

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 細菌のアラニン代謝関連酵素の機能と応用

氏名 芦田 裕之

論文内容の要旨

タンパク質を構成するアミノ酸の一種である L-アラニンの代謝では、L-アラニンはピルビン酸へ転換された後、クエン酸回路へと運ばれエネルギー源となる。また糖新生においてグルコースを生合成する際の出発物質であるピルビン酸の基質となる。本研究では細菌のアラニン代謝関連酵素のうち L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH) とアラニンラセマーゼ (AlaR) をとりあげ、その機能解析を行うとともに両者を組み合わせた D-アラニン定量法を構築した。

第 1 章では、好冷菌 *Shewanella* sp. strain Ac10 と *Carnobacterium* sp. strain St2 の低温性 L-AlaDH を取り上げ、両者のアミノ酸組成および立体構造を中温性及び耐熱性 L-AlaDH と比較し、低温性 L-AlaDH の低温適応機構について解析した結果を記した。

低温性、中温性、耐熱性 L-AlaDH の分子進化系統樹とそれぞれの酵素を有する生物種の 16S rDNA の分子進化系統樹を比較したところ 2 つの系統樹の分岐パターンは類似しており、L-AlaDH は各生物種の生育環境に適した要件を満たすように進化してきたものと考えられた。熱安定性が異なるグラム陽性菌由来の 3 つの L-AlaDH、すなわち CarAlaDH (*Carnobacterium* sp. strain St2 由来、低温性)、BsuAlaDH (*Bacillus subtilis*、中温性)、BstAlaDH (*Geobacillus stearothermophilus*、耐熱性) の構造を比較した結果、アルギニン残基の含量と熱安定性の間に相関関係があり、熱安定性は総塩基性残基 (Arg+Lys) に対するアルギニン残基のモル比と正に相関することが明らかとなった。一方、分子骨格の柔軟性を調節することでタンパク質の安定性に寄与すると考えられているプロリン残基やグリシン残基の含量からはそれぞれの酵素の熱安定性を説明できなかった。ホモロジーモデリングの結果からは、低温性 L-AlaDH の不安定性は主として塩橋数が低いことに起因すると推論された。

第 2 章では、NAD(P)⁺依存型 *Shewanella* sp. Ac10 由来 L-AlaDH と NAD⁺依存型 L-AlaDH の補酵素結合部位を比較し、アミノ酸置換によって補酵素特異性を改変した

研究結果について述べた。

第1章で温度安定性を解析した *Shewanella* sp. Ac10 L-AlaDH は NAD^+ だけでなく NADP^+ も補酵素として用いることができる。これは補酵素結合部位に NADP^+ の 2'-リン酸基の結合部位としてアルギニン残基が存在するためであると示唆された。アミノ酸配列の比較から、専ら NAD^+ を補酵素とするランソウ *Phormidium lapideum* の L-AlaDH では Ile198 がこのアルギニン残基に相応するアミノ酸残基であることがわかった。そこで *P. lapideum* L-AlaDH の Ile198 を Arg に置換した変異体酵素 (I198R) を作成し補酵素特異性を解析したところ、*P. lapideum* L-AlaDH I198R 変異体酵素は NADP^+ も補酵素として用いることができるようになった。また NAD^+ 特異的な L-AlaDH では NAD^+ のアデニンリボースの 2'-, 3'-OH と相互作用を示すと考えられる Asp 残基が保存されていた。この保存されている Asp 残基は NADP^+ 依存性酵素では疎水性アミノ酸に置き換わっていた。そこで *Shewanella* L-AlaDH の保存されている Asp 残基 (Asp198) を Gly, Ala, Val, Leu の疎水性アミノ酸に置換したところ、これらの変異酵素ではさらに NADP^+ に対する特異性が上昇した。以上の結果から、 NADP^+ の 2'-リン酸基近傍アミノ酸残基に部位特異的変異導入することにより NAD^+ 特異的酵素から NADP^+ にも反応性を示す酵素に改変できることが示された。

第3章では、ランソウ AlaR および他の細菌由来 AlaR の分子進化系統樹を作成して AlaR の分子進化について考察した結果、ならびに基質認識部位にあってランソウ AlaR に特異的な Trp 残基の解析結果について述べた。

ランソウのペプチドグリカンがグラム陰性菌とグラム陽性菌のペプチドグリカン双方の性質を示す。そこでペプチドグリカン生合成に関与する AlaR の分子系統解析を行った。アミノ酸配列を用いた分子進化系統樹からランソウの AlaR はグラム陽性菌とグラム陰性菌の酵素が分離する前に分岐したことが示唆され、AlaR の分子進化とペプチドグリカンの構造的特徴との関連がうかがわれた。アミノ酸配列アライメントからはランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 の AlaR において基質認識に関与すると考えられる Trp385 が *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab を除くほぼ全てのランソウの AlaR で保存されていた。これに対してランソウ以外の細菌および *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab の AlaR では対応する残基が Tyr であった。*Synechococcus* sp. JA-3-3Ab は今回調べたランソウの中で最も遅く分岐したと考えられることから、この残基は進化の過程で Trp から Tyr へ置換されたと考えられた。そこでランソウの AlaR における Trp 残基の機能を解析するため、*Synechocystis* sp. PCC6803 由来 AlaR の Trp385 を Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr の疎水性アミノ酸に置換した変異体酵素を作製し、酵素学的解析を行った。その結果 *Synechocystis* AlaR の W385A 変異体酵素は D-, L-Ala だけでなく D-, L-Norvaline や D-, L-Norleucine に対しても活性を示すことが確認された。また *Synechocystis* AlaR の分子モデリングを行ったところ、Trp385 は基質 L-Ala の側鎖の C3 から 3.43Å の位置にあり、Trp385 が基質認識に関与していることが示唆された。

第4章では、ランソウ由来 L-AlaDH と AlaR を用いて D-, L-アラニンの酵素的分別定量法を構築するとともに、同法によって甲殻類中の D-, L-アラニンを定量した結果

について述べた。

エビ類とカニ類の多くは浸透圧調節物質として D-Ala を多量に含んでいる。D-Ala は甘味を呈することから、その含量がこのような海産物の味に影響することが予想される。本研究で構築した酵素定量法では L-Ala は L-AlaDH の酵素反応により、また D-Ala は AlaR と L-AlaDH を共役させた酵素反応により生成する NADH を、それぞれ 1-methoxyphenazine methosulfate を電子キャリアーとしてテトラゾリウム塩 WST-1 から生成する水溶性ホルマザンの 438 nm の吸光度の増加として測定した。この定量法において D-, L-Ala 濃度と 438 nm の吸光度の間に直線的な相関関係が認められたことから、同法が D-, L-Ala の定量法として有効であると判断した。この酵素的定量法を用いて山陰地方の甲殻類の筋肉中の L-, D-Ala を定量するとともに、その結果を従来の HPLC 法と比較し評価した。酵素的定量法で得られたモサエビの D-Ala 含量については従来の HPLC 法で測定した D-Ala 含量と同様の値が得られた。4 種のエビ類と 3 種カニ類の D-, L-Ala 含量を測定したところ、相対的にカニ類の D-Ala 含量はエビ類の D-Ala 含量よりも高いことが明らかとなった。本研究で確立した酵素的定量法は簡単で高価な装置を必要としない。そのため、市場等での魚介類の食味の評価に応用できる可能性が期待された。