

学 位 論 文 題 名

N-アシルアミノ酸ラセマーゼの
諸性質とその応用に関する研究

学位論文内容の要旨

L-アミノ酸は主に直接発酵法により生産されているが、化学合成されたラセミ体を原料とした酵素を用いる生産方法もいくつか開発されている。酵素法の一つにL-アミノアシラーゼをN-アシル-D L-アミノ酸に作用させL-アミノ酸を生産する光学分割法が知られている。この方法においてL-アミノアシラーゼはL体の基質を立体選択的に加水分解し、D体の基質は未反応のまま反応系に残存する。このため変換率は50%を越えることはない。原料を全てL-アミノ酸に変換するには残存するD体を反応系から分離後、化学的あるいは物理的にラセミ化し、再度L-アミノアシラーゼを作用させる操作を繰り返す必要がある。もし、L-アミノ酸に作用せず、N-アシルアミノ酸だけをラセミ化する酵素が存在するならば、L-アミノアシラーゼとの共同作用により、N-アシル-D L-アミノ酸を見かけ上一段階の反応で全てL-アミノ酸に変換することが可能となる。また、同様にD-アミノアシラーゼと、このようなラセミ化酵素を同時に作用させるならば、同じ原料からD-アミノ酸を効率よく製造することが可能となる。しかし、アミノ酸には作用せずN-アシルアミノ酸のみをラセミ化する酵素は全く知られていない。

このような背景の中で本研究は、光学活性なアミノ酸の効率的な製造法の確立を目的として、新規ラセミ化酵素を広く微生物界に探索した。

1. 新規なラセマーゼの探索

目的の酵素活性を有する微生物は、その作用によりN-アシル-D-アミノ酸をL体に変換し、さらにL-アミノアシラーゼの作用によりL-アミノ酸を生成することが推定された。スクリーニングは、液体培地にN-アセチル-D-メチオニンを添加して微生物を培養後、L-アミノアシラーゼを添加し、L-メチオニン生成の有無を調べて行った。さらに、L-メチオニンはD-アミノアシラーゼとアミノ酸ラセマーゼの作用により生成する可能性もあるため、D-メチオニンからL-メチオニンを生成しないことを確認して本酵素の生産菌と判断した。細菌、放線菌、かび、酵母など約50,000株を調べた結果、放線菌類にのみ目的とする酵素生産菌を見いだした。

2. N-アシルアミノ酸ラセマーゼの精製と酵素化学的諸性質

比較的強い酵素活性を示した *Streptomyces atratus* Y-53 (Y-53株) および *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (TS株) から疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過などを用いて、本酵素を精製した。

分子量は、Y-53 株で約 240,000、TS 株で約 300,000、サブユニットの分子量はそれぞれ約 41,000、約 40,000 と推定されたので、それぞれの酵素は 6 個および 8 個の分子量的に同一のサブユニットから構成されていると考えられた。TS 株の酵素は Y-53 株の酵素に比べ熱安定性に優れており 55℃、30分間の加熱処理でも安定であった。アミノ酸関連のラセマーゼでは金属イオンによる活性化は全く報告されていないが、本酵素は Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} などの金属イオンにより活性が著しく促進された。基質特異性はいずれも同じ傾向を示し、芳香族アミノ酸を含む疎水性アミノ酸（メチオニン、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリンなど）のアシル誘導体に対し作用した。一方、アミノ酸、N-アルキルアミノ酸には全く活性を示さなかった。諸性質および基質特異性から、本酵素は既知のアミノ酸ラセマーゼとは全く異なる新規なラセマーゼであることが明らかになったので、本酵素を”N-アシルアミノ酸ラセマーゼ”と命名した。

3. 耐熱性N-アシルアミノ酸ラセマーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現

本酵素の大量生産法を確立するために、TS 株から本酵素遺伝子を λ gt11 をベクターとした抗体法を用いてクローニングした。本酵素遺伝子は 1107 塩基のオープンリーディングフレームから成り 368 アミノ酸残基をコードしていた。N末端のメチオニンはATGではなくGTGでコードされ、GC含量は約 70% の値を示した。市販のデータベースを用いてホモロジー検索を行ったが、本酵素遺伝子および推定されるアミノ酸配列と高い相同性を示すものはなく、本酵素が新規なものであることがこのことから示唆された。

本酵素遺伝子が大腸菌で高発現させるためT7プロモーターでの発現を試みた。部位特異的変異法を用いて本酵素遺伝子の開始コドン部位に Nde I サイト、終止コドン近傍に Bgl II サイトを作成し、T7発現ベクター pET-3c の Nde I-Bam HI サイトに連結し、発現プラスミドを構築した。このプラスミドを持つ大腸菌 MM294 は IPTG 誘導下で本酵素を大量に生産し、その発現量は、大腸菌可溶性タンパク質の 17~18% に達した。大腸菌での本酵素の生産性は放線菌に比べ1100倍に上昇した。

4. 形質転換体からのクローン化酵素の精製と諸性質

クローン化酵素は大腸菌形質転換体を破碎後、熱処理（60℃、30分間）および、疎水クロマトグラフィーの二段階の精製法により 65% の高収率で電気泳動的にほぼ単一なまでに精製された。クローン化酵素の性質を調べたところ天然型の酵素の性質とほぼ一致した。クローン化酵素では金属イオンの酵素活性に与える影響がより明確になり、金属イオン無添加の場合、ほとんど酵素活性を示さなかった。また、クローン化酵素と天然型酵素のアミノ酸組成は一致し、かつDNAの塩基配列から予想されるものともよく一致した。

