

氏 名	ふち かん よし ひろ 瀧 上 喜 弘
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1076 号
学位授与の日付	平成 11 年 7 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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Enzymological Studies of Fragmentary D-Amino Acid Aminotransferases (断片型 D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの酵素学的研究)

論文調査委員 (主 査) 教授 江崎信芳 教授 林 力丸 教授 内海 成

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 α -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 Asn 118-Pro 119-Arg 120-Pro 121 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。酵素タンパク質のループには、活性中心を構成し、触媒機能に直接関与するものもあるが、大部分は、単なる二次構造の連結部として構造維持のみに機能する。しかしながら、例えば、アミノ酸置換等によってこれらのループの構造を変えれば、酵素タンパク質の特性や機能が大きく変化する可能性が考えられる。本論文は、D-AAT を種々のループ部分で分断することによって、本酵素の触媒特性を改変できることを示すとともに、ドメインに相当するペプチドを各々単独に発現させた後に混合することによって、活性のある断片型酵素を再構成できることを実証したものである。その成果は以下のように要約される。

1. D-AAT をドメイン連結ループで分断し、N 末端側ドメインと C 末端側ドメインを各々別個のペプチドとして発現させる変異遺伝子を構築した。本遺伝子を発現させたところ、各ドメインに相当するペプチドがそれぞれ 2 分子ずつ会合した断片型酵素 (F 118) が生成した。断片型酵素 F 118 は、野生型酵素の場合と同様の分光学的特性をもち、野生型酵素の約 60% の活性を示した。断片型酵素 F 118 は、D-アルギニンや D-フェニルアラニンなどの嵩高い基質に対して、野生型酵素の場合よりも高い活性を示し、 α -ケトグルタル酸による基質阻害も解除されていた。

2. N 末端側ドメインと C 末端側ドメインに相当するペプチドを各々単独に高発現させる系を構築した。各ペプチドを単離・精製した後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより会合状態を分析した。その結果、N 末端側ペプチドは大部分がモノマーとして存在するのに対し、C 末端側ペプチドは、モノマーのほか、ジスルフィド結合を介して多量体化したダイマーやテトラマーの混合物として存在することが判明した。還元剤存在下でモノマーとして単離した両ペプチドを混合すると、各々 2 分子ずつ会合し、活性のある断片型酵素 F 118 が再構成された。PLP の非存在下においても、アポ型の断片型酵素 F 118 が生成し、PLP を添加すれば活性のあるホロ型に直ちに変換された。しかし、初めから PLP を共存させてホロ型を生成させた場合に比べ、アポ型の生成速度ははるかに低く、両ペプチドの会合に PLP が重要な役割を果たしていることが判明した。再構成した断片型酵素 F 118 は、野生型酵素と同様の構造をもつことが、原子間力顕微鏡による観察の結果、明らかになった。

3. ドメイン連結ループ以外のループ部分で断片化した酵素を 12 種類構築した。このうち、Ile 60 と Thr 61 (F 60), Glu 81 と Leu 82, Glu 104 と Asn 105, Asn 173 と Thr 174 (F 173), Met 199 と Ile 200 の間で分断した 5 種の断片型酵素は、野生型酵素の場合と同様の高い活性をもつことが明らかになった。一方、Gly 39 と Glu 40, Lys 221 と Glu 222, Thr 242 と Ser 243, Lys 260 と Val 261 の間で分断した場合には、長い方のペプチド断片は生成するものの、封入体として不溶性画分に蓄積し、一方、短い方のペプチド断片の生成は認められなかったことから、断片型酵素の生成には、各々の構成断片にあ

る程度の長さが必要であることが判明した。断片型酵素 F 60 と F 173 はともに、野生型酵素よりも活性が高く、他の断片型酵素も、基質特異性や熱安定性などの点で、各々野生型酵素にはみられない特性をもつことが明らかになった。

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なり得る。本研究は、このような考えに立って、ループの分断というユニークな方法を用いて、酵素の機能を改変できることを D-AAT について例証するとともに、本酵素の構造ドメインに相当するペプチドを未変性状態で単離する方法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 のドメイン連結ループを遺伝子工学的な手法により分断して調製した断片型酵素 F 118 は、最も良好な基質である D-アラニンに対して野生型酵素の約 60% の活性しかもたないが、D-アルギニンや D-フェニルアラニンなどの嵩高い基質に対しては、野生型酵素よりも高い活性を示すことを見いだした。また、この改変によって、 α -ケトグルタル酸による基質阻害を解除できることも示した。

2. D-AAT の各ドメインに対応するペプチドをそれぞれ単独に高発現させる系を構築し、単離・精製するとともに、両者を混合することにより、活性のある断片型酵素 F 118 を再構成することに成功した。これは、本酵素の各ドメインの構造と機能の解析に道を開くもので、本酵素の各ドメインが独立したフォールディングの単位として機能していることを実証したものである。

3. ドメイン連結部以外に 12 箇所のループを選別し、各々の部位で分断された断片型酵素の調製を試み、活性を発現するのに必要な条件を明らかにした。野生型酵素よりも活性の高いものや、新しい基質特異性を示すものなど、ユニークな特性をもつ断片型酵素の作製に成功した。これは、ループ部位での分断が酵素の機能改変の有効な手法になることを示すものとして、注目すべき成果である。

以上のように本論文は、酵素の機能を改変するための手段としてループ分断というユニークな方法の有効性を初めて示したものであり、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 11 年 6 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。