

氏名	かわい たかひろ 川 合 隆 博
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	甲第161号
学位授与年月日	平成16年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on the biosynthesis of $\epsilon$ -poly-L-lysine ( $\epsilon$ -ポリ-L-リジンの生合成に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 和泉好計 (副査) 築瀬英司 古田 武 河田康志

## 学位論文の内容の要旨

$\epsilon$ -ポリ-L-リジン ( $\epsilon$ -PL) は放線菌の一種である *Streptomyces albulus* が培養液中に生産するホモポリペプチドで、25~35個のL-リジンから成り、一方のL-リジンの  $\epsilon$  位のアミノ基と他方のL-リジンの  $\alpha$  位のカルボキシル基がペプチド結合によって直鎖状に結合したユニークな構造をしている。

$\epsilon$ -PLは細菌などに対する増殖抑制効果を示すことから、現在食品保存料として広く用いられている。

しかし  $\epsilon$ -PL生産菌の菌体内で  $\epsilon$ -PLがどのような酵素によって作られるかは全く知られていない。そこで本研究では、 $\epsilon$ -PLの生合成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず  $\epsilon$ -PL生合成酵素活性の検出には高感度の検出方法が必須と考え、ラジオアイソトープを用いた  $\epsilon$ -PLの検出方法を確立した。この方法を用いて  $\epsilon$ -PL生産菌の無細胞抽出液による  $\epsilon$ -PL生合成を試みた結果、L-[ $^{14}$ C]-リジンからATP依存的に、 $\epsilon$ -PLと推定される化合物の生成が確認された。その後更に詳細な検討を行い、下記のことが明らかとなった。

- (1) 酵素反応液中から酵素反応生成物を精製したのち、MALDI-TOF MSなどの解析によって、酵素反応生成物が  $\epsilon$ -ポリ-L-リジンであることを確認した。
- (2) 本酵素反応は、L-リジンを基質とし、マグネシウムイオンもしくはマンガンイオン及び、ATPに依存的であった。
- (3) 酵素反応液中にタンパク質合成阻害剤及びリボヌクレアーゼを添加しても  $\epsilon$ -PLの生成が見られたことから、 $\epsilon$ -PLの生成はリボゾーム非依存的であることが明らかとなった。
- (4) この  $\epsilon$ -PL合成活性は、膜画分中に多く見られたことから、本酵素は膜結合型の酵素であることが示唆された。
- (5) 部分精製酵素による酵素反応中にリジン依存的なAMPの生成が確認された。
- (6) 部分精製酵素液中には、リジン依存的なATP-PPi交換反応が検出されたことから、 $\epsilon$ -PL生成の初発段階として、リジンのアデニル化による活性化反応が示唆された。

以上のことから本研究によって、無細胞系での酵素的な  $\epsilon$ -PL生合成を初めて明らかにすることができた。

## 論文審査の結果の要旨

$\epsilon$ -ポリ-L-リジン ( $\epsilon$ -PL) は、微生物 *Streptomyces albulus* の生産する L-リジンのホモポリマー (重合度  $n=25-35$ ) で、 $\epsilon$  位のアミノ基と  $\alpha$  位のカルボキシル基がペプチド結合しているユニークなホモポリアミノ酸である。本物質は、これまでに抗菌性や抗ファージ性等の生理活性を示すことが知られており、現在工業生産され食品保存料などの用途に使用されている。しかし  $\epsilon$ -PL 生産菌における  $\epsilon$ -PL の生合成メカニズムはこれまでほとんど知られていなかった。

本研究で筆者は、 $\epsilon$ -PL 生合成メカニズム解明のために必要不可欠な、高感度かつ簡便な  $\epsilon$ -PL 合成酵素活性の検出方法を確立し、無細胞系での酵素的合成に成功した。以下にその研究成果を要約する。

- (1)  $\epsilon$ -PL 生産菌から調製した酵素液と [ $^{14}\text{C}$ ] リジンを用いた酵素反応を行い、MALDI-TOF MS などによる反応生成物の同定・解析の結果、重合度  $n=11-30$  の  $\epsilon$ -PL が合成されていることを確認した。
- (2) 本酵素反応は、L-リジンを基質とし、 $\text{Mg}^{2+}$  もしくは  $\text{Mn}^{2+}$  及び、ATP に依存的であった。
- (3)  $\epsilon$ -PL の生成はリボゾーム非依存的であった。
- (4) この  $\epsilon$ -PL 合成酵素は膜結合型の酵素であった。
- (5) 酵素反応中にリジン依存的な AMP の生成が確認されたことと、リジン依存的な ATP-PPi 交換反応が検出されたことから、 $\epsilon$ -PL 生成の初発段階として、リジンのアデニル化による活性化が示唆された。

以上のように本研究によって  $\epsilon$ -PL 合成酵素活性の検出方法が確立され、酵素的な  $\epsilon$ -PL 合成に成功したが、この研究成果は、これまで困難を極めていた  $\epsilon$ -PL の生合成研究のブレイクスルーとなるものであり、 $\epsilon$ -PL の生産性向上にも将来貢献できる画期的な成果である。

以上のことから本論文は、応用微生物学、応用酵素学、および生物応用工学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。