

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名      黄 暉 凱

題 目      *Candida guilliermondii* 由来のフェノール酸脱炭酸酵素に関する研究  
(Catalytic Features of Phenolic Acid Decarboxylase from *Candida guilliermondii*)

*Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) 由来の熱に不安定なフェノール酸脱炭酸酵素は3日間簡便なカラムクロマトグラフィーのより精製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲル濾過により分子量はそれぞれ 20 kDaと36 kDaであることにより、本精製酵素はホモダイマーと示唆された。最適pHは約6.0で、最適温度は25°Cであった。0°Cの場合、50%以上の活性が見られたため、低温酵素であることが示唆された。本酵素は *p*-クマル酸、フェルラ酸、コーヒー酸をそれぞれ4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール、4-ビニルカテコールに変換した。それぞれの基質に対する比活性は約600、530、と46 U/mgであった。Mg<sup>2+</sup>は本酵素活性を促進したが、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、4-クロロマーキューリ安息香酸、*N*-ブロモスクシミド及びジエチルピロカーボは活性を阻害した。本酵素はフェルラ酸と*p*-クマル酸により誘導、発現されるが、非代謝性の6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸により顕著に誘導された。真核生物の本酵素の遺伝子を初めてクローニング、シーケンシングし、大腸菌中で高発現することができた。構造遺伝子は504 bp (168のアミノ酸) のORFを持ち、計算分子量は19,828 Daであって、本酵素の推定アミノ酸配列は他の細菌由来の機能性フェノール酸脱炭酸酵素との同一性は24-34%で、*Saccharomyces cerevisiae*のPAD1とFDC1タンパクとは14%以下であった。驚いたことに、*C. guilliermondii*の無細胞抽出液の限外ろ過液(分子量10,000カットオフ)が精製酵素のフェルラ酸脱炭酸活性を著しく活性化した。しかしながら、*p*-クマル酸脱炭酸作用にはほとんど効果がなかった。限外ろ過液をゲル濾過クロマトグラフィーしたところ、分子量1400以上のアミノチオール様の化合物が活性化に関与することが示唆された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Hui-Kai Huang

題 目 Catalytic Features of Phenolic Acid Decarboxylase from *Candida guilliermondii*  
(*Candida guilliermondii* 由来のフェノール酸脱炭酸酵素に関する研究)

A heat-labile phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) was purified to homogeneity by simple successive column chromatographies within 3 days. The molecular mass was 20 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and 36 kDa by gel-filtration chromatography, suggesting that the purified enzyme was a homodimer. The optimal pH and temperature were approximately 6.0 and 25°C. Characteristically, more than 50% of the optimal activity was observed at 0°C, suggesting that this enzyme was cold-adapted. The enzyme converted *p*-coumaric acid, ferulic acid, and caffeic acid to corresponding products with high specific activities of approximately 600, 530, and 46 U/mg, respectively. The activity was activated by Mg<sup>2+</sup> ions, while it was completely inhibited by Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, 4-chloromercuribenzoate, *N*-bromosuccinimide, and diethyl pyrocarbonate. The enzyme was inducible and expressed inside the cells moderately by ferulic acid and *p*-coumaric acid and significantly by non-metabolizable 6-hydroxy-2-naphthoic acid. The gene for this eukaryotic enzyme was cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli* for the first time. The structural gene contained an open reading frame of 504 bp, corresponding to 168 amino acids with a calculated molecular mass of 19,828 Da. The deduced amino acid sequence exhibited low similarity to those of functional phenolic acid decarboxylases previously reported from bacteria with 24–34% identity and to those of PAD1 and FDC1 proteins from *Saccharomyces cerevisiae* with less than 14% identity. Surprisingly, the ultrafiltrate (Mr 10,000-cut-off) of the cell-free extract of *C. guilliermondii* remarkably activated the ferulic acid decarboxylation by the purified enzyme, whereas it was almost without effect on the *p*-coumaric acid decarboxylation. Gel-filtration chromatography of the ultrafiltrate suggested that an endogenous amino thiol-like compound with a molecular weight greater than Mr 1,400 was responsible for the activation.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	黄 暉凱
審査委員	主 査 琉球大学 教授 伊藤 進
	副 査 琉球大学 准教授 平良 東紀
	副 査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副 査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副 査 琉球大学 教授 外山 博英
審査協力者	
題 目	Catalytic Features of Phenolic Acid Decarboxylase from <i>Candida guilliermondii</i> ( <i>Candida guilliermondii</i> 由来のフェノール酸脱炭酸酵素に関する研究)
<p>フェノール酸は植物の細胞壁に存在する。フェノール酸は食品、医薬品や化粧品に添加する天然バニリンのような高価な香気成分や香料の前駆体でもある。</p> <p>本研究では、酵母 <i>Candida guilliermondii</i>由来の熱に不安定なフェノール酸脱炭酸酵素を簡便なカラムクロマトグラフィーのより精製した。本精製酵素は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とゲル濾過による分子量がそれぞれ 20 kDaと 36 kDaであり、ホモダイマーを形成していると推定された。最適pHは約6.0、最適温度は25°Cであった。0°Cで最適温度の50%以上の活性が検出され、低温適応酵素であることが示唆された。</p> <p>本酵素は <i>p</i>-クマル酸、フェルラ酸、コーヒー酸をそれぞれ4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール、4-ビニルカテコールに変換し、それぞれの基質に対する比活性は約600、530、46 U/mgであった。本酵素活性はMg<sup>2+</sup>によって促進されたが、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、4-クロロマーキユーリ安息香酸、<i>N</i>-ブロモスクシミド及びジエチルピロカーボネートで阻害された。</p> <p>本酵素はフェルラ酸と<i>p</i>-クマル酸により若干誘導されるが、非代謝性の6-ヒドロ</p>	

