

氏 名	ヨウ ギョクヨン Yow Geok-Yong
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1463 号
学位授与の日付	平成 17 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Enzymological Studies of D-Amino Acid N-Acetyltransferase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> の D-アミノ酸 N-アセチルトランスフェラーゼに 関する酵素科学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

近年、分析技術の進展に伴い、動物、植物、カビ、酵母などの真核生物にも D-アミノ酸が存在し、重要な機能を果たしていることが明らかにされ、注目を集めている。基幹真核生物の一つである *Saccharomyces cerevisiae* に対する D-アミノ酸の作用を明らかにすることは、学術的にも産業的にも重要と考えられるが、これまでほとんど研究されていない。*S. cerevisiae* には、アセチル CoA から D-アミノ酸のアミノ基にアセチル基を転移する D-アミノ酸 N-アセチルトランスフェラーゼ (DNT) 活性が存在するものの、その特性や機能、D-アミノ酸代謝との関連、さらにはヒストンアセチルトランスフェラーゼなど、タンパク質のアセチル化を触媒する酵素との関連など、詳細は不明である。本研究は、DNT の酵素科学的諸性質ならびに生理的役割について検討したものであり、その内容は次のようにまとめられる。

1. *S. cerevisiae* から精製した DNT のアミノ酸配列に基づき、DNT 遺伝子をクローン化した。*Escherichia coli* を宿主として DNT 遺伝子を発現させると DNT 活性が検出され、一方、*S. cerevisiae* ゲノムの DMT 遺伝子に aureobasidin A 耐性遺伝子カセットを挿入した破壊株では、DNT 活性は完全に消失したことから、この遺伝子は確かに DNT をコードすることを証明した。タンパク質データベースでは、DNT はヒストンアセチルトランスフェラーゼの一種として登録されており、ヒストンアセチルトランスフェラーゼとして実際に機能する Hpa2p に対し高いアミノ酸配列相同性を示すことを明らかにした。

2. *E. coli* を宿主として発現させた DNT を各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。精製 DNT は、多種多様な D-アミノ酸に作用したが、L-アミノ酸には作用しないことを見いだした。DNT はヒストンのアセチル化を触媒せず、また Hpa2p は遊離の D-アミノ酸ならびに L-アミノ酸のいずれにも作用しないことを明らかにした。速度論的解析の結果、CoA はアセチル CoA に対しては拮抗阻害を、アセチル基受容体である D-トリプトファンに対しては非拮抗阻害を示したことから、アセチル CoA が最初に DNT と結合し、CoA が最後に DNT から離れる ordered bi-bi 機構により反応が進行すると結論した。

3. *S. cerevisiae* の DNT 遺伝子破壊株を各種の D-アミノ酸を含む培地で培養すると著しい生育阻害を受けるものの、DNT 過剰発現株は D-アミノ酸存在下でも良好に生育できることを明らかにした。D-フェニルアラニンを含む培地で DNT 過剰発現株を培養したところ、培地中の D-フェニルアラニンはほぼ定量的に N-アセチル-D-フェニルアラニンに転換されることを見いだした。N-アセチル-D-フェニルアラニンはすべて培地中に検出され、菌体内に蓄積しなかったことから、DNT は D-アミノ酸をアセチル化することにより菌体外へ放出し、D-アミノ酸の細胞毒性を軽減していると結論した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真正細菌はいずれも、D-アラニンや D-グルタミン酸を必須構成成分として含有するほか、細菌には多種多様な D-アミ

ノ酸を生産するものが多い。これらの点を考慮すると、発酵工程において細菌との相互作用が問題となる *S. cerevisiae* に対する D-アミノ酸の作用を解明することは、学術的にも産業的にも重要な意味がある。本研究は、*S. cerevisiae* の DNT を中心に据えて、その酵素科学的諸性質ならびに D-アミノ酸に対する解毒作用を明らかにしたものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. *S. cerevisiae* の DNT は、タンパク質データベースにおいてヒストンアセチルトランスフェラーゼとして登録されており、実際にヒストンアセチルトランスフェラーゼとして機能することが確認されている Hpa2p と DNT とは、互いにアミノ酸配列の相同性が高いことを明らかにしている。これは、これら 2 種のタンパク質の機能分化を理解する上で重要な指針を与えるものであり、評価できる。
2. DNT は D-アミノ酸に特異的に作用するものの、基質特異性は極めて広いことを明らかにしている。D-アミノ酸の特異分析や合成に DNT を利用できる可能性を示唆するもので、重要な知見といえる。ヒストンのアセチル化は生理的に極めて重要な反応であり、Hpa2p がそれを担当し、一方、*S. cerevisiae* にとって有毒な D-アミノ酸の代謝は DNT が担当することを明確に示しており、評価できる。また、一見 ping-pong bi-bi 機構の証拠と誤認されがちな速度論的解析の結果を精査し、丹念な検討を重ねることによって、実際には ordered bi-bi 機構により DNT 反応が進行することを明らかにしている。酵素科学的にも重要な知見であり、評価できる。
3. 多種多様な D-アミノ酸によって *S. cerevisiae* は生育阻害を受けるが、DNT によって D-アミノ酸はアセチル化され、菌体外に放出されることを明らかにしている。D-アミノ酸解毒における DNT の作用を明確に示すものであり、高く評価できる。

以上のように本論文は、これまで不明であった *S. cerevisiae* における DNT の機能と生理的役割、特に D-アミノ酸解毒との関連について詳細に検討したものであり、応用微生物学および酵素科学に貢献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17年1月13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。