

## (論文内容の要旨)

本論文は、放線菌*Streptomyces mobaraensis* NBRC13819株の培養上清から新規に見出した4種類の酵素、ペニシリンVアシラーゼ (*Sm*-PVA),  $\epsilon$ -リジンアシラーゼ (*Sm*-ELA), *N*-短鎖アシルアミノ酸を加水分解するアミノアシラーゼ (*Sm*-SA) 及び*N*-短鎖, 中鎖及び長鎖アシルアミノ酸を加水分解するアミノアシラーゼ (*Sm*-AA) の精製, 特性解析, 速度論的解析, 遺伝子解析, 酵素発現系の構築及び機能性食品素材などとして有用な様々なアシル化合物の合成への応用について検討した結果をまとめたものであり, 序章及び終章に加えて, 以下に示す7章よりなっている.

第1章では, 当初, カプサイシンを加水分解する酵素として単離した*Sm*-PVAの精製, 特性解析及び有用アシル化合物の合成への応用について検討した. *Sm*-PVAは, 分子量18,600の $\alpha$ サブユニットと61,000の $\beta$ サブユニットからなるヘテロダイマー酵素であり, 比較的高い熱安定性と幅広い基質特異性を有することを明らかにした. また, 水/ヘキサン2相系反応により, バニルアミンとラウリン酸から辛味の少ないカプサイシン類縁体を約70%の収率で, 結晶として得られることを示した. さらに, グリセロールを含む緩衝液中で, ラウリン酸と種々のアミノ酸, ジペプチドまたはトリペプチドから, 脱水縮合反応により, *N*-ラウロイルアミノ酸及び*N*-ラウロイルペプチドを合成できることを示した.

第2章では, *Sm*-PVA遺伝子のクローニング及び遺伝子解析を行い, 本酵素遺伝子のオープンリーディングフレーム (open reading frame; ORF) は2,445 bpであり, 翻訳されるポリペプチドは $\beta$ -lactam acylase familyに属する酵素に特徴的なシグナル配列,  $\alpha$ サブユニット, リンカーペプチド及び $\beta$ サブユニットの4つのセグメントから構成されることを明らかにした. さらに, 速度論的な解析を行い, *Sm*-PVAはペニシリンV, ペニシリンG及びカプサイシンに対して高い $k_{\text{cat}}/K_m$ 値をもつことを示した. これらの知見から, *Sm*-PVAは幅広い基質特異性を有する新規なペニシリンVアシラーゼであることを明らかにした.

第3章では, *Sm*-PVAのアシル基転移反応の速度論的解析及び転移反応を利用した有用アシル化合物の合成について検討した. フェノキシ酢酸メチルと6-アミノペニシラン酸からのペニシリンV合成をモデル反応として取上げ, Youshkoらが提唱したモデルに従い反応の経時変化をシミュレートしたところ, 計算結果は実験結果と良好な一致を示した. さらに, *Sm*-PVAの高い転移活性を利用して, 緩衝液中での反応により,  $\beta$ -ラクタム系抗生物質, カプサイシン誘導体, *N*-ラウロイルアミノ酸及び*N*-ラウロイルペプチドなどを効率よく合成できることを示した.

第4章では, *Sm*-ELAの精製及び特性解析を行った. *Sm*-ELAは, 分子量60,000の単量体酵素であり, 既存の*Achromobacter pestifer*由来の酵素と比較して, *N* $\epsilon$ -ラウロイル-L-リジンに対して約70倍高い加水分解活性と20℃以上高い熱安定性を有することを明らかにした. また, 緩衝液中で, 500 mM L-リジンと炭素数10から14の10 mM脂肪酸から, それぞれの脂肪酸に対応する*N* $\epsilon$ -アシル-L-リジンを100%に近い収率で合成した.

第5章では, *Sm*-ELAの遺伝子解析及び*Streptomyces lividans*を宿主とする大量発現系の構築を行った. *Sm*-ELA遺伝子のORFは1,617 bpであり, 538個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていることを明らかにした. 組換え*Sm*-ELA発現のための条件検討を行い, 最適な条件での生成酵素量は野生型酵素の約300倍に達した. さらに, 組換え

*Sm*-ELAを用いて500 mM L-リジン及び50～250 mMラウリン酸を含む緩衝液中で*N* $\epsilon$ -ラウロイル-L-リジンの合成を行い、いずれのラウリン酸濃度でも90%以上の高収率を達成した。

