

氏 名	しば た ひろ ゆき 柴 田 洋 之
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 954 号
学位授与の日付	平 成 10 年 1 月 23 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 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Molecular Mechanism of Lipase Activator Protein from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (シュードモナス属由来のリパーゼ活性化タンパク質の分子機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 田 順 一 教 授 清 水 昌 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

シュードモナス・エルギノーサ TE3285 株由来のリパーゼは、同遺伝子の下流にコードされているリパーゼ活性化タンパク質 (LipB) の働きによって、活性型の立体構造に折りたたまれる。本論文は、LipB をタンパク質工学的に改変することにより、分子レベルでその特性を明らかにするとともに、その機能性部位を探ることを目的とした研究の成果をまとめたものである。

第1章では、LipB に関してこれまで明らかにされている性質、細胞内における挙動および他のタンパク質折りたたみ因子との比較について論じることにより、本論文における研究の目的および意義について述べている。

第2章では、LipB の精製標品を調製し、その基本的な性質を明らかにしている。まず、大腸菌の宿主ベクター系を用いて調製した LipB を、界面活性剤の存在する条件で単一に精製した。得られた精製 LipB は、変性により失活したリパーゼの活性を経時的に回復するものの、無細胞系ではこの活性化反応がターンオーバーしないことを見出した。これは、活性を回復したリパーゼが LipB から解離しないために起こる現象であることを、分子間架橋実験から示した。また、この活性化反応について二つの特性を明らかにしている。第一に、LipB は本来の標的タンパク質である同起源由来のリパーゼのみを活性化する。第二に、LipB によるリパーゼの活性化はカルシウムイオンによって顕著に促進され、この活性化複合体は、過剰の EDTA を添加すると速やかに解離し、リパーゼ活性を失う。以上のことから、リパーゼのカルシウム結合部位の構造形成に対して、LipB は特異的に作用するという仮説を提示した。

第3章では、LipB のアミノ末端部分とその物性および活性に与える影響を調べている。ここでは、アミノ末端21残基からなる疎水性部分を欠損した LipB と、プロテアーゼによって除去されやすいアミノ末端61残基部分を欠損した LipB を、それぞれ遺伝子工学的に調製した。天然型 LipB が可溶性の凝集体を形成し、リパーゼを部分的にしか活性化しないのに対し、2種類の欠損型 LipB はいずれも溶液中で均一に分散し、リパーゼを定量的に活性化する能力を持つことを明らかにした。さらに、アミノ末端61残基部分が LipB の活性に関与していないことを示した。

第4章では、ランダム変異導入法によって活性を失った LipB の変異体を取得する系を確立し、変異体の配列解析から、LipB の機能性残基を同定している。まず、アミノ末端61残基欠損型 LipB をコードする遺伝子に対して、PCR 法によってランダム変異を導入し、リパーゼの発現プラスミドに挿入し直して変異ライブラリを調製した。このライブラリを導入した大腸菌を、リパーゼの基質を含む寒天培地上で培養し、活性リパーゼの分泌の有無を指標にして、LipB 活性を失ったクローンを選抜した。さらに、抗 LipB 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる解析から、野生型と同じ分子量を持つものを、アミノ酸残基が置換した変異体として選抜した。最終的に、1残基の置換によって活性を失った LipB の変異体を5種類 (D76G, Y99C, Y99H, S102R, R115C) 得ている。以上の変異体の精製標品を調製し、無細胞系での活性を測定した結果、D76G は野生型と比較して活性化反応の初速度が40分の1に低下し、Y99C, Y99H, S102R, R115C は活性をほとんど失っていた。また、架橋実験から、D76G 以外の4種の変異体は、リパーゼと複合体を形成しなかった。さらに、Y99C と

R115C は、変異によって導入されたシステイン残基によって分子間ジスルフィド結合を形成することから、Tyr99 と Arg115 は LipB の分子表面に存在することを示唆している。以上の結果から、LipB の Tyr99 と Arg115 がリパーゼと直接相互作用し、複合体形成のために重要な役割を果たす残基であることを示した。

第5章では、本研究において解明された点がまとめて述べられている。

論文審査の結果の要旨

細胞がその生命活動を営む上で、翻訳後におけるタンパク質の立体構造形成は重要な過程である。種々のタンパク質因子がその過程を助ける役割を担うことが知られており、シュードモナス・エルギノーサのリパーゼ活性化タンパク質 (LipB) もそのひとつである。LipB は細胞内膜を透過したリパーゼポリペプチドの折りたたみに寄与するが、そのメカニズムは分子レベルでは全く明らかにされていない。この LipB の作用機構の解明は、タンパク質の立体構造形成プロセスを理解する上で不可欠であるばかりでなく、有用タンパク質を効率的に生産するための指針を与えるものである。本論文は、リパーゼの折りたたみにおける LipB の基本的な特性およびその活性に重要な残基を明らかにした研究成果を取りまとめたものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. これまで困難とされていた天然型 LipB の精製を、界面活性剤を利用することにより初めて成功させ、LipB によるリパーゼ活性化反応を無細胞系で詳細に解析することを可能とした。この活性化反応の速度論的解析とタンパク質架橋実験を組み合わせることによって、リパーゼのカルシウム結合に LipB が重要な役割を果たすという新しい仮説を提示した。また、この活性化反応が極めて特異的に進行していることを実験的に立証した。

2. 膜結合部位であるアミノ末端部分を除去した LipB の変異体を 2 種類設計し、その物性および活性を天然型と比較した。その結果、アミノ末端 21 残基部分を除くことにより、LipB 分子の凝集を回避し、無細胞系で LipB がリパーゼを定量的に活性化しうることを明らかにした。同時に、アミノ末端 61 残基部分が、LipB の活性に関与していないことを新たに見出した。

3. これまで全く不分明であった LipB の機能性残基の幾つかを初めて同定した。すなわち、61 残基欠損型 LipB にランダム変異を導入し、得られたライブラリから二段階のスクリーニングを経て、活性を失った LipB の変異体を迅速に選抜することによって、その活性残基を明らかにした。そして、1 残基の置換によって不活性化した LipB の変異体を 5 種類調製することに成功し、Tyr99 および Arg115 が、リパーゼと複合体を形成する段階で重要な役割を果たしていることを示した。以上の一連の探索系は、タンパク質 - タンパク質相互作用をアミノ酸残基レベルで解析する方法論として、一般的に適用可能であり、特に重要な成果といえる。

以上の様に、本論文では LipB 分子の機能について議論することを可能にし、タンパク質の折りたたみ過程という捉えにくい現象を研究する上での新たな指針を示すだけでなく、タンパク質工学ならびに酵素化学の分野にも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 9 年 12 月 12 日、論文並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。