

氏 名 池 中 康 裕
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2223 号
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学 位 論 文 題 目 Protein Engineering of *N*-Carbamyl-D-Amino Acid Amidohydrolase
 (D-アミノ酸生産に利用可能なカルバミラーゼの創製)

(主査)
 論文調査委員 教授 清水 昌 教授 熊谷英彦 教授 江崎信芳

論 文 内 容 の 要 旨

抗生物質などの中間体として用いられているD-アミノ酸の有力な製造法のひとつとして、ラセミ体の5-置換ヒダントインを基質にしてD-ヒダントイナーゼを用いる酵素法が実用化されている。従来、この酵素反応によって生成する*N*-カルバミル-D-アミノ酸の*N*-カルバミル基は、化学的な反応により除去されてD-アミノ酸に変換されていたが、それに伴ういくつかの問題点があった。本研究では、この反応を温和で環境負荷も小さい酵素的な反応に置き換えることを目的として、実用的な*N*-カルバミル-D-アミノ酸アミドヒドロラーゼ(カルバミラーゼ)を得るための検討を加えたものである。主な内容は以下のとおりである。

第1章では好熱菌由来のカルバミラーゼについて述べている。土壌より高温で集積培養を行いカルバミラーゼを生産する好熱菌を数株取得した。最も高い活性を示した*Pseudomonas* sp. KNK003A由来の酵素について精製し、遺伝子をクローニングすることで諸性質を明らかにした。本酵素は安定性が高く、直鎖状の側鎖を持つD-アミノ酸の合成に有用な酵素であると考えられた。また、本酵素遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を用いることにより、酵素の生産性を元株の約40倍に向上させることができた。本酵素と近縁と考えられるアミダーゼなどとアミノ酸配列の比較を行った結果、既知のカルバミラーゼ以外で本酵素と高い相同性を示すタンパク質はなかった。

第2章では酵素遺伝子の変異による既知のカルバミラーゼの安定性向上に関する研究について述べている。側鎖に芳香環を持つD-アミノ酸の合成に利用できる実用的なカルバミラーゼを取得するため、これらの基質に対する反応性が高い*Agrobacterium*由来の酵素の遺伝子を化学的にランダムに変異させた。熱処理を組み合わせた酵素活性の発色検出系を用い、耐熱性向上を指標にして安定性が向上した酵素の生産株を選択した。これらの株が保有するプラスミドの遺伝子解析を行った結果、3箇所のアミノ酸残基、すなわちHis57、Pro203及びVal236の変異により耐熱性が向上していることが判明した。耐熱性に関与するこれら3箇所の部位のアミノ酸残基について、PCR法を応用した部位特異的置換を行い、His57がLeu, Thr, Pro203, がAla, Asn, Glu, His, Ile, Leu, Ser, Thr, そしてVal236が、Ala, Ser, Thrに置換することが耐熱性の向上に寄与することを認めた。さらに、これらの耐熱性に関与する3箇所の変異を2つまたは3つ組み合わせ、相加効果により耐熱性が大幅に向上したカルバミラーゼを取得するための検討を行い、3つの変異を持つ変異酵素としてHis57Tyr/Pro203Glu/Val236Alaを得た。本変異酵素は、野生型酵素の場合に比べ耐熱温度が約19℃向上していた。本変異酵素の諸性質を検討し、基質特異性なども天然型のカルバミラーゼとほぼ同様であることを示すとともに、安定性向上の要因が電荷の除去や立体障害の解消によるものと推定した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、D-アミノ酸の合成に利用できる実用的な酵素の取得に関するものであり、微生物が生産する有用酵素の探索、

精製、遺伝子クローニングと諸性質の解明、タンパク質工学的な酵素の改変、D-アミノ酸の合成への利用について検討を加えた結果をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. 土壌より好熱性細菌由来のカルバミラーゼ生産株を分離し、その酵素の精製と遺伝子のクローニングにより、本酵素が安定で、直鎖状の側鎖を持つD-アミノ酸の合成に有用な酵素であることを明らかにした。また、アミノ酸配列の相同性検索の結果、カルバミラーゼに近縁と考えられる酵素は見いだされず、カルバミラーゼが分子遺伝学的に新しい酵素群であることを形成している可能性を示した。
2. *Agrobacterium* 由来のカルバミラーゼ遺伝子をランダムに変異させて酵素の耐熱性を向上させることを試み、ひとつのアミノ酸残基の置換により酵素の耐熱性が向上すること、耐熱性の向上に関与する部位がカルバミラーゼには少なくとも3箇所存在することを明らかにした。
3. *Agrobacterium* 由来のカルバミラーゼについて、耐熱性に関与する3箇所の部位の変異を2つまたは3つ組み合わせることにより、耐熱性が相加的に向上することを明らかにし、それぞれが独立に耐熱性向上に関与していることを明らかにした。
4. *Agrobacterium* 由来のカルバミラーゼについて、アミノ酸置換により耐熱性に関与する3つの変異を付与することで、安定性が大幅に向上し実用的に利用可能な変異酵素を取得することに成功した。

以上のように、本論文は微生物が生産するカルバミラーゼの安定性向上に関わるタンパク質工学的検討及びD-アミノ酸類の酵素的合成への利用について、基礎、応用両面にわたって多くの新しい知見を加えたものであり、応用微生物学、応用酵素学に貢献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1月19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。