

氏名	有馬 二郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第2511号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの構造機能解析
論文審査委員	教授 稲垣 賢二 教授 田中 英彦 教授 多田 幹郎

学位論文内容の要旨

L-Gluオキシダーゼは L-Gluの酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビン酵素である。放線菌由来の本酵素は $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ という複雑な高次構造を持ち、基質特異性、安定性において非常に優れた性質を持つ。よって本酵素は食品分野におけるL-Glu定量及び医療分野におけるGOT/GPTセンサーへの利用等に注目されている他、基質認識や安定性における構造面からの知見に興味を持たれている。本酵素生産は放線菌を固体培養し、培養後期に微量に生産された本酵素を回収することで行われる。またこれまでの報告から本酵素は液体培養では生産はされず、その形態分化に伴い酵素発現が誘導されることが考えられた。従って、本酵素の発現機構における知見を得ることは、放線菌の発現調節における1つのパターンを提示することにつながり非常に興味深い。本研究は、本酵素の遺伝子からの解析及び発現系の構築、機能及び構造解析、L-Gluセンサーへの応用までの一連の知見を得ることを目的とした。

本酵素遺伝子のクローニングを目的として各サブユニットのN末配列を元にプローブを作製した。放線菌ゲノムライブラリーをハイブリダイゼーションに供することで行った。2段階のスクリーニングを経た結果、本酵素遺伝子全長が得られた。本酵素遺伝子は分子量約7万6千の一本のタンパク質をコードしており、本酵素は発現後プロテアーゼによるプロセッシングを受けると予測された。また1次構造解析から、FAD結合に必要な $\beta\alpha\beta$ -foldが存在し、L-アミノ酸オキシダーゼと部分的に相同性を示した。L及びD-アミノ酸オキシダーゼの構造解析の報告から、イソアロキサジン環付近での構造に違いが見られ、反応機構が異なると予測されている。本酵素はL-アミノ酸オキシダーゼの活性中心配列と高い相同性があり、反応機構はL-アミノ酸オキシダーゼと類似すると予測された。本酵素の大腸菌発現系を構築し培養条件を整え、総タンパク質量の20%までに生産性を上げることに成功した。発現系からはダイマーの前駆体として発現され、その基質親和性や安定性は、成熟酵素と比較し、劣っていた。また前駆体は均一な分子構造を持たず、ランダムな会合状態にあると考えられた。前駆体を放線菌由来プロテアーゼで処理した結果、 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ と類似した構造をとり、性質は成熟酵素と同程度までに改良された。また分子間の会合が解消されたことから、プロテアーゼ切断で一定の分子構造を持つための安定化が酵素内で起こり、それが中性付近での活性化、基質親和性、熱安定性に関与することが明らかとなった。前駆体及びプロテアーゼ処理後の本酵素のpH依存性酵素反応速度パラメーター解析の結果、プロテアーゼ処理により酵素反応に関係する解離基のpK値の上昇が構造変化により起こることが考えられた。成熟化に関与するプロテアーゼの検索を目的として、本酵素生産菌の形態による本酵素発現の変化、プロテアーゼ発現についての検討を行った。この結果、胞子形成時のみ本酵素修飾に関わるプロテアーゼを分泌することが予測された。しかし本酵素発現は菌体内画分において始めに見られ、菌体外に分泌されるまでにかなりの時間を要したことから、本酵素の分泌は溶菌に伴う放出である可能性も考えられる。

L-Gluセンサーの開発に関する研究から、本酵素は固定化により基質親和性が若干低下した。電子受容体としては、フェリシアン、フェロセン化合物の使用が可能であった。そこで電極上での直接反応によるL-Gluの定量を試みた。その結果、0.1mM以上での濃度において直線的な定量を行うことができた。さらに精度を上げることで、GOT/GPTのセンサーに応用できる可能性が見いだされた。

論文審査結果の要旨

申請者の研究は放線菌由来 L-Glu オキシダーゼの構造及び機能について遺伝子、酵素分子、細胞レベルから深く知見を得ることを目的としたものである。L-Glu オキシダーゼは L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、放線菌 *Streptomyces* sp. X-119-6 株より生産される。また、 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ という複雑な高次構造を持ち、安定で非常に基質特異性が厳格である。本酵素は L-Glu 定量キットやバイオセンサーにおいて非常に有用な酵素であるが、放線菌より生産される本酵素は微量であり、その性質と構造との関連性においても興味を持たれる。申請者は放線菌より本酵素遺伝子のクローニングを行い、遺伝子レベルからの研究を実現させた。本酵素遺伝子は一本の ORF で構成されていることから、発現後プロテアーゼ修飾を受けると予測された。また1次構造解析から FAD 結合に関する知見が得られ、さらに L-アミノ酸オキシダーゼの活性中心と高い相同性があることから、反応機構が予測された。本酵素の生産は大腸菌に遺伝子を導入し、発現系を構築することで行った。これより生産される本酵素を精製、性質検討することで、多くの酵素化学的性質の知見が得られ、さらには前駆体のプロテアーゼ消化による成熟化機構の解明も実現した。成熟化機構が放線菌内ではどのように行われているかについて、本酵素生産菌を用いた検討から、本酵素が2次代謝的に生産され、その発現形態についても明らかにした。本酵素発現系により大量生産が可能となったことから、X線結晶構造解析が可能となり、今後、構造の決定に期待される。更に本酵素の生産性は工業への応用も可能にした。L-Glu センサーや GOT/GPT センサーにおける研究から、本酵素はいくつかの電子需要体が使用可能であることを明らかにし、その精度から、今後の本酵素の工業的利用の可能性を見いだされた。

以上、申請者は放線菌より L-Glu オキシダーゼ 遺伝子を単離し、大量生産を可能としたほか、酵素化学的性質や工業利用の面において多くの知見を得た。本研究は今後産業的に重要となると思われる L-Glu オキシダーゼの利用や、酵素学全般における基礎研究に重要な知見を加えるもので、博士（農学）の学位を受けるのに十分資格ありと判定する。