キシ-2-ナフトエ酸による誘導性が顕著に認められた。

本酵素の遺伝子を初めてクローニングし、塩基配列を決定した。構造遺伝子は504 bp (168のアミノ酸) のopen reading frame を持ち(計算分子量、19,828)、推定アミノ酸配列は他の細菌由来の機能性フェノール酸脱炭酸酵素と24-34%の同一性しか無く、酵母*Saccharomyces cerevisiae*のPAD1とFDC1タンパクとは14%以下であった。当該遺伝子を大腸菌中で高発現することにも成功した。

*C. guilliermondii*の無細胞抽出液の限外ろ過液 (Mr 10,000-cut-off) が精製酵素のフェルラ酸脱炭酸活性を著しく活性化することが判明した。しかしながら、*p*-クマル酸脱炭酸作用にはほとんど効果がなかった。限外ろ過液をゲル濾過クロマトグラフィーしたところ、分子量1,400以上のアミノチオール様化合物が活性化に関与することが示唆された。

公開審査にあたり、本論文の新規な発見に対して、①酵素の活性化因子の推測、②活性化因子の誘導性、③活性化の反応動学的解析、④活性化因子の作用機構、⑤タンパク質工学的な解析法などについて、審査委員から多面的な質疑や示唆が提示された。

学位申請者は、これらの質疑に対して適切な回答を行い、今後の検討課題も明確に提示した (学位第9号様式参照)。また、本酵素の応用展開構想を述べた。

よって、審査委員会は申請者が博士 (農学) の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると判断した。

### 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	黄 暉凱
審査委員	主 査 琉球大学 教授 伊藤 進
	副 査 琉球大学 准教授 平良 東紀
	副 査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副 査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副 査 琉球大学 教授 外山 博英
審査協力者	
実施年月日	平成24年8月1日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は平成24年8月1日の公開審査会において、学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について口頭試問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	黄 暉凱
-------------	------

[質問 1] 限外ろ過液の低分子活性化物質の構造を推定しているか？

[回答 1] 現時点では分らないが、SHとアミノ基を持っているようである。

[質問 2] native enzymeを精製する際にCMからDEAEで収率が下がっているように見える。酵素とactivatorは親和性があるって精製途中で解離した可能性はあるか？

[回答 2] 精製工程の全ての画分で活性をチェックしている。一見収率が落ちたように見えるのは、不純タンパク画分を採取しなかったからである。精製過程にactivatorが除去されたと考えている。  
酵素-activator複合体を形成している可能性はあると思う。

[質問 3] FAとPCAに対する活性比が、cysteineによる活性化、人工誘導物質6 H<sub>2</sub>Nの有無、透析外液添加の場合などで違う。その反応メカニズムは同じか？ $K_m$ が変化せず、 $V_{max}$ が上昇するのは面白いデータだ。仮説でもいいから説明できるか？

[回答 3] 酵素のinductionとactivatorの生成のメカニズムは違うと思っている。FAに対する $V_{max}$ 上昇は活性化を示している。今後、引き続き検討して行きたい。

[質問 4] 還元力をターゲットしてmethionineを部位特異的変異している。活性化に還元性が関与していると思うか？

[回答 4] methionineには還元作用は無い。部位特異的変異の実験ではMet57が酸化されてFAが活性ポケットに入らなくなったという仮定を否定したものだ。還元が活性化に関与していると思う。還元剤による構造変化の可能性については今後検討したい。

[質問 5] cysteineを使った時の $V_{max}$ を調べたか？

[回答 5] 調べていない。今後検討したい。

[質問 6] 酸化されたmethionineがまた元に戻るという考えはあったのか？

[回答 6] DTTはmethionine sulfoxideを還元できない。細胞破壊の際にDTTを添加しているのでチェックしたところ、意外にも活性化効果があっ

た。

[質問 7] 酸化されたmethionineが元に戻せるものは何かあるか？

[回答 7] methionine sulfoxideを温和な条件で還元する生体内化合物は無い。  
*Saccharomyces cerevisiae*ではmethionine sulfoxide reductaseの存在が知られている。

[質問 8] cysteine残基の部位特異的変異をしたか？

[回答 8] 本残基はモデル上では酵素内部に埋没しているのでやっていない。

[質問 9] cysteineによる活性化の場合、preincubationのあるなしで結果が異ならなかったか？

[回答 9] 実験結果が振れるという事もあってやっていない。今後の検討課題としたい。

[質問 10] この菌は低温で生育するのか？

[回答 10] この菌は発酵タンク周りの低温箇所では分離されることが多い。

6H2Nより誘導された酵素は高活性なので低温で培養する必要はない。また、本酵素を利用してFAから4-VGを生産するには高濃度菌体懸濁液（または発酵）を使えば効率的に変換できるので、精製酵素自体を使用する必要はない。

[質問 11] activatorは6H2Nによって誘導されるのか？

[回答 11] 今後の検討項目に入っており、引き続き実験中である。

[質問 12] この酵素はdimerの形成は必須か？

[回答 12] バクテリアの論文でもdimerである。結晶構造が分かっている酵素も全てdimerとして存在しているようである。