

氏 名	しの はら まこと 篠 原 信
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1147 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 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 lactone-ring-cleaving enzymes from microorganisms (微生物のラクトン環加水分解酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

ラクトン化合物は微生物間の情報伝達に関わる物質として、あるいは光学活性化化合物合成の出発材料として、生化学的にも合成化学的にもその重要性が高まりつつあり、ラクトン環の開裂をはじめとするラクトン化合物の変換に関わる酵素反応の探索や解析にも新たな注目が集まっている。

本論文では、パントラクトン (PL) の立体選択的加水分解反応に着目し、糸状菌 (*Fusarium oxysporum*), 担子菌 (*Schizophyllum commune*) および細菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) から本反応を触媒するラクトン環加水分解酵素を単離・精製し、それぞれの諸性質を解明した。さらに、*F. oxysporum* および *A. tumefaciens* の酵素については、それぞれの酵素をコードする遺伝子を取得し、それらの構造と機能を解明した。

(1) *Fusarium oxysporum* 由来の新規 D 型ラクトン環加水分解酵素

F. oxysporum の生産するラクトン環加水分解酵素 (*Fusarium* ラクトナーゼ) は、D-PL の立体選択的加水分解を効率よく触媒し、DL-PL の工業的光学分割反応に利用されている。本論文では、*Fusarium* ラクトナーゼをコードする遺伝子の構造と機能について検討を加えた。まず、本菌から単離・精製した酵素のアミノ酸配列を基に合成オリゴヌクレオチドを作製し、PCR クローニング法により本酵素遺伝子の一部をクローニングした。これをプローブとして用い、本酵素遺伝子全長をコードするゲノム遺伝子および開始コドンを含む本酵素遺伝子全長をコードする cDNA を取得した。本酵素ゲノム遺伝子および cDNA の解析から、ゲノム遺伝子と cDNA の塩基配列に二箇所の食い違いを認め、これがそれぞれの箇所にグアニン、シトシンが一塩基ずつ挿入される新規なタイプの RNA editing によるものであることを明らかにした。さらに、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を基にホモロジー検索を行い、*Zymomonas mobilis* 由来のグルコノラクトナーゼ、ヒト由来のパラオキシナーゼ、*Catharanthus roseus* 由来のストリクトシダインシンターゼなどとの相同性を認めた。本酵素の cDNA を用い大腸菌発現系を構築し、培養条件を検討した結果、本酵素を活性のある形で大量に発現させることに成功した。また、得られた菌体は *F. oxysporum* の菌体と同様に DL-PL の光学分割に利用できることも明らかにした。

(2) *Schizophyllum commune* 由来の新規 D 型ラクトン環加水分解酵素

D-PL に選択的な加水分解活性を示す微生物を新規に探索し、*S. commune* を得た。本菌からラクトナーゼ活性を示すタンパク質を単離・精製し、高分子量型ラクトナーゼおよび低分子量型ラクトナーゼの二種類を得た。両酵素とも活性の維持に Ca^{2+} が必須であることなど、*Fusarium* ラクトナーゼとの共通点が見いだされた。しかし、高分子量型ラクトナーゼは SH 阻害剤で阻害を受けること、内部アミノ酸配列に *Fusarium* ラクトナーゼとの相同性が認められないことなどから、新規なラクトン環加水分解酵素であることが明らかとなった。一方、低分子量型ラクトナーゼは内部アミノ酸配列が *Fusarium* ラクトナーゼと相同性を示し、類似性の高い酵素であることが示唆された。

(3) *Agrobacterium tumefaciens* 由来の新規 L 型ラクトン環加水分解酵素

L-PL を立体特異的に加水分解する微生物を探索し、*A. tumefaciens* に高い活性を認めた。本菌からラクトナーゼ活性を

示す酵素タンパク質を単離・精製し、その諸性質を解明した。本酵素 (*Agrobacterium* ラクトナーゼ) は D-PL には全く作用せず、L-PL のみに高い立体特異性を示す新規なラクトン環加水分解酵素であることが判明した。*Agrobacterium* ラクトナーゼの内部アミノ酸配列の情報を基に合成オリゴヌクレオチドを作製し、逆 PCR 法により本酵素遺伝子全長を含む約 2kb の断片のクローニングを行い、その塩基配列を決定した。また、その塩基配列から本酵素は *Streptomyces* 属放線菌のポリケタイドサイクラーゼなどと相同性を示すことを認めた。

論文審査の結果の要旨

最近、ラクトン環を加水分解する一群の微生物酵素の存在が注目されつつある。例えば、これらの酵素は、生体内ラクトン化合物の代謝・変換への関与を通して微生物間の情報伝達を調節することや、反応の高い立体選択性を利用した光学活性化合物合成の触媒素子としての利用などが示唆されている。しかし、ラクトン環加水分解酵素の酵素化学的、分子生物学的研究は、いまだ緒についたばかりであり、未解明な点も多い。

本論文は、パントラクトンに立体特異的に作用するラクトン環開裂反応に着目し、反応に関与する数種の酵素について酵素化学的、分子生物学的解明を行ったものである。成果として評価すべき点は次の通りである。

1. 糸状菌 *Fusarium oxysporum* が生産する D-PL に特異的なラクトン環開裂酵素のゲノム遺伝子および cDNA の解析を行い、遺伝子情報の転写に際し、新規なタイプの RNA editing が関与することを認めた。また、本酵素遺伝子の塩基配列情報から、本酵素が *Zymomonas mobilis* 由来のグルコノラクトナーゼ、ヒト由来のパラオキシナーゼ、*Catharanthus roseus* 由来のストリクトシダインシンターゼなどと高い相同性を有することを明らかにした。さらに、本酵素 cDNA を基に大腸菌による発現系を構築することに成功し、組換え酵素が PL の光学分割へ応用できることを示した。

2. 担子菌 *Schizophyllum commune* の生産する高分子量型および低分子量型、二種類の D-PL 特異的なラクトン環開裂酵素をそれぞれ単離・精製し、諸性質を明らかにした。内部ペプチドのアミノ酸配列より、前者は新規なラクトン環開裂酵素であること、後者は *Fusarium* ラクトナーゼと類似性の高い酵素であることを明らかにした。

3. 細菌 *Agrobacterium tumefaciens* が生産するラクトン環開裂酵素が、*Fusarium* や *Schizophyllum* の生産する酵素とは対照的に L-PL に特異的に作用し、D-PL を全く加水分解しない新規なラクトン環開裂酵素であることを明らかにし、その諸性質を解明した。また、本酵素の遺伝子解析の結果から、本酵素が *Streptomyces* 属放線菌の生産するポリケタイドサイクラーゼと相同性を有することを認めた。

以上のように本論文は、微生物の生産するユニークなラクトン環開裂酵素の諸性質の解明、分子生物学的な意味づけ、および、光学活性化合物合成への応用についての新しい知見を提示したものであり、実用面にも応用できる成果を上げたもので、応用微生物学、応用酵素学、分子生物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6月12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。