

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 窪田 高秋 印

題 目 STUDIES ON THE BIOTIN BIOSYNTHETIC ENZYMES
OF VARIOUS THERMOPHILES
(好熱菌由来ビオチン生合成系酵素の研究)

学位論文の概要及び要旨

ビオチン(ビタミン H)はカルボキシラーゼの補酵素として微生物だけでなく高等生物にとっても必須の生体内物質であり現在、化粧品・飼料などへの添加物として広く用いられている。一方、好熱性微生物や好熱性酵素は応用的・実用的に用いる場合、滅菌や冷却コストの低減が図れるなど、環境配慮型バイオ生産システムの重要な因子として大きな利点を有することが知られている。これまでビオチンの生合成などビオチン代謝に関する研究は専ら常温性の微生物や植物、動物を用いて行われてきた。本研究では今まで全く報告がない好熱菌のビオチン生合成系遺伝子およびそれらの活性を有する酵素をいくつか見出し、それらの特性解明と比較・評価からライブラリの構築を行うことを目的とした。構築できたライブラリはビオチン生産やその中間体合成、中間体の酵素的定量など多くの応用・実用に利用可能である。

本研究では特に BioF(ビオチン生合成系の第2段階の反応、ピメリル CoA + L-アラニン→7-ケト-8-アミノペラルゴン酸 + CoA + CO₂ を触媒する酵素) 関連について検討を行い以下に示すような成果を得た。

1) 全ゲノムがすでに解明されている高度好熱菌 *Thermus thermophilus* からバイオインフォマティクス的手法を用いて、ビオチン生合成に関わる酵素遺伝子を探索し、そのうち *bioF* ホモログを見出した。これを大腸菌内で発現させ、精製した組換えタンパク質の諸性質を検討した結果、至適温度は 70℃で、温度安定性も高いこと(70℃, 1hで 90%活性残存)を明らかにし、同酵素が属するα-oxoamine synthase ファミリーとしても初めての好熱性酵素であることが分かった。BioF 活性とともに 2-アミノ-3-ケト酪酸 CoA リガーゼ活性の2種類の酵素活性を示す基質特異性の点でも初めての α-oxoamine synthase ファミリー酵素であることを明らかにした。

2) バイオインフォマティクス手法から、*T. thermophilus* 以外にビオチン生合成系酵素を持つと推定される好熱菌を5種見出した。そこでこれらのゲノムから *bioF* ホモログ遺伝子をクローニングし、組換え酵素を調製するとともに、BioF 活性を検出することに成功し、これらのすべての遺伝子と酵素の特性解明および比較・評価を行った結果、初期の目的である好熱性 BioF 酵素のライブラリが構築できた。