5. バイオリアクターによる効率的な光学活性アミノ酸の生産

L-アミノアシラーゼと本酵素を DEAE-Toyopearl 650M に吸着させ、カラムに充填後、N-アセチル-DL-メチオニンを原料として、30℃、SV=1.0、基質濃度 0.5% の条件下で反応を行った。通常の光学分割反応では、ラセミ体原料の片方の光学異性体のみを基質とするため、変換率は 50% 以下である。一方、ラセミ化酵素を添加した本反応では一段階の反応でL-メチオニンが変換率 98% で生成した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

N-アシルアミノ酸ラセマーゼの 諸性質とその応用に関する研究

本論文は、和文137頁、図36、表25、引用文献55、4編および総括からなり、他に参考論文10編が付されている。

L-アミノ酸は主に直接発酵法により生産されているが、N-アシル-DL-アミノ酸をL-アミノアシラーゼで加水分解し、L-アミノ酸を生産する光学分割法も知られている。L-アミノアシラーゼはL体の基質を立体選択的に加水分解し、D体の基質は未反応のまま反応系に残存する。原料を全てL-アミノ酸に変換するには残存するD体を反応系から分離後ラセミ化し、再度L-アミノアシラーゼを作用させる操作を繰り返す必要がある。もし、L-アミノ酸に作用せず、N-アシルアミノ酸だけをラセミ化する酵素が存在するならば、L-アミノアシラーゼとの共同作用により、N-アシル-DL-アミノ酸を一段階の反応で全てL-アミノ酸に変換することが可能となる。また、同様にD-アミノアシラーゼと、このようなラセミ化酵素を作用させるならば、同じ原料からD-アミノ酸を製造することが可能となる。本研究は、光学活性なアミノ酸の効率的な製造法の確立を目的として、新規ラセミ化酵素を広く微生物界に探索した。

第一編ではN-アシルアミノ酸ラセマーゼの探索について、そして第二編では新たに発見されたについてその諸性質について述べられ、下記の内容が含まれている。

細菌、放線菌、かびおよび酵母を調べた結果、放線菌類に目的とする酵素生産菌を見いだした。比較的強い酵素活性を示した *Streptomyces atratus* Y-53 (Y-53株) および *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (TS 株) から、本酵素を精製した。分子量は、Y-53 株で約 240,000、TS 株で約 300,000、サブユニットの分子量はそれぞれ約 41,000、約 40,000 と推定されたので、それぞれの酵素は 6 個および 8 個の分子量的に同一のサブユニットから構成されていると考えられた。TS 株の酵素は Y-53 株の酵素に比べ熱安定性に優れており 55℃、30分間の加熱処理でも安定であった。アミノ酸関連のラセマーゼでは金属イオンによる活性化は報告されていないが、本

酵素はいずれも Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} などの金属イオンにより活性が著しく促進された。両酵素は共に疎水性アミノ酸（メチオニン、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリンなど）のアシル誘導体に作用した。一方、アミノ酸、N-アルキルアミノ酸には全く活性を示さなかった。これらの諸性質および基質特異性から、本酵素が新規なラセマーゼであることが明らかになったので、“N-アシルアミノ酸ラセマーゼ”と命名した。

第三編では耐熱性N-アシルアミノ酸ラセマーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現について述べられ、下記の内容が含まれている。

本酵素の大量生産法を確立するために、TS株から本酵素遺伝子を λ gt11をベクターとした抗体法を用いてクローニングした。本酵素遺伝子は1107塩基のオープンリーディングフレームから成り368アミノ酸残基をコードしていた。つぎに、本酵素遺伝子が大腸菌で高発現させるため、T7プロモーターを用いて発現プラスミド構築した。このプラスミドを持つ大腸菌MM294は本酵素を大量に発現した。

第四編では、大腸菌による耐熱性N-アシルアミノ酸ラセマーゼの大量生産とクローン化酵素の精製と諸性質について述べられ、下記の内容が含まれている。

T7プロモーターを用いて発現プラスミド構築し、このプラスミドを持つ大腸菌MM294はIPTG誘導下で本酵素を大量に生産し、その発現量は大腸菌可溶性タンパク質の17~18%に達した。また生産性は放線菌に比べ1100倍に上昇した。クローン化酵素は大腸菌形質転換体を破碎後、熱処理および疎水クロマトグラフィーの二段階の精製法により65%の高収率で電気泳動的にほぼ単一なまでに精製された。クローン化酵素の性質を調べたところ天然型の酵素の性質とほぼ一致した。

第五編ではN-アシルアミノ酸ラセマーゼとL-アミノアシラーゼを用いたバイオリアクターによる効率的な光学活性アミノ酸の生産について述べられ、下記の内容が含まれている。

L-アミノアシラーゼと本酵素をDEAE-Toyopearl 650Mに吸着させ、カラムに充填後、N-アセチル-DL-メチオニンを原料として反応を行った。通常の光学分割反応では、ラセミ体原料の片方の光学異性体のみを基質とするため、変換率は50%以下である。一方、ラセミ化酵素を添加した本反応では一段階の反応でL-メチオニンが変換率98%で生成し、変換率が大幅に上昇した。

以上のように、本研究はN-アシルアミノ酸を特異的にラセミ化する新規な酵素を自然界に見いだし、その諸性質を明らかにした。つぎに、本酵素遺伝子を放線菌からクローニングし、大腸菌で高発現させ、本酵素の大量生産を可能にした。さらに、光学活性なアミノ酸の効率的な新製造法を確立した。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 徳山 真治 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。