

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	MENACH EVANS PKEMOI
論文題目	Structure-function Relationship of the β -hairpin Loop in the N-terminal Domain and the Zinc-binding Motif of Thermolysin （サーモライシンのN末端領域の β ヘアピンループと亜鉛結合モチーフの構造活性相関）		
（論文内容の要旨） 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中性亜鉛プロテイナーゼである。本酵素は分子量 34,600 のタンパク質（316 アミノ酸残基）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。したがって、TLN の活性と熱安定性の向上は重要な課題である。また、本酵素は、中性塩により活性や安定性が向上することが知られている。TLN の N 末端領域では、2 つのポリペプチド鎖（Asn112-Ala113-Phe114-Trp115 と Ser118-Gln119-Met120-Val121-Tyr122）が β ヘアピンループ（Asn116-Gly117）により連結し、逆平行 β シートを形成している。Asn112-Trp115 鎖は活性部位に位置するが、Ser118-Tyr122 鎖と Asn116-Gly117 ループは活性部位の外に位置する。また、TLN の亜鉛結合モチーフ配列は H¹⁴²ELTH¹⁴⁶ であり、大部分の亜鉛プロテアーゼの亜鉛結合モチーフ配列である HEXXH に属する。本論文は、部位特異的変異により TLN の N 末端領域の β ヘアピンループと亜鉛結合モチーフの構造活性相関を解析した結果をまとめたものであり、以下の 4 章よりなっている。 第 1 章では、Gly117 の部位特異的変異による触媒活性への効果を解析した。5 種類の変異型酵素（G117A、G117D、G117E、G117K、G117R）について、成熟型領域とプロ領域を別々のポリペプチドとして大腸菌で発現させた。生産量は G117E＞G117K＝G117R＞G117D の順であり、G117A は生産されなかった。G117E の <i>N</i>-furylacryloyl-Gly-L-Leu amide（FAGLA）加水分解活性は野生型酵素（WT）よりも低く、ZDFM 加水分解活性は WT よりも高かった。G117K、G117R、G117D のこれらの活性は WT よりも低かった。以上の結果から、Gly117 が β ヘアピンループの構造に影響を与えることにより、触媒活性において重要な役割を担っていることが示唆された。 第 2 章では、Asn116 の部位特異的変異による触媒活性と安定性への効果を解析			

した。19 種類の Asn116 変異型酵素のうち、4 種類 (N116A、N116D、N116T、N116Q) は大腸菌で生産されたが、他の 15 種類は生産されなかった。FAGLA 分解活性と ZDFM 分解活性は、N116D>WT=N116Q>N116A=N116T の順であった。熱安定性は、WT>N116Q>N116A=N116D=N116T の順であった。以上の結果から、Asn116 が β ヘアピンループの構造に影響を与えることにより、触媒活性と安定性において重要な役割を担っていることが示唆された。

第 3 章では、活性を高めるように 2 種類の変異 (Asn116→Asp、Asp150→Glu) を導入した TLN の塩によるさらなる活性の向上と安定性の向上について解析した。FAGLA 加水分解反応において、D150E の 0.5–4.0 M NaCl 存在下での相対活性 (NaCl 存在下での特異性定数 (k_{cat}/K_m) の NaCl 非存在下での k_{cat}/K_m に対する相対値) は WT よりも、N116D/D150E のそれは N116D よりもそれぞれ低かった。70℃での熱失活において、D150E の 0.5–4.0 M NaCl 存在下での相対安定性 (NaCl 非存在下での一次の熱失活速度定数 (k_{obs}) の NaCl 存在下での k_{obs} に対する相対値) は WT よりも、N116D/D150E のそれは N116D よりもそれぞれ低かった。以上の結果から、Asp150→Glu は Asn116→Asp と異なり、NaCl による触媒活性の向上と安定性の向上の程度を低下させることが示された。さらに、TLN の特定の残基のイオンとの結合が NaCl による触媒活性の向上と安定性の向上に関与していることが示唆された。

第 4 章では、TLN の亜鉛結合モチーフ配列 HEXXH のジペプチジルペプチダーゼ III (DPP III) の亜鉛結合モチーフ配列 HEXXXH への変換が TLN の活性と安定性に与える効果を解析した。亜鉛結合モチーフ配列が H¹⁴²ELLGH¹⁴⁶ または H¹⁴²ELTGH¹⁴⁶ である変異型 TLN を、大腸菌を宿主として調製した。これらはカゼイン加水分解活性と FAGLA 加水分解活性を消失したが、TLN の基質アナログである Gly-D-Phe に対する結合活性は有していた。これらの変異型 TLN の CD の 222 nm の楕円率を指標とした見かけの変性温度は 85–86℃で、WT と同程度であった。以上の結果から、TLN の亜鉛結合モチーフ配列 HEXXH が TLN の触媒活性に必須であることが示唆された。これは、DPP III の亜鉛結合モチーフ配列 HEXXXH が DPP III の触媒活性に必須でないという過去の報告と対照的である。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 3 8 字×3 6 行で作成し、合わせて、3, 0 0 0 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、4 0 0 ~ 1, 1 0 0 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 5 0 0 ~ 2, 0 0 0 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、加水分解の逆反応を利用してペプチド合成に広く応用されているため、その触媒活性と熱安定性の向上は重要な課題である。本研究では、部位特異的変異により TLN の N 末端領域の β ヘアピンループ (Asn116-Gly117) と亜鉛結合モチーフ (HEXXH) の構造活性相関を解析した。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 5 種類の Gly117 変異型酵素 (G117A、G117D、G117E、G117K、G117R) を作製し、G117E の ZDFM 分解活性が野生型酵素 (WT) よりも高いことを見出した。このことから、Gly117 が β ヘアピンループの構造に影響を与えることにより、触媒活性において重要な役割を担っていることを示唆した。
2. 19 種類の Asn116 変異型酵素を作製し、N116D の FAGLA 分解活性と ZDFM 分解活性はともに WT よりも高いことを見出した。このことから、Asn116 が β ヘアピンループの構造に影響を与えることにより、触媒活性と安定性において重要な役割を担っていることを示唆した。
3. TLN の触媒活性を上げる 2 種類の変異導入 (Asn116→Asp、Asp150→Glu) のうち、Asp150→Glu は NaCl による触媒活性の向上と安定性の向上の程度を低下させるが、Asn116→Asp はこれらを低下させないことを見出した。このことから、TLN の特定の残基のイオンとの結合が活性化と安定化に関与していることを示唆した。
4. TLN の亜鉛結合モチーフ配列 $H^{142}ELTH^{146}$ をジペプチジルペプチダーゼ III の亜鉛結合モチーフ配列 HEXXXH に属する配列である $H^{142}ELLGH^{146}$ または $H^{142}ELTGH^{146}$ に置換しても、TLN の基質アナログである Gly-D-Phe に対する結合活性は有することを見出した。

以上のように、本論文は、TLN の N 末端領域の β ヘアピンループと亜鉛結合モチーフの触媒活性、安定性、基質結合性における役割を明らかにするとともに、触媒活性が向上した変異型 TLN を開発したものであり、酵素化学、栄養化学、農産製造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 26 年 1 月 15 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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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 (学位授与日から 3 ヶ月以内)