

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	水 谷 拓
論文題目	Screening and application of microbial enzymes useful for the synthesis of bioactive S-substituted cysteine compounds (生理活性を示すS-置換システイン類の合成に有用な微生物酵素の探索と応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>S-置換システイン類は、主に<i>Allium</i>属植物に含まれる二次代謝産物である。中でも、ニンニクに最も多く含まれるS-置換システインスルフォキシドである(+)-L-アリインは、抗糖尿病や抗心筋虚血などの生理活性を示すことが知られている。また、更なる代謝を受けることにより生理活性を有するさまざまな含硫化合物に変換されることから、食品添加物や医薬品用途において有用な化合物として注目を集めている。これまで(+)-L-アリインは、野菜としてのニンニクや、ニンニクから抽出して得られるエキスを通して摂取されてきた。そのため、原料供給の不安定性や、食品資源との競合が懸念されている。本論文は、微生物酵素を利用して入手容易な基質から(+)-L-アリインをはじめとしたS-置換システイン類を生産することを目的として、有用微生物酵素の探索と、当該酵素を利用したバイオプロセスの構築を行ったものである。</p> <p>第1章では、アリルメルカプタンとアミノ酸前駆体を基質に、S-アリル-L-システイン(L-SAC)合成反応を触媒する微生物酵素の探索を行った。</p> <p>アリルメルカプタン、アンモニア、ピルビン酸を基質としたL-SAC合成反応を検討し、当該活性を大腸菌に見いだした。大腸菌の無細胞抽出液から活性酵素を精製し、当該酵素をトリプトファナーゼ (TnaA) と同定した。精製酵素を用いたL-SACの合成反応及び分解反応を検討し、TnaAが高濃度の基質存在下でL-SACの合成を触媒する一方、L-SACの分解も触媒しアンモニアとピルビン酸を生じることを見いだした。このことから、TnaAがα,β-脱離の逆反応によりL-SACの合成を触媒していることが明らかになった。</p> <p>続いて、L-SACの更なる高効率な酵素合成を目指し、不可逆なL-SAC合成を触媒する酵素の候補として、トリプトファンシンターゼ (TrpAB) に着目した。TrpABの発現抑制を回避するため、L-トリプトファンを含まないアミノ酸混合物であるカザミノ酸を用いた培地にてさまざまな微生物を培養し、これらを対象にアリルメルカプタンとL-セリンを基質とするL-SACの合成活性を評価した。結果として、<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp. <i>hydrophila</i> NBRC 3820に最も高い活性を見いだした。本株のTrpAB (AhTrpAB) 遺伝子をクローニングし、精製酵素や当該酵素の高発現菌体を触媒とした反応において大腸菌由来TrpAB (EcTrpAB) と活性を比較することにより、AhTrpABがEcTrpABよりも顕著に高い活性を有していることを見いだした。これらの結果より、高いL-SAC合成活性を有する微生物酵素としてAhTrpABを選抜した。</p> <p>第2章では、L-SACのスルフォキシド化について検討を行った。当該反応を触媒する微生物酵素として、α-ケトグルタル酸 (α-KG) 依存性アミノ酸水酸化酵素に着目した。当該酵素には、アミノ酸の水酸化に加え、S-置換システインを基質とした立体選択的スルフォキシド化を触媒するものが存在する。これまでさまざまなα-KG依存性ア</p>			

ミノ酸水酸化酵素が報告されているが、S-置換システインに対する活性はほとんど未解明であった。そこで、当研究室が有するアミノ酸水酸化酵素群を対象に、S-置換システインのスルフォキシド化活性を評価することで、高い活性や新たな選択性を持つ酵素の探索を行った。結果として、L-SACを基質とした反応において、L-イソロイシン4位水酸化酵素 (IDO) が最も高い(+)-L-アリン合成活性を示すことを見いだした。一方、L-イソロイシン3'位水酸化酵素 (HilA) 及びL-ピペコリン酸4位水酸化酵素 (FgPip4H) が、(-)-L-アリンを優先的に合成することを見いだした。さらに、IDOとFgPip4HがD体のSACに対してもスルフォキシド化活性を示し、それぞれ(+)-D-アリン、(-)-D-アリンを優先的に合成することを新たに見いだした。

第3章では、AhTrpABとIDOを組み合わせたS-置換システインスルフォキシドのワンポット合成法の構築を行った。両酵素を共発現する大腸菌を構築し、得られた形質転換株の菌体を生体触媒として、100 mM L-セリン、150 mM アリルメルカプタン、150 mM α -ケトグルタル酸を基質に (+)-L-アリン合成反応を行った。結果として、30 mMの(+)-L-アリンが合成できたが、L-セリン及びL-SACが大腸菌の内在酵素により分解されていることが示唆された。第1章において、大腸菌内在のTnaAがL-SACに対する分解活性を持つことが明らかになっていたため、宿主の*tnaA*を破壊した共発現菌体を作製し、菌体を反応に用いたところ、(+)-L-アリン合成量は65 mMまで向上した。続いて、さまざまなチオールを基質として同様の反応を行ったところ、天然には希少な誘導体や、天然には報告のないものを含むさまざまなS-置換システインスルフォキシドが合成することに成功した。以上のように、(+)-L-アリンのみならず、さまざまなS-置換システインスルフォキシドを合成しうるバイオプロセスを構築した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ニンニクに代表される *Allium* 属植物は薬用植物として紀元前から利用されてきた。*Allium* 属植物が有する薬効は、主に S-置換システイン類やその誘導体に起因することが明らかになっており、これらの化合物に対する需要が増加している。一方で、現在、当該化合物の供給源は植物に限られており、食品資源との競合が懸念されるため、新たな生産法が望まれていた。本論文では、微生物酵素の探索を通して、入手容易な基質から (+)-L-アリインをはじめとした S-置換システイン類を生産するバイオプロセスが構築されている。評価すべき点として、以下の 3 点があげられる。

1. アリルメルカプタン、ピルビン酸、アンモニアを基質とし、 α,β -脱離反応の逆反応により L-SAC を合成する微生物酵素として、大腸菌由来トリプトファナーゼ (TnaA) を見いだした。さらに、アリルメルカプタンと L-セリンから L-SAC を合成する高活性酵素として、*A. hydrophila* ssp. *hydrophila* NBRC 3820 由来トリプトファンシンターゼ (AhTrpAB) を選抜した。
2. L-SAC の (+)-L-アリインへの変換反応を触媒する微生物酵素として、L-イソロイシン 4 位水酸化酵素 (IDO) を見いだした。さらに、L-イソロイシン 3'位水酸化酵素 (HilA) 及び L-ピペコリン酸 4 位水酸化酵素 (FgPip4H) に (-)-L-アリインを優先的に合成する活性を見いだした。また、IDO に D-SAC から (+)-D-アリインを優先的に合成する活性、FgPip4H に D-SAC から (-)-D-アリインを優先的に合成する活性を見いだした。
3. AhTrpAB と IDO を共発現する組換え大腸菌を構築し、菌体触媒として用いることで、安価な基質から (+)-L-アリインをワンポットで合成するバイオプロセスを構築した。さらに、さまざまなチオールを基質とすることで、天然には希少な、あるいは報告のない S-置換システインスルフォキシドを合成した。

以上のように、本論文は、S-置換システイン類に関して、微生物酵素を用いる効率的合成法を構築するとともに、S-置換システイン類の合成ならびに変換に関与する微生物酵素群の酵素学的諸性質に関する新たな知見を提供するものである。従って、発酵生理学、応用微生物学、酵素工学、応用生化学の発展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、令和 6 年 1 月 17 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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）