを実証した。さらに、*O*-スルホセリンによる修飾部位を追跡し、73及び184番目のシステイン残基の同定に成功している。両システイン残基をアラニンに置換した変異酵素 C73A 及び C184A は、*O*-スルホセリンによって不活性化されることから、グルタミン酸のラセミ化反応に必須の73及び184番目のシステイン残基の両者が共に存在しなくても、*O*-スルホセリンの α, β -脱離反応を触媒できることを明らかにした。

以上のように、本研究はこれまで不明であったグルタミン酸ラセマーゼの構造及び機能を生化学、分子生物学、さらには生物有機化学の立場から多角的に解析しており、微生物生化学、酵素科学などの発展に大きく貢献するものである。

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8年2月15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。