

氏 名 リュドミラ ボリソフナ クラコーバ
Ljudmila Borisovna Kulakova
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学位記番号 農 博 第 1108 号
 学位授与の日付 平成 12 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 Studies of Cold-active Enzymes from Cold-adapted Microorganisms
 (低温適応微生物の低温活性酵素に関する研究)

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

極限環境微生物の生産する特徴的な酵素が種々開発され、その構造や機能といった基礎的な面での特性解明とともに、ユニークな応用面が種々開発され、各種の分野で実用化されている。好アルカリ菌の好アルカリ酵素や好熱菌の耐熱性酵素がその代表例といえる。一方、0℃あるいはそれ以下の低温域に好んで生育する低温菌も極限環境微生物の 1 種であるが、低温菌の分類や微生物学的特性の解明は、好熱菌や好アルカリ菌の場合に比べて進展していない。低温菌の酵素は、低温で高い活性を示し、低温での反応触媒として有用と期待されるが、実用された例は乏しい。本研究では、幅広い応用面が期待されるリパーゼとプロテアーゼを対象に、南極の海水などの低温環境に棲息する低温菌の生産する低温適応酵素を開発するとともに、酵素遺伝子のクローン化と高発現化、酵素の精製と機能解析、低温活性酵素を特徴づける酵素構造の解明を行ったものである。研究の具体的成果の概要は次の通りである。

1. 南極の海水から単離した低温菌の中から、高いプロテアーゼ活性およびリパーゼ活性を示す細菌 2 菌株を選別した。16 S リボソーム DNA の塩基配列や各種分類学的特性に基づき、各々 *Shewanella* sp. Ac 10 および *Psychrobacter* sp. Ant 300 と命名した。両菌株ともに不飽和脂肪酸の含量が高く、*Shewanella* sp. Ac 10 ではエイコサペンタエン酸とパルミトエライジン酸、*Psychrobacter* sp. Ant 300 ではドコサヘキサエン酸の含量が高いことを明らかにした。

2. *Psychrobacter* sp. Ant 300 のリパーゼ (PsyLip) 遺伝子を大腸菌 *Escherichia coli* にクローン化するとともに、クローン株より PsyLip を精製し、その低温活性酵素としての特性を明らかにした。本酵素と有意なアミノ酸配列相同性を示す *Bacillus subtilis* のプレフェルジン A エステラーゼやヒトのホルモン感受性リパーゼなどと比較すると、これらの酵素で高度に保存されているプロリン残基が、PsyLip ではグリシン残基 (Gly 244) に置換されていることを見いだした。PsyLip の Gly 244 を部位特異的にプロリン残基に置換すると、触媒活性は約 60% 低下するものの、熱安定性は向上することを明らかにした。

3. *Shewanella* sp. Ac 10 のズブチリシン様プロテアーゼ (SapSh) 遺伝子をクローン化し、そのアミノ酸配列を解析することにより、N 末端の 26 残基はシグナルペプチド、それに続く 117 残基はプロペプチドとして機能し、さらに C 末端の 249 残基も切断されて 422 アミノ酸残基からなる成熟型酵素が生成すると推論した。ズブチリシジ BPN', ズブチリシン Carlsberg, サーマターゼなどと比較することにより、アスパラギン酸残基 Asp 30, ヒスチジン残基 His 65 ならびにセリン残基 Ser 369 が SapSh の活性中心を構成すると推定した。クローン株の培養上清液から精製した SapSh の反応至適温度は、ズブチリシン Carlsberg のそれより約 20℃ 低く、5～15℃ の範囲での SapSh の比活性は、ズブチリシン Carlsberg のそれに比べて 5 倍以上大きいことを明らかにした。SapSh は他の類縁酵素に比べイオン対の数が少ないものの、Asn 251 をグルタミン酸残基に改変することにより Glu 251-Arg 247-Glu 197 という新たなイオンクラスターを導入できることをホモロジーモデリングによって推論し、Asn 251 をグルタミン酸残基に置換した変異酵素 N 251 E を調製した。N 251 E は野生型酵素に比べ、耐熱性も触媒効率も上昇していることを見いだした。

論文審査の結果の要旨

低温菌の生産する酵素は低温で高い活性を示すと考えられ、低温での反応用触媒として役立つと期待されるが、開発は進んでいない。本研究では、酵素利用の分野で幅広い応用面が期待されるリパーゼとプロテアーゼを対象に、低温で高い活性を示す酵素を生産する低温菌をスクリーニングするとともに、酵素遺伝子のクローン化と高発現化、酵素の精製と機能解析を行ったものである。本研究の評価すべき点は、次の通りである。

1. 低温で高い活性をもつリパーゼとプロテアーゼを生産する好冷菌の単離に成功し、それぞれの微生物学的特性を明らかにした。両者ともに不飽和脂肪酸含量が高く、リパーゼ生産菌 *Psychrobacter* sp. Ant 300 ではドコサヘキサエン酸、プロテアーゼ生産菌 *Shewanella* sp. Ac 10 ではエイコサペンタエン酸とパルミトエライジン酸の含量が高いことを明らかにした。

2. *Psychrobacter* sp. Ant 300 のリパーゼ遺伝子および *Shewanella* sp. Ac 10 のズブチリシン様プロテアーゼ遺伝子をそれぞれ大腸菌 *Escherichia coli* にクローン化して高発現系を構築した。また、これらの酵素が熱に不安定であるとともに、低温で高い活性を示すことを明らかにした。

3. *Psychrobacter* sp. Ant 300 のリパーゼの立体構造モデルを作製し、活性部位近傍に存在すると推定されるグリシン残基 Gly 244 をプロリン残基に改変することによって、高い熱安定性をもつ変異酵素を調製できることを示した。

4. *Shewanella* sp. Ac 10 のズブチリシン様プロテアーゼの立体構造モデルを作製し、本酵素のイオン対の数は常温菌や好熱菌の生産する類縁プロテアーゼのそれよりも著しく少なく、これが低い熱安定性の一因になっていると推論した。イオン対の数を増加させる部位特異的変異を酵素に導入することによって、耐熱性も触媒効率もともに上昇させることに成功した。

以上のように本論文は、低温菌の生産する低温で高い活性をもつリパーゼやプロテアーゼの開発に成功するとともに、それらの低温活性酵素としての特性を明らかにしたものであり、応用微生物学、応用酵素学、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12年2月10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。