

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	草 野 正 雪
論文題目	Studies on Expression of Recombinant Thermolysin and Engineering of Its Function by Site-directed Mutagenesis (組換えサーモライシンの発現と部位特異的変異による機能改変に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>サーモライシン (TLN) は中等度好熱菌 <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> が菌体外に生産する好熱性・好塩性の中性亜鉛プロテイナーゼである。本酵素の分子量は34,600であり、1分子あたり活性に必須の亜鉛イオン1個と安定性に必要なカルシウムイオン4個を含有する。本酵素は、加水分解反応の逆反応を利用して人工甘味剤アスパルテームの前駆体である <i>N</i>-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (ZDFM) をはじめとするペプチドの合成に広く応用されてきた。TLNの産業への応用において、活性や安定性の向上および活性のpH依存性の改変は重要な課題である。本研究は、このような背景に基づいて、遺伝子組換え型TLNの新規発現法を開発し、部位特異的変異によりTLNの機能を改変することを目的としたものである。その主な内容は以下の通りである。</p> <p>1. 大腸菌でのプロ配列と成熟型配列の共発現による組換えTLNの菌体外生産法の開発： TLNのシグナル配列をN末端に付加したTLNプロ配列とpectate lyase Bのシグナル配列をN末端に付加したTLN成熟型配列を <i>B. thermoproteolyticus</i> の <i>npr</i> 遺伝子 (TLNをコードする遺伝子) のプロモーターの支配下に別々のポリペプチドとして共発現させる方法 (新規法) を開発した。新規法で生産した野生型酵素 (WT) は、TLNのシグナル配列、プロ配列、成熟型配列を1本のポリペプチドとして発現させる方法 (従来法) で生産したWTと、同じ <i>N</i>-[3-(2-furyl)acryloyl]-glycyl-L-leucine amide (FAGLA) 加水分解活性とZDFM加水分解活性を示した。さらに、従来法では、活性を消失した変異型酵素E143A (活性に必須のGlu143がAlaに置換) は生産できなかったが、新規法では生産できた。このことから、新規法では、プロ配列と成熟型配列を連結するペプチド結合に対する自己触媒的切断活性を消失した変異型酵素も生産できることが示された。新規法は、機能改変を受けた変異型TLNの大量調製法として有用であると考えられる。</p> <p>2. TLN活性部位を構成するポリペプチド領域の機能解析および機能が向上した変異型酵素の作製： TLNの活性部位を構成するポリペプチド領域 [N-terminal sheet (Asn112-Trp115)、C-terminal loop 1 (Asp150-Gly162)、α-helix 2 (Ala163-Val176)、C-terminal loop 2 (Gln225-Ser234)] に位置する12アミノ酸残基 (Ala113、Phe114、Trp115、Asp150、Tyr157、Gly162、Ile168、Ser169、Asp170、Asn227、Val230、Ser234) のうちの1残基が荷電性アミノ酸 (Asp、Glu、His、Lys、Arg) あるいはAlaにそれぞれ置換された変異型酵素 (69種) を作製し、その活性と安定性を評価した。その結果、N-terminal sheet とα-helix 2に位置する</p>			

アミノ酸残基を置換した変異型酵素のうち85% (34種のうち29種) がFAGLA分解活性とカゼイン分解活性をともに消失した。このことから、これらの領域が触媒活性に重要であることが示された。一方、C-terminal loop 1とC-terminal loop 2に位置するアミノ酸残基を置換した変異型酵素のうち43% (35種のうち15種) がFAGLA分解活性を消失し、カゼイン分解活性を保持した。このことから、これらの領域が基質認識に重要であることが示された。さらに、D150EとI168AはWTよりも高いFAGLA分解活性とZDFM分解活性を示した。一方、D150H、I168H、N227A、N227H、S234AはWTより高い熱安定性を示した。

