

氏 名(本 籍)	いし わた けん いち 石 渡 健 一 (神奈川県)
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	博 乙 第 644 号
学位授与年月日	平成 3 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	トリプトファン合成酵素による L- アミノ酸類の生産
主 査	筑波大学教授 農学博士 高 橋 稔 二
副 査	筑波大学教授 農学博士 中 原 忠 篤
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学助教授 農学博士 星 野 貴 行

### 論 文 の 要 旨

トリプトファン合成酵素（以下、TS と記す）は、いわゆる多機能酵素であり、L- セリンとインドールからの L- トリプトファン合成など種々の反応を解媒することが知られているが、工業的には、ほとんど利用されていなかった。

本研究は、TS を用いる L- アミノ酸類の新しい工業的製造法を確立することを目的とし、① TS とアミノ酸ラセマーゼの組合せによる L- トリプトファンの製造、② TS の多機能性を利用した L- システイン類の生産、③ 好熱性細菌の TS 遺伝子のクローニングとその遺伝子を利用した耐熱性 TS の *E. coli* での生産について検討したものである。

先ず、化学合成により安価に製造可能な DL- セリンとインドールを基質とし、TS とセリンラセミ化酵素による反応を組合せた L- トリプトファンの新しい製造法について検討した。セリンラセミ化酵素として、*Pseudomonas putida* の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼが使用できることを見出した。両酵素の性質を調べ、TS による L- セリンとインドールからの L- トリプトファン合成反応と低基質特異性アミノ酸ラセマーゼによる D- セリンとラセミ化反応は、一つの反応槽内で同時に進行させることができることを明らかにした。両酵素の酵素源として、*E. coli* と *P. putida* の休止菌体を用いた場合の副反応について検討し、好ましくないセリン分解酵素活性が、反応液へのアンモニウム塩の添加により抑制できることを見出した。最適反応条件下、インドールを間欠的に添加した反応を行い、24時間で、110g/l の L- トリプトファンが対 DL- セリン収率91%、対インドール収率100%という高濃度、高収率で生成することを実証した。更に、*E. coli* と *P. putida* の菌体をそれぞれアルギン酸により固定化し、L- トリプトファンの連続生産を検討した。固定化 *E. coli* 菌体の TS 活性安定化のための前処理として、エチレンジアミン四酢酸存在下での熱処理が有効であることを見出した。CSTR

(完全混合型連続反応器)により、L-トリプトファンが20日間、対インドール収率80-99%で生産できることを実証した。連続反応におけるL-トリプトファンの生産性を更に向上するには、TSの安定性向上が必要であることを明らかにした。

次いで、TSの多機能性の新しい応用として、TSのL-システイン類合成への利用について検討した。TSによる $\beta$ -置換反応により、 $\beta$ -置換-L-アラニン(L-セリン、O-メチル-L-セリン、 $\beta$ -クロロ-L-アラニンなど)とスルフィド(水硫化ナトリウム、水硫化物アンモニウムなど)からL-システインが高収率で合成できることを見出した。L-セリンと水硫化ナトリウムが最も良い基質の組合せであり、この場合のL-システインの合成反応速度は、L-セリンとインドールからのL-トリプトファン合成速度の約1/2であることを明らかにした。酵素源として*E. coli*休止菌体を用いた場合の最適反応条件を確立し、対セリン収率94%で114g/lのL-システインが8時間で合成できることを実証した。次いで、非天然のアミノ酸の一つで、去痰剤として有用なS-(カルボキシルメチル)-L-システイン(以下L-CMCと記す)のTSによる合成について検討した。TSによるL-セリンとチオグリコール酸からのL-CMC合成反応の収率は、著しく低いが、チオグリコール酸の代りに、チオグリコール酸のアルキルエステルを用いると、L-CMCのアルキルエステルが高収率で生成し、このL-CMCアルキルエステルを化学的に加水分解するとL-CMCが高収率で得られることを見出した。酵素反応および化学的加水分解反応について、最適反応条件を確立し、酵素源として*E. coli*休止菌体を用いた16時間の酵素反応と引続いて、同じ反応槽内での2時間のアルカリ加水分解反応により、159g/lのL-CMCが、対セリン収率94%で得られることを明らかにした。

更に、TSの安定性向上を目的とし、好熱菌のTS遺伝子のクローニングとその遺伝子の耐熱性TS生産への応用について検討した。中等度好熱菌に属する*Bacillus stearothermophilus*のTSをコードする遺伝子(*trpBA*)をショットガン法により*E. coli*へクローニングすることに成功した。得られた遺伝子の中で、TSをコードする部分の全塩基配列を決定した。*trpB*遺伝子は、1215bp、*trpA*遺伝子は、807bpの大きさであり、両遺伝子は、20bpを共有することを明らかにした。この遺伝子は、好熱菌の遺伝子に共通な、コドンの第3文字のGCの割合が非常に高いという特徴を有していた。*trpBA*の塩基配列から予想されるTSの $\beta$ -サブユニットと $\alpha$ -サブユニットのアミノ酸配列を*E. coli*、*B. subtilis*など他の細菌のものと比較し、 $\beta$ -サブユニットの相同性は高いが、 $\alpha$ -サブユニット相同性は低いことを明らかにした。*B. stearothermophilus*由来の*trpBA*遺伝子を*E. coli*用の高発現ベクターに挿入し、*E. coli*内で*B. stearothermophilus*のTSを著量生産することに成功した。生産されたTSを精製し、その性質を*E. coli*のTSと比較した。*B. stearothermophilus*のTS構造は、*E. coli*と同様、 $\alpha_2\beta_2$ のサブユニット構造であり、両酵素は各サブユニットの分子量もほぼ同じであった。しかし、*B. stearothermophilus*のTSは*E. coli*の酵素に比べ、熱安定性に優れていた。特に、両酵素の $\alpha$ サブユニットの熱安定性に著しい差があることを見出した。更に、*B. stearothermophilus*のTSは、低pH、界面活性剤や有機溶剤に対する安定性にも優れており、工業的見地からも非常に有用であることを明らかにした。

以上に述べたように、本研究は、TSと低基質特異性アミノ酸ラセマーゼの組合せによるL-トリブ

トファンの製造，TSのL-システイン類合成への利用，好熱性細菌のTS遺伝子のクローニングと塩基配列決定，およびその遺伝子の*E. coli*内での発現とその酵素の性質について詳細な検討を行ったものである。本研究で得られた知見は，TSを用いたアミノ酸類の工業的製造法の開発に大いに役立つばかりでなく，酵素法による各種の物質生産における類似の問題点解決の手がかりを提供するものと考えられる。尚，本研究で得られた知見を基に，L-トリプトファンの酵素法による生産が三井東圧化学㈱において企業化されている。

## 審 査 の 要 旨

本論文はトリプトファン合成酵素（TS）の多機能性を利用してL-セリンとインドールからのL-トリプトファンの合成のみならず，L-セリンと水硫化ナトリウムからのL-システインの合成，チオグリコール酸のアルキルエステルとL-セリンからのS-（カルボキシルメチル）-L-システインの合成などを行い，それぞれの収率及び反応速度を工業化可能なレベルに高めることに成功すると共に，TSの安定性向上のために好熱菌のTS遺伝子のクローニングとその応用についても検討を行ったもので，実用的にも学術的にも高く評価される。

よって，著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。