

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番 -	※ -	第
----------	--------	---

氏 名 芦田裕之
論文題目 細菌のアラニン代謝関連酵素の機能と応用

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院教授 吉村 徹

委員 名古屋大学大学院教授 中野秀雄

委員 名古屋大学大学院准教授 岩崎雄吾

委員 名古屋大学大学院准教授 邊見 久

論文審査の結果の要旨

L-アラニン (Ala) はタンパク質を構成するアミノ酸であるとともに、ピルビン酸へ転換された後にクエン酸回路へと運ばれエネルギー源となる。ピルビン酸はまた糖新生によってグルコースを生合成する際の出発物質でもある。L-Ala のエナンチオマーである D-Ala は細菌細胞壁ペプチドグリカンの構成成分であり、細菌の生育には不可欠の存在である。哺乳動物では D-Ala の生合成酵素や生理機能は報告されていないが、D-Ala が膵臓のランゲルハンス島に局在するなど興味深い現象が知られている。本論文では細菌のアラニン代謝関連酵素のうち、NAD(P)⁺を補酵素として L-Ala を可逆的に脱アミノ化しピルビン酸を生合成する L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH) と、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素として Ala のラセミ化を触媒するアラニンラセマーゼ (AlaR) について、その機能や進化について考察するとともに、両酵素を組み合わせた D-Ala 定量法の構築について述べた。

第 1 章に記した研究では、好冷菌 *Shewanella* sp. strain Ac10 と *Carnobacterium* sp. strain St2 に由来する 2 つの低温性 L-AlaDH、すなわち SheAlaD と CarAlaDH を取り上げた。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 と比較することによって、低温性 L-AlaDH の低温適応機構について解析した。好冷菌に由来する低温性酵素は低温で高い活性を持つ一方、熱安定性が低いと考えられており、低温での処理が必要とされる食品製造等への応用が期待される。本研究ではこのような低温性酵素の特性をもたらす構造的要因について検討した。

CarAlaDH と SheAlaD の一次構造上の相同性が 47 %であるのに対し、*Carnobacterium* sp. strain St2 と同じくグラム陽性細菌である、常温菌 *Bacillus subtilis* の中温性 AlaDH (BsuAlaDH) および好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* の好熱性 AlaDH (BstAlaDH) との間の相同性は 59 - 63 %であった。すなわち 3 種のグラム陽性細菌の L-AlaDH は、各々の生物種の生育温度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。この 3 酵素の一次構造を比較したところ、Arg 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 Arg 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 Pro 残基や Gly 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⁺だけでなく NADP⁺も補酵素とする *Shewanella* sp. Ac10 由来 L-AlaDH (SheAlaDH) と、*Phormidium lapideum* L-AlaDH など NAD⁺のみを補酵素とする 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の結果について述べた。

論文審査の結果の要旨

SheAlaDH は、NAD⁺ だけでなく効率は低いものの NADP⁺ も補酵素として用いることができる。立体構造モデルから、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 Arg 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 *P. lapideum* の L-AlaDH では Ile198 がこの Arg 残基に相応する残基であると推定された。そこで *P. lapideum* L-AlaDH の Ile198 を Arg に置換した変異酵素 (I198R) を作成したところ、*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。一方、NAD⁺ 特異的な L-AlaDH では NAD⁺ のアデニンの 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ることが認められた。この保存性 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 SheAlaDH 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 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 残基の機能を解析した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ことが知られている。そこでペプチドグリカンの必須成分である D-Ala の生合成酵素である 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伺われた。各種 AlaR のアミノ酸配列のアライメントを行ったところ、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、対応する位置に Tyr が保存されていた。*Synechococcus* sp. JA-3-3Ab AlaR は、分子進化系統樹上ランソウ以外の細菌の AlaR に最も近接した位置にあることから、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 L-AlaDH 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酵素を作製し、それぞれの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*

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

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の **L-AlaDH** と **AlaR** を用いた **D-Ala**、**L-Ala** 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-Ala**、**L-Ala** を定量した結果について述べた。本研究で構築された酵素定量法では、**L-Ala** 量を **L-AlaDH** 単独での酵素反応により求め、この値を **AlaR** と **L-AlaDH** を共役させた酵素反応によって求めた総 **Ala** 量から差し引くことによって **D-Ala** 量を求める。酵素反応によってそれぞれ **NAD⁺** から生成する **NADH** を、**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算出する。この定量法において **D-Ala**、**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-および L-Ala** の定量法として有効であると判断された。この酵素定量法を用いて山陰地方の甲殻類の筋肉中の **D-Ala**、**L-Ala** 量を測定するとともに、その結果を従来の **HPLC** 法と比較した。酵素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種のカニ類の **D-Ala** および **L-Ala** 含量を測定したところ、カニ類の **D-Ala** 含量はエビ類の **D-Ala** 含量よりも高い傾向を示した。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た。

以上のように芦田裕之は細菌の二つのアラニン代謝酵素、**AlaDH** と **AlaR** の構造機能相関や進化について解析するとともに、物質生産や定量法などへの応用可能性を示した。本研究で明らかとなった低温性 **L-AlaDH** の構造的特性は、タンパク質の熱安定性の構造的要因の解明という基礎的成果とともに、食品製造などにおいて応用が期待される低温性酵素の開発に資するものと考えられる。**L-AlaDH** のような **NAD(P)⁺** 酵素を物質生産などへ応用する際には、高価な補酵素を再生させるためにグルコース脱水素酵素などを共役させる。この場合共役させる両酵素の補酵素依存性は同一でなければならない。その意味から、本研究で示された **L-AlaDH** の **NAD⁺** 依存性と **NADP⁺** の依存性の相互変換の意義は大きい。本研究ではまたランソウ **AlaR** がグラム陰性菌とグラム陽性菌の **AlaR** が分岐する以前に分岐したとの可能性が示された。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の双方の性質を有していることを考えると、これはたいへん興味深い知見であり、高等植物の葉緑体の起原を考える上でも参考になるものと思われる。本研究ではまた **L-AlaDH** と **AlaR** を用いた簡便な **D-Ala** 定量法を確立した。**D-Ala** が特に海産物の食味に影響することから、簡便で高価な装置を必要としない本法は、市場等、現場での魚介類の食味の評価への応用が期待される。このように本研究は重要な生体成分である **Ala** に関連

別紙 1 - 2

論文審査の結果の要旨

する酵素の基礎および応用に大きく貢献するものと考えられる。したがって審査委員会は本論文が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。