3. TLN機能に対する変異組合せの効果： TLNの活性を向上させる変異 [Leu144→Ser (A1と略称)、Asp150→Glu (A2)、Ile168→Ala (A3)]を組合せて活性に対する効果を調べたところ、A1とA2の組合せが最も効果的であった。一方、A1とA3の組合せでは活性が消失した。TLNの熱安定性を向上させる変異 [Ser53→Asp (S1)、Leu155→Ala (S2)、Gly8→Cys/Asn60→Cys/Ser65→Pro (S3)] を組合せて熱安定性に対する効果を調べたところ、S1とS2の組合せが最も効果的であった。また、A1、A2、S1の組合せでは活性と熱安定性がともに向上した。これらの知見に基づいて、活性と安定性がともに向上した変異型酵素 (L144S/D150E/S53D) を取得した。

4. TLN活性のpH依存性に対する部位特異的変異の効果： TLNの活性部位にあるAsn112を各種荷電性アミノ酸あるいはAlaに置換した変異型酵素のうち、N112DとN112Eは活性を保持していたが、N112A、N112H、N112K、N112Rは活性を消失していた。FAGLA加水分解において、WT、N112D、N112Eの活性 (k_{cat}/K_m) はいずれも至適pH 7のベル型のpH依存性を示したが、N112Dの酸性側活性解離基の pK_a (pK_{e1}) は5.7であり、WTの pK_{e1} よりも0.4単位高かった。一方、N112Dのアルカリ性側の pK_a (pK_{e2}) とN112Eの pK_{e1} と pK_{e2} はいずれもWTと同じであった。N112Dの pK_{e1} の上昇は、導入された負電荷が酸性側活性解離基のプロトン化を安定化し、プロトン解離が抑制されたためと推定された。この知見から、酵素活性のpH依存性を人為的に改変するための有用な手法が示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

サーモライシン (TLN) は好熱性・好塩性の中性亜鉛プロテイナーゼであり、ペプチド合成などに広く応用されている。従って、TLNの活性や安定性の向上および活性のpH依存性の改良は、本酵素の産業利用において重要な課題である。本研究は、遺伝子組換え型TLNの新規発現法を開発するとともに、部位特異的変異によりTLNの機能を改変したものであり、成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 組換えTLNの発現法を検討し、TLNのプロ配列と成熟型配列とを別々のポリペプチドとして共発現させる新規発現法を開発した。基質特異性が改変され自己触媒的活性化能を消失した変異型酵素は、従来の発現法では生産できなかったが、新規発現法では生産できた。本発現法が機能改変されたTLNの調製法として有用であることを示した。

2. TLN活性部位に位置する12アミノ酸残基を各種荷電性アミノ酸 (Asp、Glu、His、Lys、Arg) あるいはAlaに置換した69種の変異型酵素を作製した。TLNの活性や安定性に対するこれらの残基の機能を解析し、野生型酵素 (WT) よりも高い活性を有する変異型酵素2種と、高い安定性を有する変異型酵素5種を取得した。

3. TLNの活性と安定性に対する変異組合せの効果を検討し、Leu144→SerとAsp150→Gluの組合せでは活性が、また、Ser53→AspとLeu155→Alaの組合せでは安定性が最も向上することを見出した。さらに、Leu144→Ser、Asp150→Glu、Ser53→Aspの3変異の組合せにより、活性と安定性がともに向上した変異型酵素 (L144S/D150E/S53D) を取得した。

4. TLN活性部位に位置するAsn112をAspに置換することにより、酵素の作用pH域がWTに比べて大きく改変された変異型酵素N112Dを取得した。酵素活性のpH依存性を人為的に改変するための酵素化学的手法を提案した。

以上のように、本論文は、遺伝子組換え型サーモライシンの新規発現法を開発したことに加え、本発現法を用いて活性や安定性および活性のpH依存性が改良された変異型サーモライシンを創製したものであり、酵素化学、食品工学、食品分子機能学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成22年1月21日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降