

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	ヴィナムレタ ラクスマ Fina Amreta Laksmi
題 目	極限環境微生物由来酵素の産業利用に関する研究 (Study on industrial application of enzymes from extremophiles)
<p>極限微生物から分離された酵素は、工業プロセスで使用される条件に適応できる工業的に重要な酵素として大きな関心を集めている。この研究では、好熱性 L-アラビノースイソメラーゼ (L-AI) と <i>Geobacillus stearothermophilus</i> および <i>Halomonas</i> sp. 593 の好塩性アルカリホスファターゼがそれぞれ使用され、それらの特性は産業用途に対処するために改善された。L-AI は、D-ガラクトースを基質とする、低カロリーの糖代替甘味料である D-タガトースの製造における触媒として使用される酵素です。D-ガラクトースの異性化には、エネルギー障壁を克服し、反応平衡を D-タガトースにシフトするために高温が必要である。したがって、<i>G. stearothermophilus</i> の L-AI は、D-タガトース生産に望ましい熱安定性 L-AI であると予想される。しかし、産業上の要求に対しては、D-ガラクトースに対する基質特異性を改善するなど、いくつかの修正が必要だった。選択された残基の中で、残基 18 の変異により、変異株 H18T が生成され、野生型 (WT) 酵素と比較して D-ガラクトースの活性が増加した。H18T の基質特異性の分析により、D-ガラクトースは 45.4% の改善が示された。ヒスチジンを残基 18 でスレオニンに置き換えると、D-ガラクトースの基質結合と触媒効率がそれぞれ約 2.7 倍と 1.8 倍高くなった。L-アラビノースイソメラーゼの触媒作用中にホウ酸塩を添加することにより、D-ガラクトースに対する H18T の比活性および触媒効率がそれぞれ最大 2.7 倍および 4.3 倍さらに向上した。さらに、H18T は熱安定性を示し、不安定化は検出されなかった。基質特異性を改善するために、酸性条件下での L-AI の活性を改善する必要がある。アルカリ性の pH および高温で起こるメイラード反応を最小限に抑えるには、酸性の条件下での反応が望ましい。ここで、H18T の結合ポケット領域の周囲でエラープローン PCR を使用してランダム変異を誘発することで、pH 6.0 で改善された活性を示す、H18T タンパク質の潜在的なバリエーションである H18TY234C を取得した。このダブル H18TY234C 変異体は、H18T および野生型よりも pH 6.0 で 1.8 倍および 3 倍高い活性を有していたため、最適な pH 範囲が 6.0~8.0 に広がった。好塩性酵素は、多数の酸性アミノ酸とわずかに大きな疎水性アミノ酸を含んでおり、強い疎水性条件下でも非常に可溶性になります。しかし、塩分の少ない環境では不安定であるため、他の極限環境由来の酵素と比較して、工業用途に使用した場合、好塩性酵素は容易に分解する。好塩性酵素の安定化メカニズムを明らかにすることを目標とした。以前、非好塩性大腸菌において、<i>Halomonas</i> の好塩性アルカリホスファターゼ (HaALP) を発現させようとしたが、発現した HaALP はほとんど活性を示さなかった。したがって、本研究では、グラム陽性の非好塩性 <i>Brevibacillus chosinensis</i> で HaALP を過剰発現させた。HaALP は 6 M 尿素で変性され、さまざまな塩と非イオン性トリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) を使用してリフォールディングされ、ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動によって評価された。HaALP は、Na⁺イオンを含む 3 M NaCl または 3 M TMAO でリフォールディングされた。高塩濃度または TMAO による疎水性相互作用により、フォールディング中間体 (モノマー前駆体) の形成が促進され、Na⁺イオンのみがダイマー型を活性化した。</p>	