

氏 名	はし だ やす ひこ 橋 田 泰 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1660 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 学 専 攻
学位論文題目	Kinetic and Thermodynamic Studies on Regulatory Mechanism of the Activity and Stability of Thermolysin by Divalent Cations, Sugars, and Phosphoramidon (二価カチオン, 糖類およびホスホラミドンによるサーモライシンの活性と安定性の調節機構に関する速度論的および熱力学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 加 納 健 司 教 授 安 達 修 二

論 文 内 容 の 要 旨

サーモライシン (TLN) は *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の中性金属プロテイナーゼであり, 触媒活性に必須の Zn^{2+} イオン 1 個と構造安定化に寄与する Ca^{2+} イオン 4 個を含む耐熱性酵素である。また, 高濃度 (1 ~ 5 M) の中性塩の添加によりその活性が大幅に上昇する好塩性酵素としても知られている。本酵素は人工甘味剤アスパルテームなど各種生理活性ペプチドの合成や食品タンパク質の加工に広く利用されている。このため, 本酵素の触媒活性や安定性の向上は, 基礎研究のみならず応用面においても重要な課題である。本研究は, このような背景に基づいて, 二価金属イオン, 各種糖類および遷移状態アナログ阻害剤ホスホラミドンの添加により, TLN の触媒活性や安定性の改善を図るとともに, それを実現するための分子制御機構について, 酵素反応速度論および熱力学的解析により解明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。

1. 低濃度コバルトイオンによる TLN の活性化機構の速度論的解析: TLN のペプチド加水分解活性に対する Co^{2+} の添加効果を検討したところ, 2 mM 以下の低濃度 Co^{2+} の添加において, 5 ~ 6 倍の活性増大が認められた。この活性増大は Co^{2+} 濃度の増大に対して飽和曲線を示した。本反応の解析から, TLN と Co^{2+} の 1 : 1 (mol/mol) 結合により活性化がもたらされるものと考えられた。一方, この活性化は 1 μ M 以下の Zn^{2+} によって抑制され, その作用様式は拮抗的であった。このことから, 添加された Zn^{2+} と Co^{2+} は TLN 分子表面の同一部位に結合して活性を調節することが示唆された。TLN の活性部位から放出される Zn^{2+} を定量したところ, Zn^{2+} 放出量は Co^{2+} 濃度の増大に伴って増加し, その量は Co^{2+} によって活性化された TLN 量とよく一致した。このことから, Co^{2+} による TLN の活性化は, 触媒性 Zn^{2+} の Co^{2+} への置換に伴う Co^{2+} 型 TLN の形成により引き起こされることが示された。 Co^{2+} の配位構造は酵素反応の遷移状態の配位構造に近似していることから, Co^{2+} 型 TLN は Zn^{2+} 型 TLN に比べて高活性を与えると推定した。

2. 高濃度コバルトイオンによる TLN の失活機構の速度論的解析: TLN のペプチド加水分解活性は 2 mM 以上の高濃度の Co^{2+} の添加によって減少することが認められた。この失活は, Ca^{2+} イオンによって抑制される Ca^{2+} 依存的失活と, 抑制されない Ca^{2+} 非依存的失活の 2 種類に分離できることが示された。 Ca^{2+} 非依存的失活は拮抗阻害 (Co^{2+} の阻害物定数: $K_i = 22$ mM) であることが示され, Co^{2+} が基質結合部位へ結合することにより引き起こされることが示唆された。一方, Ca^{2+} 依存的失活は自己消化によって起こることが確認された。これは, Co^{2+} が TLN へ結合することにより, TLN の構造安定化に必要な Ca^{2+} が置換され, 構造の不安定化がもたらされることに起因するものと考えられた。

3. 糖類による TLN の安定化の熱力学的解析: TLN を 60 ~ 75°C で処理すると, その活性は一次反応に従って失活した。この熱失活反応の解析から, TLN の熱失活の活性化エネルギーは 120 kJ/mol と求められた。また, 30 分間の熱処理によって活性が 50% に低下する温度 (失活温度 T_{50}) は 68°C と算出された。一方, TLN にトレハロースを添加したところ, T_{50} は大

