

学位論文題名

1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレートデアミナーゼ

の部位特異的変異法を用いた反応機構解析

学位論文内容の要旨

1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレート (ACC) は植物ホルモン・エチレン生合成の鍵となる特異的な前駆体で、三員環を持つアミノ酸という特徴を持っている。植物ではこの三員環の分解によってエチレンを発生する。土壌中の微生物には ACC を唯一の窒素源として生育し得るものがある。これらの微生物は ACC をアンモニアと α -ケト酪酸に分解する酵素 ACC デアミナーゼを持つ。この酵素の遺伝子を植物の中で発現させるとエチレンの発生を抑えることができるという考えから ACC デアミナーゼ遺伝子を持つトマトが作られ、貯蔵性の良いトマトの生産に成功し、安全性等の試験結果も発表されている。また油糧植物カノーラの根の成長を促進する微生物の作用と ACC デアミナーゼとの関係についての実験結果も報告されている。ACC デアミナーゼの酵素としての特徴はビタミン B₆、ピリドキサルリン酸 (PLP) を持つことと三員環を開環することにある。反応機構の仮説は述べられているが証明されていない。反応機構の解析は一般に、酵素の三次元構造の解析と反応の速度論的解析の両面から進められる。どちらにとっても酵素を解析に適する良好な状態で得られることが非常に重要である。本論文は、以上の観点に立って、酵素の高発現系の構築、部位特異的変異法の確立、得られた酵素による反応の速度論的解析について述べたものである。

1. ACC デアミナーゼの大腸菌による高発現系の構築

ACC デアミナーゼの高発現は *Pseudomonas* sp. ACP から得られた遺伝子を挿入するプラスミドと *trc* プロモーターを持つ pTrc99A の組み合わせから得られたプラスミド pACCD-2 を大腸菌 *E. coli* JM109 に発現させて達成された。発現には誘導剤イソプロピルチオ- β -ガラクトシドを必要とし、活性の上昇にピリドキシンを培地に添加することが有効であった。*Pseudomonas* 細菌の培養に比較して培養液 1 ml の活性は 9 倍となり、抽出液のタンパク質 1 mg の活性は 17 倍であった。抽出液を用いて硫酸塩析と 3 本のカラムによる簡素化した精製法を確立した。精製酵素は設計によって元の酵素の N 末端に 3 残基余分に持つが、基質 ACC に対する K_m 等の性質に変化は認められなかった。

2. 変異酵素の構築と精製

ACC デアミナーゼの変異部位を計画する時、次の 2 点を考慮した。1) PLP が Schiff 塩基を形成しているリジン残基は PLP を結合することの他に重要な役割を持っていることがアスパラギン酸アミノ基転移酵素で解明されている。2) ACC デアミナーゼの構造はトリプトファン合成酵素 β -サブユニットの構造

に類似する証拠がある。1) から ACC デアミナーゼの PLP との Schiff 塩基形成部位のリジン残基 (Lys51) が、2) から PLP 結合部位の 3 残基後のリジン残基 (Lys54) が選ばれた。トリプトファン合成酵素 β -サブユニットでは PLP 結合部位リジンから後は α -ヘリックスを形成し、3 残基後の側鎖は PLP 結合部位の側鎖と近い方向にある。変異は Kunkel 法と PCR 法を用い、リジン (K) をアラニン (A)、スレオニン (T)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、アルギニン (R) に変異した酵素 K51A、K51T、K51Q、K51R、および K54A、K54N、K54Q、K54R を作成した。PLP Schiff 塩基形成部位を変異した酵素は PLP の保持率 (20 ~ 30 %) が低く、この残基が補酵素の酵素への取り込みに重要な役割を持っていることが示された。変異酵素に保持された PLP は Schiff 塩基を形成していないことがスペクトルから観察された。また、これらの変異酵素は変性によって不溶化し易く、30 % グリセロールの添加を必要とし実験に制限が加えられた。

3. 反応機構について

ACC デアミナーゼは 1) ACC 分解反応、2) D-セリン分解反応、3) D-アラニン α プロトン脱離反応を触媒する。1) は産物 α -ケト酪酸の測定、2) は産物ピルビン酸の測定、3) は光吸収スペクトル上の 510nm 附近の吸収ピークの観察によって解析された。

リジン残基 51 を変異した酵素は全て ACC 分解活性を失った。精製した K51A 変異酵素に ACC を加えると、保持されている PLP と ACC との間に Schiff 塩基を形成することがスペクトルから観察された。この基質の結合は可逆的であることが透析によって示された。一方、K51A 変異酵素は D-セリン分解活性を示し、 α -プロトン脱離反応が起きていることを示唆したが D-アラニンでは観察されなかった。Schiff 塩基の形成からアミノ酸との見かけの解離定数を測定すると ACC、L-セリン、L-アラニンで低く、D-セリンと D-アラニンで高かった。この傾向は健全な酵素の K_m および K_i の傾向と同一であり、アミノ酸との親和性の傾向は変異しても維持していることが示された。このように、リジン残基 51 の変異は PLP の保持を完全には阻止せず、保持された PLP は基質 ACC と Schiff 塩基を形成し、酵素は基質と正常に結合することが示された。しかし反応 1) の活性が失われているので三員環の開環にリジン残基 51 が重要な役割を持っていることが考えられる。一方、変異酵素は反応 2) の活性を保持するので、D-セリンの α -プロトン脱離にとってリジン残基 51 は重要ではないと考えられる。

リジン残基 54 を変異した酵素も全て、ACC 分解活性を失った。精製した K54A 変異酵素は D-セリン分解活性を持ち、D-アラニンの α -プロトン脱離反応もスペクトル上で示された。吸収スペクトルは K54A 変異酵素が ACC を結合して Schiff 塩基を形成すること、この Schiff 塩基の形成は可逆的であることを示した。

