

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Khan Md. Iqbal Hassan
審査委員	<p>主査 澤 嘉弘 (印)</p> <p>副査 柴田 均 (印)</p> <p>副査 松下 一信 (印)</p> <p>副査 尾添 嘉久 (印)</p> <p>副査 森 信寛 (印)</p>
題目	Molecular Engineering of Glutamate Dehydrogenase from <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>Bacillus subtilis</i> 由来グルタミン酸脱水素酵素の分子工学)
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>グルタミン酸脱水素酵素(GluDH)は、補酵素 NAD(P)<sup>+</sup>の存在下、L-グルタミン酸(L-Glu)から 2-オキソグルタル酸(2-OG)およびアンモニアを生成する酸化的脱アミノ反応とその逆反応である還元的アミノ化反応を触媒する酵素であり、生物界に広く分布し細胞内窒素代謝において中心的役割を果たしている。GluDH の極端に小さな平衡定数は、L-Glu、2-OG、アンモニアの定量分析に有用であり、臨床化学、バイオプロセス、栄養化学の領域で特に注目されている。また、NAD<sup>+</sup>は、NADP<sup>+</sup>より試薬として安価であるので、NAD 依存型 GluDH はとりわけ有用と考えられている。<i>Bacillus subtilis</i> には、二種の GluDH 遺伝子(rocG, gutB)が存在しており、その内、RocG が構成的に発現している主要な Bs-GluDH であり、NAD 依存型酵素であると報告されている。</p> <p>本学位論文では、常温性の NAD 依存型 GluDH として <i>Bacillus subtilis</i> 由来の rocG 遺伝子に着目し、①そのクローニングと発現、精製および酵素化学的性質の検討、②ランダム変異による耐熱性の改善、③部位特異的変異による基質特異性の改変を行っている。</p> <p>まず、<i>B. subtilis</i> ISW1214 株より rocG 遺伝子をクローニングし、大腸菌での高発現化に成功している。リコンビナント酵素を各種クロマトグラフィーにより均一にまでに精製し、酵素化学的特徴付けを行い、本酵素が、サブユニット分子量 46kDa の典型的な NAD 依存型六量体酵素であり、その反応性は L-Glu に特異的であることを確認している。また、本酵素の熱安定性はきわめて低く、50%失活温度(T<sub>m</sub>20min)は 41℃であり、ゲル濾過分析等により、この熱失活は、六量体構造から三量体構造への解離が起こるためであることを明らかにしている。</p> <p>次に、本酵素の低い熱安定性を改善するために、進化分子工学的手法により耐熱化を試みている。ランダム変異法として Error-prone PCR を用い、4 ラウンドのランダム変異-スクリーニングの結果、T<sub>m</sub> が野生型酵素と比較して 22℃も上昇した耐熱化変異酵素を得ることに成功している。次に、スクリーニングの過程で得られた耐熱化変異酵素の変異部位を決定し、それぞれの単置換変異酵素を作製し、耐熱化に関与しているアミノ酸残基の解析を行っている。最終的に Q144R(T<sub>m</sub> □20℃)と E27F(T<sub>m</sub> □7℃)変異が耐熱化の大部分に貢献していることを明らかにしている。また、Q144R の kcat 値は野生型酵素の 1.3 倍も高く産業用酵素として有望であることも明らかにしている。四次構造モデルの解析から、Gln144 部位は、六量体構造の上下三量体を繋ぐ A-F ダイマーユニット間の二回軸中心付近に存在する残基であり、Arg に置換されることにより、両サブユニット主鎖間の水素結合が増加することでインターフェース相互作用が強化されることで耐熱化していると考察している。Glu27 に関しては、サブユニット内の NAD 結合ドメインと触媒ドメインをつなぐヒンジ領域に位置しており、E27F 変異により、</p>	

表面に露出していた親水性 Glu 残基が疎水性 Phe に置換されることにより側鎖の向きが内部方向へと変化し、不安定なヒンジ領域付近がコアパッキング効果で安定化されたものであると考察している。

最後に、Bs-GluDH で基質 2-オキソグルタル酸(2-OG)の結合ポケットを形成している三カ所のアミノ酸残基の部位特異的変異を行い、オキサロ酢酸(OAA)に対する反応性の改変を試みている。それぞれ、野生型酵素と耐熱化酵素(Q144R)を鋳型として、K80R, G82K, G82R, M101K, M101S 変異酵素を作製している。野生型酵素から作製した変異酵素の中で、G82K, M101S は、OAA に対して劇的に高い反応性を示すようになり、本来の基質である 2-OG に対する反応性のそれぞれ 265 倍、473 倍も高くなった。これらの変異酵素の OAA に対する kcat 値はそれぞれ  $3.45 \text{ s}^{-1}$  と  $5.68 \text{ s}^{-1}$  であり、L-Asp の生産に用いるにはやや低い反応性ではあるが、今後産業用酵素として有望であると結論している。また、驚くべき事に、Q144R から作製した変異酵素(G82K, M101S)は、OAA に対する反応性よりもピルビン酸に対する反応性の方が数倍大きくなっていたことも明らかにしている。

以上、本学位論文は、常温性細菌由来の GluDH の構造と機能改変について、特に耐熱化と基質特異性改変で優れた成果をあげており、今後、アミノ酸脱水素酵素の分子設計分野で大いに貢献できることが期待され、学位論文として十分な価値を有するものと判断した。