

学位論文審査の結果の要旨

氏名	大志田 達也
審査委員	主査 櫻庭 春彦 副査 麻田 恭彦 副査 大西 浩平 副査 関藤 孝之 副査 渡邊 彰

論文名

Functional analyses of extremophile specific enzymes

(極限環境微生物特異的酵素の機能解析)

審査結果の要旨

極限環境に生育する微生物は、高度に安定な細胞成分を生産するものが多い。そのなかで好熱菌や好塩菌由来の酵素は、有機溶媒や界面活性剤などに対して耐性が高い。このため、様々な分野での産業利用が期待されている。また極限環境微生物は通常の微生物には存在しない新奇な代謝系やその関連酵素を持つことから、ユニークな酵素の宝庫として注目を集めている。

本研究では、高度好塩性アーキアおよび超好熱性細菌由来の2つの特徴的な酵素を同定し、その機能を明らかにしている。1つは、高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* 由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼで、もう1つは、超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来のアスパラギン酸キナーゼ・ホモセリンデヒドロゲナーゼ融合酵素である。本研究において、この2つの酵素の特徴的な性質が初めて解析された。

(1) 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (DERA)

高度好塩性アーキア *H. japonica* に DERA を見出し、大腸菌における遺伝子発現・産物の精製に成功している。一般に高度好塩性微生物の酵素は数 M という高塩濃度存在下でのみ立体構造を維持できるため、活性型の精製酵素を得るのが難しい。本研究では、不活性型酵素の生成を抑制する手法を見出し、精製酵素の取得に成功した。精製酵素は、2 M の NaCl 存在下で安定であり、70℃、10 分間の熱処理後も 90%以上の活性を保持するなど高い熱安定性を示した。また、本酵素は高濃度の有機溶媒（アセトニトリル、ジメチルスルフォキシドなど）存在下でも高い耐性を見せた。さらに、基質のアセトアルデヒドにも耐性を持ち、300 mM アセトアルデヒドの存在下、25℃、5時間の処理でも 35%の活性を保持した。この条件では大腸菌由来 DERA は完全に失活する。DERA はアセトアルデヒドを基質とすると、抗高脂血症治療薬スタチンのビルディングブロック合成に有用であるが、高濃度のアセトアルデヒドに耐性が無いことが産業利用への課題となっていた。本研究は、高度好塩性微生物由来の DERA が有機合成のバイオカタリストとして有用である可能性を示している。これは、高度好塩性微生物由来の DERA の性質を明らかにした初めての研究である。

(2) アスパラギン酸キナーゼ・ホモセリンデヒドロゲナーゼ融合酵素 (AK-HseDH)

超好熱性細菌 *T. maritima* に見出した 2 機能性 AK-HseDH ホモログは、酵素を構成する三つのドメインの並びが、これまで知られている AK-HseDH とは完全に異なっており、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (HseDH)、アスパラギン酸キナーゼ (AK)、調節ドメインの順に並んでいた (従来のは AK、調節ドメイン、HseDH の順に並ぶ)。大腸菌で本酵素を生産し、産物を精製した。精製酵素は、AK および HseDH の両活性を示し、新規のタイプの AK-HseDH であることが示唆された。本酵素はシロイヌナズナの AK-HseDH と同様に L-スレオニンにより阻害を受けるが、阻害に必要な濃度はシロイヌナズナの場合 ($K_{0.5} = 500 \mu\text{M}$) と比較して極度に低かった ($K_{0.5} = 37 \mu\text{M}$)。また、シロイヌナズナの酵素と異なり、HseDH 活性 (ホモセリン酸化活性) は L-スレオニンによる阻害を受けなかった。シロイヌナズナの AK-HseDH では、調節ドメインの中に L-スレオニンと相互作用する 2 箇所のグルタミン残基が同定されているが、*T. maritima* の AK-HseDH ではそのうちの 1 つが欠落していた。一方、調節ドメインの二次構造 (2 つの loop- α -loop- β -loop- β motif) は、両酵素で保存されていることが二次構造予測で明らかとなった。これらの結果は、調節ドメインの構造は類似しているものの、*T. maritima* AK-HseDH における L-スレオニンの結合様式がシロイヌナズナの AK-HseDH とは大きく異なっており、これが L-スレオニンによる阻害様式の差の要因となることを示唆している。本研究は、超好熱菌に新規 AK-HseDH が存在することを明らかにした初めての例である。

平成 31 年 2 月 9 日、愛媛大学農学部で開催された学位論文審査委員会において、本論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して、博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。