以上のように、2つのリジン残基が ACC の三員環開環の反応に重要な役割を持っていること、D-セリンや D-アラニンの α -プロトンの脱離に関与する基は ACC 三員環の開環に関与する基とは異なる可能性が示された。

以上の結果は、1) ACC デアミナーゼの大腸菌による高発現系を作り、酵素の精製を容易にして、反応機構解析の基礎的条件を設定し、2) 部位特異的変異を導入する系を作り、モデル酵素を使って変異酵素を精製し、3) 精製酵素を用いて、リジン残基 51 と 54 が ACC 三員環開環反応に重要な役割を持っていること、三員環開環反応と D-セリン分解反応との違いを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 守

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 助 教 授 松 井 博 和

学 位 論 文 題 名

1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレートデアミナーゼ

の部位特異的変異法を用いた反応機構解析

本論文は、序論と総合考察を含めて5章で構成され、図38、表12、引用文献94を含む96頁の和文論文である。別に参考論文2編が添えられている。

1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレート (ACC) は植物ホルモン・エチレン合成の鍵となる特異的な前駆体で、三員環を持つアミノ酸という特徴を持っている。植物ではこの三員環の分解によってエチレンを発生する。土壌中の微生物には ACC を唯一の窒素源として生育し得るものがある。これらの微生物は ACC をアンモニアと α -ケト酪酸に分解する酵素 ACC デアミナーゼを持つ。この酵素の遺伝子を持つトマトが米国の企業で作られ、貯蔵性の良いトマトの生産に成功し、安全性等の試験結果も発表されている。また油糧植物カノーラの根の成長を促進する微生物の作用と ACC デアミナーゼとの関係についての実験結果も報告されている。ACC デアミナーゼの酵素としての特徴はビタミン B6、ピリドキサルリン酸 (PLP) を持つことと三員環を開環することにある。反応機構の仮説は述べられているが証明されていない。反応機構の解析は一般に、酵素の三次元構造の解析と反応の速度論的解析の両面から進められる。どちらにとっても酵素を解析に適する良好な状態で得られることが非常に重要である。本論文は、以上の観点に立って、酵素の高発現系の構築、部位特異的変異法の確立、得られた酵素による反応の速度論的解析について述べたものである。

1. ACC デアミナーゼの高発現は *Pseudomonas* sp. ACP から得られた遺伝子と *trc* プロモーターを持つ pTrc99A の組み合わせから得られたプラスミド pACCD-2 を大腸菌 *E. coli* JM109 に発現させて達成された。発現には誘導剤イソプロピルチオ- β -ガラクトシドを必要とし、活性の上昇にピリドキシンを培地に添加することが有効であった。*Pseudomonas* 細菌の培養に比較して培養液 1 ml の活性は 9 倍となり、抽出液のタンパク質 1 mg の活性は 17 倍であった。抽出液を用いて簡素化した精製法を確立した。

2. ACC デアミナーゼの変異部位を計画する時、次の 2 点を考慮した。1) PLP が Schiff 塩基を形成しているリジン残基は PLP を結合することの他に重要

な役割を持っている。2) ACC デアミナーゼの構造はトリプトファン合成酵素 β -サブユニットの構造に類似する証拠がある。1) から ACC デアミナーゼの PLP 結合部位リジン残基 (Lys51) が、2) から PLP 結合部位の 3 残基後のリジン残基 (Lys54) が選ばれた。変異は Kunkel 法と PCR 法を用い、リジン (K) をアラニン (A)、スレオニン (T)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、アルギニン (R) に変異した酵素 K51A、K51T、K51Q、K51R、および K54A、K54N、K54Q、K54R を作成した。PLP 結合部位を変異した酵素は PLP の保持率 (20 ~ 30 %) が低く、この残基が補酵素の酵素への取り込みに重要な役割を持っていることが示された。

3. ACC デアミナーゼは 1) ACC 分解反応、2) D-セリン分解反応、3) D-アラニン α プロトン脱離反応を触媒する。1) は産物 α -ケト酪酸の測定、2) は産物ピルビン酸の測定、3) は光吸収スペクトル上の 510nm 附近の吸収ピークの観察によって解析された。

PLP 結合部位リジン残基 51 を変異した酵素は全て ACC 分解活性を失った。精製した K51A 変異酵素に ACC を加えると、保持されている PLP と ACC との間に Schiff 塩基を形成することがスペクトルから観察された。この基質の結合は可逆的であることが透析によって示された。K51A 変異酵素は D-セリン分解活性を示し、 α -プロトン脱離反応が起きていることを示唆したが D-アラニンでは観察されなかった。

PLP 結合部位の 3 残基後のリジン残基 54 を変異した酵素も全て、ACC 分解活性を失った。精製した K54A 変異酵素は D-セリン分解活性を持ち、D-アラニンの α -プロトン脱離反応もスペクトル上で示された。吸収スペクトルは K54A 変異酵素が ACC を結合して Schiff 塩基を形成すること、この Schiff 塩基の形成は可逆的であることを示した。

以上の結果から、2つのリジン残基が ACC の三員環開環の反応に重要な役割を持っていること、D-セリンや D-アラニンの α -プロトンの脱離は、三員環の開環に関与する基とは異なる基による可能性が示された。

以上の成果は、植物ホルモン・エチレン生合成前駆体の ACC を分解する酵素 ACC デアミナーゼについて、高発現を使った簡素化した精製法と変異酵素の調製法を確立し、重要な 2つのアミノ酸側鎖の役割を解析したものである。このことは学術的に高く評価され、反応の機構の解析に役立つものと考えられる。よって、審査員一同は 邑上 豊隆 が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。