大きく増大し、1 Mトレハロース添加では8℃、2 Mでは95℃以上と算出され、顕著な熱安定化効果が確認された。同様に、1 Mマルトース、1 Mスクロース、2 Mグルコース、(1 Mグルコース+1 Mフルクトース)混合物、30% (v/v) グリセロールを添加してTLNの熱失活を測定したところ、全ての場合において、 T_{50} は20℃以上も上昇した。このことから、各種の糖類によってTLNの熱安定性を向上させることが可能であることが示された。

4. ホスホラミドンによるTLNの阻害機構の速度論的解析： TLN、基質および遷移状態アナログ阻害剤ホスホラミドンを同時に含む反応系で得られる酵素反応曲線を解析することにより、酵素とホスホラミドンとの結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} を決定する方法を提案した。こうして決定した速度定数のpH依存性を検討したところ、 k_{on} が酸性領域で大きく増大することが認められた。このことと構造情報とを照らし合わせることで、TLNと本阻害剤の結合には、活性部位にあるGlu143のプロトン化が必須であることが示唆された。また、阻害に対するNaClの効果について検討したところ、NaClの添加により、 K_i が低下すること、すなわち、遷移状態が安定化することが示された。このことは、NaClによるTLN活性化が分子活性 k_{cat} の増大に起因することと良い一致を示している。これらの知見をもとに、酵素の高活性化と遷移状態安定化に関する分子機構を提案した。

論文審査の結果の要旨

サーモライシン (TLN) は、好塩性・好熱性の中性金属プロテイナーゼであり、触媒活性に必須の Zn^{2+} イオン1個と構造安定性に寄与する Ca^{2+} イオン4個を含む。TLNは、生理活性ペプチドの合成や食品タンパク質の加工に広く利用されており、活性増強や安定性向上が望まれてきた。本研究は、二価金属イオン、各種糖類および遷移状態アナログ阻害剤ホスホラミドンを用いて、TLNの触媒活性の制御や安定性の改善を図るとともに、それを実現するための分子制御機構を酵素反応速度論および熱力学の両面から解析したものであり、成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. TLN活性に対する Co^{2+} の添加効果について検討し、2 mM以下の Co^{2+} によりTLN活性が増大することを見出した。その活性化は触媒性 Zn^{2+} の Co^{2+} への置換に伴う Co^{2+} 型TLNの形成に起因することを明らかにした。天然型の Zn^{2+} 型TLNに Co^{2+} を、また、 Co^{2+} 型TLNに Zn^{2+} を添加することにより相互に触媒性金属を置換することができ、活性制御が可能であることを示した。 Co^{2+} 型TLNが天然型TLNより高活性であることの原因として、 Co^{2+} の配位構造が酵素反応の遷移状態に近似していることを提案した。

2. TLNに2 mM以上の Co^{2+} を添加すると、TLNが失活することを見出した。この失活は、 Ca^{2+} により抑制される Ca^{2+} 依存性失活と、抑制されない Ca^{2+} 非依存的失活に分離されること、また、それぞれの失活機構は自己消化の促進と拮抗阻害に基づくことを明らかにした。さらに、添加 Co^{2+} と触媒性 Zn^{2+} との置換が酵素活性のみならず安定性や自己消化性にも影響を及ぼすことを示し、 Co^{2+} 添加によるTLNの活性制御において適正な Co^{2+} 濃度を選択する必要があることを提案した。

3. TLNの熱安定性に対する各種糖類の添加効果を熱力学的に解析した。トレハロースはTLNの熱安定性を顕著に向上させ、2 Mトレハロース存在下では、失活温度 (T_{50}) が68℃から95℃以上にまで上昇することを見出した。他の糖類でも同様の安定化効果を確認した。近年、高温条件下や有機溶媒中でのTLN反応が試みられている。本知見は、このような環境下でのTLNの利用に有効な指針を与えるものである。

4. TLN、基質および遷移状態アナログ阻害剤の共存下の酵素反応解析から、TLNと阻害剤の結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} を決定する方法を提案した。本方法により、TLN反応にはGlu143のプロトン化が必須であること、また、NaClは遷移状態を安定化することによりTLNを活性化することを示した。遷移状態アナログを用いる酵素反応解析が、遷移状態に関する化学的知見を得るのに重要な手段となり得ることを示した。

以上のように本論文は、サーモライシンの活性と安定性の制御に関して反応速度論的および熱力学的手法を駆使して多くの重要な知見を得たことに加え、その分子制御機構にまで洞察を加えたものであり、酵素化学、生物物理化学、生物化学工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19年9月14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。