第6章では、*Sm*-SAの精製、特性解析及び遺伝子解析を行った。*Sm*-SAは分子量100,000の単量体酵素であり、種々の*N*-アセチルアミノ酸に比較的高い加水分解活性を有するほか、7-アミノセファロスポラン酸やセファロスポリンCの脱アセチル化反応も触媒することを示した。さらに、*Sm*-SA遺伝子のORFは3,150 bpであり、その翻訳産物は1,049個のアミノ酸残基からなることを明らかにした。緩衝液中での脱水縮合反応により、*N*-フェルロイルアミノ酸や芳香族アシルリジンを合成できることを見出した。

第7章では、*Sm*-AAの精製、特性解析、遺伝子解析及び発現系の構築を行った。*Sm*-AAは、*N*-短鎖アシルアミノ酸だけでなく、*N*-中鎖及び*N*-長鎖アシルアミノ酸も加水分解する新規なアミノアシラーゼであり、分子量50,000の単量体酵素として精製された。*Sm*-AA遺伝子のORFは1,383 bpであり、460個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしており、peptidase M20 familyに属する酵素に特徴的な3つの保存アミノ酸モチーフを有していた。*S. lividans*を宿主とした組換え*Sm*-AA発現系を構築し、野生型*Sm*-AAに比較して、約40倍の酵素量が得られた。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、放線菌 *Streptomyces mobaraensis* NBRC13819株の培養上清から新規に単離された4種類の酵素、ペニシリンVアシラーゼ (*Sm*-PVA),  $\epsilon$ -リジンアシラーゼ (*Sm*-ELA), *N*-短鎖アミノアシラーゼ (*Sm*-SA) 及び *N*-短鎖, 中鎖及び長鎖アシルアミノ酸を加水分解するアミノアシラーゼ (*Sm*-AA) の諸特性の解析から、機能性食品素材などとして有用な種々のアシル化合物の合成反応への応用にわたる一連の研究をまとめたものである。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 単離した4種類の新規アシラーゼは、特性解析及び速度論的な解析から、既存の類似酵素と比較して、触媒活性及び熱安定性の点で優れており、かつ幅広い基質特異性を有することを見出した。すなわち、*Sm*-PVAは、ペニシリンVのみならず、カプサイシン、*N*-ラウロイルアミノ酸、*N*-ラウロイルペプチドなどの多様な基質のアミド結合の加水分解を効率よく触媒することを見出した。さらに、*Sm*-ELAは  $N\epsilon$ -アシル-L-リジンの  $\epsilon$  位のアミド結合を、*Sm*-SAは  $N\alpha$ -アセチルアミノ酸のアミド結合を、*Sm*-AAは *N*-短鎖だけではなく *N*-中鎖及び長鎖アシルアミノ酸も加水分解することを示した。

2. 酵素遺伝子のクローニングを行い、解読した塩基配列に基づいてドメイン構造、活性部位を形成するアミノ酸残基及び属する遺伝子ファミリーを推定した。*Sm*-PVAは  $\beta$ -lactam acylase family に共通の4つのセグメントを有すること、*Sm*-SA及び*Sm*-ELAは metal hydrolase superfamily にみられる4つのヒスチジンと1つのアスパラギン酸を、*Sm*-AAは peptidase M20 family に属する酵素に特徴的な3つの保存アミノ酸モチーフを有することを明らかにした。さらに、*Sm*-ELA 及び*Sm*-AAについては、*Streptomyces lividans* を宿主とする大量発現系の構築を行い、野生型酵素と比較してそれぞれ約300倍及び40倍の高い酵素発現に成功した。

3. *Sm*-PVAを用いた縮合反応またはアシル基転移反応により、ペニシリンVのみならず、機能性食品素材として知られるカプサイシン類縁体、*N*-ラウロイルアミノ酸、*N*-ラウロイルペプチドを比較的高い収率で得られることを示した。*Sm*-ELAを用いることにより、緩衝液中で炭素数が10から14の飽和脂肪酸とL-リジンから  $N\epsilon$ -アシル-L-リジンを効率的に合成できること、とくに、化粧品素材などとして使用されている  $N\epsilon$ -ラウロイル-L-リジンを90%以上の収率で合成できることを示した。これらの結果から、本酵素を用いる合成法は、現在行われている化学合成法の代替法として有望であると考えられる。*Sm*-SAを用いた縮合反応により、緩衝液中で *N*-フェルロイルアミノ酸や芳香族アシルリジンを合成できることを示した。

以上のように本論文は、*S. mobaraensis* の培養上清から4種類の新規なアシラーゼを単離し、それらの基礎的諸特性を明らかにするとともに、有用アシル化合物の合成に応用できることを示したものであり、酵素工学、応用微生物学及

び食品生物工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21年6月15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。