

|             |                                                                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | アルド グティエズ<br>Aldo Gutierrez                                                                           |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                             |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1009 号                                                                                          |
| 学位授与の日付     | 平成 10 年 5 月 25 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 農 芸 化 学 専 攻                                                                                 |
| 学 位 論 文 題 目 | Role of Interdomain Loop of D-Amino Acid Aminotransferase<br>(D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼのドメイン間ループの役割)<br>(主査) |
| 論文調査委員      | 教 授 江 崎 信 芳    教 授 池 田 篤 治    教 授 林    力 丸                                                            |

### 論 文 内 容 の 要 旨

D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (D-AAT) は、ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を補酵素とし、種々のD-アミノ酸と $\alpha$ -ケト酸の間のアミノ基転移反応を触媒する。好熱性細菌 *Bacillus* sp. YM-1 由来の耐熱性D-AATはホモダイマーであり、各サブユニットはAsn118-Pro119-Arg120-Pro121からなる単一のループによって繋がれた2つのドメインより構成される。このループ上のアミノ酸残基はいずれも、活性中心から遠く離れており、本酵素の触媒反応には直接関与しない。しかし、触媒作用に直接関係しないループ構造が酵素の機能発現に重要な役割を果たす例がいくつか明らかにされ、酵素機能を改変するための手段としてループ構造に変異を加えるタンパク質工学的な手法の有効性が指摘されるようになった。本論文は、D-AATのドメイン間ループの構造を改変することによって、本酵素の機能がどのように変化するかを示すとともに、得られた変異酵素を用いてD-アミノ酸を効率よく生産する方法を明らかにしたものである。その結果は以下のように要約される。

1. D-AATのドメイン間ループを構成する Pro119-Arg120-Pro121をGly-Gly-Glyに置換した変異酵素、3G酵素を作製した。 $\alpha$ -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とする全反応において、3G酵素はD-アルギニン、D-ヒスチジン、D-フェニルアラニンなどのかさ高い基質に対して、野生型酵素の場合に比べ各々高い活性を示した。また、野生型酵素でみられる $\alpha$ -ケトグルタル酸による基質阻害は、3G酵素の場合には観察されなかった。一方、ストップフロー法によって、結合補酵素PLPと各種D-アミノ酸の間の半反応における動力学定数を求めたところ、3G酵素における $k_{max}$ 、 $K_d$ はともに、野生型酵素の場合よりも大きいことが明らかとなった。

2. Pro119-Arg120-Pro121をGlyあるいはGly-Gly-Gly-Gly-Glyに置換した変異酵素、各々1G酵素と5G酵素を作製し、ループに導入するグリシン残基数によって酵素活性がどのような影響を受けるかを調べた。両変異酵素は3G酵素の場合と同様、かさ高いアミノ酸に対して高い反応性を示すと同時に、 $\alpha$ -ケトグルタル酸による基質阻害を受けなかった。1G、3G、5Gの3種の変異酵素について各種アミノ酸との半反応の速度を比較したところ、分子活性 ( $k_{max}$ ) はループ長が短いほど高く、逆に基質に対する親和性 ( $1/K_d$ ) はループ長が長いほど高いという傾向がみられた。一方、 $k_{max}/K_d$ より求めた活性化自由エネルギー変化 $\Delta G^\ddagger$ は、いずれの酵素の場合も基質アミノ酸の露出表面積に比例して大きくなった。その傾斜は3種の変異酵素においてほぼ等しいけれども、いずれも野生型酵素の場合に比べて小さかった。グルタミンを基質とした場合の $\Delta G^\ddagger$ は野生型酵素と5G酵素においてほぼ等しく、グルタミンよりかさ高いアミノ酸を基質とした場合は野生型酵素が、グルタミンより小さいアミノ酸を基質とした場合は5G酵素が、それぞれ高い $\Delta G^\ddagger$ 値を示した。

3. ギ酸デヒドロゲナーゼ、アラニンデヒドロゲナーゼ、アラニンラセマーゼ、野生型または変異型D-AATの4種の遺伝子をともに発現させた *E. coli* の静止菌体を用いて、触媒量のD-アラニンの存在下で、ギ酸アンモニウムと種々の $\alpha$ -ケト酸から、対応するD-アミノ酸を効率よく生産する反応系を確立した。D-ロイシンの合成では3G酵素を用いた反応系が、また、D-バリンの合成では1G酵素を用いた反応系が、転換率ならびに不斉収率において、それぞれ野生型酵素を用いた

反応系より優れていた。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質のループ構造を変えることによってそのタンパク質の機能を改変するタンパク質工学的手法は、新しい機能をもつタンパク質を作製するための有効な手段として注目されている。本研究は、細菌のD-アミノ酸代謝において中心的な役割を果たすD-AATを対象に、ドメイン間ループの構造と触媒機能との関連を解析するとともに、機能改変したD-AATを用いてD-アミノ酸を効率よく生産する系を開発したものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. D-AATのドメイン間ループを構成するPro119-Arg120-Pro121をGly-Gly-Glyに置換することによって、D-ヒスチジンやD-フェニルアラニンなどのかさ高い基質に対して、野生型酵素に比べてはるかに高い活性を示す変異酵素を作製できることを示した。また、この改変によって、 $\alpha$ -ケトグルタル酸による基質阻害を解除できることも明らかにした。
2. ドメイン間ループ上の同部位をGlyあるいはGly-Gly-Gly-Gly-Glyに置換した変異酵素を作製し、ループに導入するグリシン残基数によって酵素機能が規則的に変化する現象を見いだした。すなわち、酵素の分子活性はループ長が短いほど高く、逆に基質に対する親和性はループ長が長いほど高くなる事実を明らかにした。反応の活性化自由エネルギー変化は、基質アミノ酸の露出表面積に比例して大きくなるが、基質の露出表面積がグルタミンのそれより大きいかどうかによって、野生型酵素と変異酵素の相対活性が逆転することを見いだした。
3. 野生型または変異型のD-AAT、ギ酸デヒドロゲナーゼ、アラニンデヒドロゲナーゼならびにアラニンラセマーゼの4種の遺伝子をともに発現させた*E.coli* 静止菌体を用いて、対応する $\alpha$ -ケト酸をD-アミノ酸に効率よく変換する方法を確立した。

以上のように本論文は、ドメイン間ループへのグリシン残基導入というユニークな変異により酵素の触媒機能を改変できることを明らかにするとともに、改変酵素を用いてD-アミノ酸を効率よく生産する方法も開発しており、酵素化学、タンパク質工学、応用酵素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10年4月9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。