

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Fina Amreta Laksmi
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 石橋 松二郎
	副査 鹿児島大学 准教授 花城 勲
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 教授 安部 淳一
審査協力者	印
題目	Study on industrial application of enzymes from extremophiles (極限環境微生物由来酵素の産業利用に関する研究)
<p>極限環境微生物由来酵素は、工業プロセスにおけるさまざまな過酷な条件にも適応できる可能性がある。本研究では、好熱菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来L-アラビノースイソメラーゼ (GSAI) と好塩菌 <i>Halomonas</i> sp. 593由来アルカリフォスファターゼ (HaALP) を用い、産業利用のための性質検討や改良を行った。</p> <p>GSAIは、基質L-アラビノースをL-リブロースに触媒する酵素であるが、D-ガラクトースを基質とすると、希少糖D-タガトースを生成する。D-タガトースは、スクロースと比較して同程度の甘さや風味を示し、低カロリーのため、ダイエット食品や病院食の代替甘味料として期待されている。D-ガラクトースはGSAI本来の基質でないため、その触媒には、平衡反応をD-タガトースにシフトする高温での反応が必要である。したがって、D-タガトース生産には高温で安定な好熱菌由来GSAIを開発する必要がある。加えて、たとえ高温で反応させたとしても本来の基質L-アラビノースよりサイズが大きいため、D-ガラクトースに対する基質利用率が低く、産業利用では問題がある。そこでGSAIの基質結合部位付近をMOEソフトウェアを用いて解析し、部位特異的変異により、D-ガラクトースに対する基質利用率が改善したH18T変異体を作成した。その変異体は、野生型と比較してD-ガラクトースに対する親和性が2.7倍増大した。これにより、比活性と触媒効率</p>	

はそれぞれ約1.5倍と約1.8倍高くなった。活性が改良した変異体は、しばしば安定性が低下するが、このH18T変異体は、アミノ酸の変異による不安定化は示さなかった。

次に高温アルカリ条件下で起こるメイラード反応による着色を最小限に抑えるために、酸性条件下でも活性が抑えられない変異体の取得を行った。H18T変異体の基質結合部位周辺にエラープローンPCRを用いてランダムに変異を導入したライブラリーをスクリーニングし、pH 6.0下でも活性が抑えられないH18TY234C変異体を取得した。このH18TY234C変異体は、至適pHが6.0-8.0になり、特にpH 6.0下で野生型よりも3倍高い比活性を示した。これらの原因を明らかにするために酵素の速度論的解析やコンピューター解析を行ったところ、T18は基質が結合する領域の柔軟性に関与し、L-アラビノースよりサイズが大きいD-ガラクトースを間接的に結合しやすくしていることが示唆された。また、C234は基質結合部位から離れているが、プロテインモーションをとおり、触媒回転数を上昇させていることが示唆された。特に、pH6.0下ではD261のpKaを上昇させることに関与し、それが立体構造に影響を与えることで、間接的にD-ガラクトースとの親和性を改善していると推察された。

好塩性酵素は、酸性アミノ酸を多く含んでおり、大きな側鎖の疎水性アミノ酸はあまり含まれていないため、非常に可溶性が高く、凝集しにくいので産業的に有用である。しかし、低塩濃度下では不安定であるため、他の極限環境微生物由来酵素と比較して、産業的にあまり利用されていない。そのため好塩性酵素の安定化メカニズムを明らかにし、低塩濃度下でも安定化させることを目的とした。今回グラム陽性非好塩性*Brevibacillus chosinensis*を用いて、好塩菌由来HaALPを過剰発現させることに成功した。分泌した活性型HaALPを6 M尿素で変性させ、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) を用いてリフォールディングさせた。その効果をnative-PAGEによる四次構造解析と、活性の回復率で評価した。その結果、HaALPは3 M NaCl、もしくは3 M TMAOのような高い疎水的环境下で、フォールディング中間体 (モノマー前駆体) を形成し、Na<sup>+</sup>イオンが存在する時のみ活性型 (ダイマー) を形成することが明らかになった。この事はNa<sup>+</sup>イオンがHaALPの安定性に大きく関与していることを示唆している。

本研究成果は、好塩菌由来HaALPのフォールディングメカニズムを明らかにしたことと、好熱菌由来GSAIを、タンパク質工学的手法を用いて改良し、そのメカニズムを速度論的解析やコンピューター解析により考察したものであり、極限環境微生物由来酵素の新たな産業利用に寄与するものである。

以上のことから、本論文は博士 (農学) の論文として十分に価値のあるものと判定した。