氏　　名	**西 村　篤 寿**
学位(専攻分野)	博　　士（学術）
学 位 記 番 号	博 甲 第 ２ ６ ２ 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第３条第３項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	新規ピログルタミン酸開環酵素に関する研究 Studies on novel type 5-oxoprolinases (without ATP hydrolyzing activity)
審　査　委　員	(主査) 教　授　小田　耕平 教　授　宗川　吉汪　　教　授　伊倉　宏司

論文内容の要旨

味噌・醤油の醸造において生成する呈味性アミノ酸、グルタミン酸は、これら醸造食品の旨味の主成分であり、製品の品質に深く関与している。しかし、このグルタミン酸は熟成過程で非酵素的に環化し、無味のピログルタミン酸に転換する。これは旨み成分の低下につながり、醸造業界では、この解決策が大きな課題とされている。また、味噌・醤油醸造の工程管理にL-グルタミン酸とL-ピログルタミン酸を同時に測定することが望まれているが、L-ピログルタミン酸の簡便な測定方法がないため、現状ではL-グルタミン酸のみを測定している。これらの解決策としては、ピログルタミン酸開環酵素の使用が考えられるが、既知のピログルタミン酸開環酵素はいずれも反応にATPを必要とする欠点を有し、実用化は困難であった。

このような背景のもと、申請者は、味噌・醤油の醸造に応用することを目的に、ATP非依存性ピログルタミン酸開環酵素を微生物に求めてスクリーニングを行ない、目的に叶う2株を分取することに成功した。そして、これらの分離株の生産するATP非依存性ピログルタミン酸開環酵素をタンパク質レベル及び遺伝子レベルで解析すると共に、これらの酵素の応用開発を行った。

本論文は緒論と4つの章より構成されている。

緒論では、研究の背景と位置付け、及び意義について述べた。

第1章では、目的とする酵素生産菌の検索を行い、*Alcaligenes faecalis* N-38Aと*Streptomyces* sp. N-6Aとして分類された2菌株を得ることに成功した。

第2章では、N-38A株の菌体内に生産されたN-38A酵素と、N-6A株の菌体外に生産されたN-6A酵素をそれぞれ電気泳動的に単一に精製した。N-38A酵素とN-6A酵素の反応最適pHは7.0～7.5、分子量は、それぞれ47,000と38,000であり、阻害剤に対する挙動より金属酵素の可能性が示された。両酵素は、ATP非依存的にL-ピログルタミン酸をL-グルタミン酸に変換すると共に、L-グルタミン酸からL-ピログルタミン酸を生成する逆反応も触媒し、その反応平衡はL-ピログルタミン酸生成に傾いていること等が明らかにされた。

第3章では、N-38A酵素遺伝子とN-6A酵素遺伝子を大腸菌にクローニングし、塩基配列を明らかにした。N-38A酵素とN-6A酵素の一次構造は、既報のタンパク質とは全く類似性がないが、こ

れら両酵素間では26%の同一性が認められ、亜鉛結合サイトとして知られる「HXH」モチーフの存在を示した。また、組換え型N-38A酵素を分析し、1分子あたり1グラム原子の亜鉛を有する亜鉛酵素であることを明らかにした。

第4章では、N-38A酵素の応用について検討を加え、１）L-グルタミン酸からピログルタミン酸の製造方法、２）D,L-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の単離法、3）醤油など高グルタミン酸含有試料中のL-アスパラギン酸の定量法や、4)醤油・味噌の醸造工程管理上重要なL-グルタミン酸とL-ピログルタミン酸の同時定量法、等を開発した。

以上、本研究は全く新規な２つの酵素の発見から、それら酵素の解析、及び応用について検討したものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、申請者の職場である醤油・味噌の醸造業界で深刻な問題の一つ、旨味成分グルタミン酸の無味なピログルタミン酸への非酵素的変換について新しい切り口で展開を図ったものである。即ち、既知のピログルタミン酸開環酵素の反応がATPのエネルギーを必要とする最大の欠点に着目し、この問題解決に、ATP非依存性の新規ピログルタミン酸開環酵素の利用を企画した。目的に叶う酵素生産菌として、*Alcaligenes faecalis* N-38Aと*Streptomyces* sp. N-6Aと分類された２菌株の分離に成功した。それぞれの酵素について、タンパク質、及び、遺伝子レベルで解析し、両酵素がATP非依存的にピログルタミン酸を開環してグルタミン酸を生成する新規な金属酵素であることなどを明らかにした。さらに、これらの酵素の応用についても検討を加え、１）L-グルタミン酸からL-ピログルタミン酸の製造方法、２）D,L-グルタミン酸からのD-グルタミン酸の単離法、3）醤油など高グルタミン酸含有試料中のL-アスパラギン酸の定量法や、４）醤油・味噌の醸造業界で工程管理上重要なL-グルタミン酸とL-ピログルタミン酸の同時定量法、などを開発した。

以上、本研究は、全く新規な酵素の発見から、それら酵素の応用開発までも行ったものであり、学術的な貢献はもとより、発酵工業、特に、醤油・味噌などの醸造業界に貢献すること大である。

なお、申請者は査読制度のある学会誌に次の3編の論文を発表した。

本学位論文作成の基礎となった学術論文

1. Atsuhisa Nishimura, Yasunori Ozaki, Hiroshi Oyama, Takashi Shin, and Sawao Murao
Purification and Characterization of a Novel 5-Oxoprolinase (without ATP-Hydrolyzing Activity) from *Alcaligenes faecalis* N-38A
Applied and Environmental Microbiology, **65** (2), 712-717 (1999).

2. Atsuhisa Nishimura, Hiroshi Oyama, Takatoshi Hamada, Katsunori Nobuoka, Takashi Shin, Sawao Murao, and Kohei Oda
Molecular Cloning, Sequencing, and Expression in *Eschericia coli* of the Gene Encoding a Novel 5-Oxoprolinase without ATP-Hydrolyzing Activity from *Alcaligenes*

faecalis N-38A
Applied and Environmental Microbiology, 66 (8), 3201-3205 (2000).

3. Atsuhisa Nishimura, Homare Itoh, Hiroshi Oyama, Sawao Murao, and Kohei Oda
A Simultaneous Assay Method for L-Glutamate and L-Pyroglutamate Contents in Soy Sauce Using a 5-Oxoprolinase (without ATP-Hydrolyzing Activity)
Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 65 (2), 477-479 (2001).