

氏名	まつ 松 見 理 恵
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論工博第 3989 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Studies on membrane-bound peptidases and a sugar transporter in the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus kodakaraensis</i> (超好熱始原菌サーモコッカス コダカラエンシスの膜結合型ペプチダーゼ及び糖トランスポーターに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 今中忠行 教授 青山安宏 教授 森 泰生

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、鹿児島県小宝島から単離された超好熱始原菌、*Thermococcus kodakaraensis* KOD 1 株を題材として、これまで報告例のなかった始原菌におけるシグナルペプチドの分解に関わる酵素の同定と酵素学的解析、触媒中心残基の同定を行い(第1部)、さらに超好熱菌における薬剤耐性に基づく遺伝子破壊系の構築およびそれを利用した糖トランスポーターに対する遺伝学的解析を行い(第2部)、その成果についてまとめたものである。本論文は序論、第1部1-4章、第2部5章、結論から構成されている。

序論では超好熱始原菌の進化的な位置づけとそれに関連するリバースジャイレースの研究、本研究の題材である *T. kodakaraensis* KOD 1 株の諸性質、細菌や真核生物における分泌タンパク質のシグナルペプチドの構造とその切断・分解に関与する酵素、始原菌におけるタンパク質分泌機構、プロテアーゼの触媒機構、超好熱菌における遺伝子破壊技術等に関して、研究の現状などがまとめられている。

第1章では大腸菌のSPPのアミノ酸配列と低いながらも相同性を持つ *T. kodakaraensis* の膜結合型ペプチダーゼ(SppA)の生化学的解析を行った。その結果、SppAのP-2サイトは基質特異性が広く、P-1サイトは側鎖の比較的短いアミノ酸、P-3サイトは疎水性あるいは芳香族アミノ酸をよく認識することが判明した。また酸性アミノ酸残基を含むペプチドを切断しないことも明らかとなった。これらのことからSppAはシグナルペプチドの中央部の疎水領域の切断に寄与すると考えられた。さらに、本酵素が非常に高い耐熱性、耐アルカリ性を示すことを明らかにし、SppAは工業的にも応用可能なペプチダーゼであることを見出した。

第2章ではSppAの活性に重要なアミノ酸残基の同定を行った。SppAと相同性のある細菌及び始原菌由来タンパク質のアミノ酸配列を比較し、ペプチダーゼ活性に関与すると考えられる保存性の高いアミノ酸16種類についてアラニンに置換した変異体酵素を作製し、機能を評価した。その結果、SppAは典型的なセリンプロテアーゼにみられるSer-His-Asp catalytic triadを利用せず、Ser162及びLys214からなるcatalytic dyadを利用していることが判明した。これは原核生物由来SPPの反応機構を解明した初めての例である。

第3章ではシグナルペプチドの分解に関与するさらなる酵素の検索を行い、*T. kodakaraensis* ゲノム上にSppAと類似した構造を示す第二の遺伝子を同定した。その翻訳産物(SppB)の基質特異性はSppAと異なり、シグナルペプチドのN末端領域を認識可能であることを明らかにした。このことから *T. kodakaraensis* ではSppAとSppBが協同してシグナルペプチドの分解に関与することが示唆された。

第4章ではSppBについて活性に重要なアミノ酸残基の同定を行った。SppBと相同性のある細菌及び始原菌由来タンパク質のアミノ酸配列を比較し、活性に重要であると考えられる保存性の高いアミノ酸19種類を選定した。これらについて部位特異的変異を導入し、活性への影響を調べた結果、このペプチダーゼの活性にはSer130、His226及びAsp154が重要であることを明らかにした。したがって、SppAとSppBは異なる活性中心構造を有することが判った。

第2部第5章では超好熱菌における薬剤耐性に基づいた遺伝子破壊系を構築した。抗生物質とその耐性遺伝子に基づいた遺伝子操作は様々な生物で広く利用されているが、これらの抗生物質や抗生物質耐性遺伝子産物は一般に耐熱性に欠けているため超好熱菌には用いることが出来ない。そこで超好熱菌の生育に必須な内在性酵素の阻害剤とその酵素の大量発現カセットを利用することを考えた。HMG-CoA reductaseに注目し、その阻害剤であるsimvastatinと本酵素の大量発現カセットを用いることにより、抗生物質耐性を指標とした遺伝子破壊系を超好熱菌で初めて開発した。この破壊系は栄養培地で利用可能であり、また宿主の開発も不要であるため、他の超好熱始原菌においても直ちに応用できる有用な系である。また、本系を用いて *T. kodakaraensis* の糖トランスポーターと予想される遺伝子群を破壊し、この遺伝子群は本菌において糖の取込みに関与する唯一のトランスポーターをコードしていることを示した。

結論では本論文で得られた成果について要約している。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD 1 株のシグナルペプチド分解に関与する2種のペプチダーゼに対する生化学的研究および本菌を宿主とした薬剤耐性に基づく遺伝子破壊系の構築についての成果をまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

(1) 始原菌におけるシグナルペプチドペプチダーゼはいままで同定されていなかったが、*T. kodakaraensis* のTK1164 翻訳産物 (SppA) およびTK0130 翻訳産物 (SppB) を解析することにより、双方がペプチダーゼ活性を示すことが分かった。さらにそれぞれの基質特異性を解析することにより、TK1164 がシグナルペプチドの中央疎水領域を、TK0130 がシグナルペプチドのN末端塩基性領域を切断し得ることを明らかにした。したがってSppA と SppB は共同してシグナルペプチドの分解に寄与することが示唆され、始原菌におけるシグナルペプチドペプチダーゼを同定した。

(2) SppA と SppB の活性中心残基を同定し、SppA がSer/Lys catalytic dyad を、SppB がSer/His/Asp catalytic triad を利用してペプチダーゼ活性を示すことを明らかにした。

(3) 超好熱菌において初めての薬剤耐性に基づく遺伝子破壊系を構築し、*T. kodakaraensis* の糖トランスポーターに対する遺伝学的解析を行った。

以上、本論文はこれまで報告がなかった始原菌のシグナルペプチド分解に関わる酵素を同定し、またそれらの触媒機構をも解明した。この成果は始原菌におけるタンパク質の分泌のみならず、セリンプロテアーゼの構造機能相関に対しても多くの新しい知見を与えるものであり、学術上、実際上寄与するところが多い。またこれまでに開発されていなかった超好熱菌を宿主とした汎用性の高い遺伝子破壊系を構築しており、超好熱菌遺伝学に対しての貢献も大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成20年1月30日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。