

氏 名	野 中 剛
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2641 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	好アルカリ細菌のプロテアーゼおよびアミラーゼの構造と機能

論文調査委員	(主 査) 教 授 三 木 邦 夫	教 授 伊 藤 維 昭	教 授 井 上 丹
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

好アルカリ細菌由来の2種類の酵素を対象として、X線結晶構造解析による酸化剤耐性機構、あるいは立体構造の安定化機構の解明を目指した研究を行った。

1) *Bacillus* 属の細菌が分泌するズブチリシンやその近縁の高アルカリ型のセリンプロテアーゼは、洗剤配合用酵素として利用されていて工業的にも重要な酵素である。これらのズブチリシン様酵素は、過酸化水素のような漂白剤に用いられる酸化剤によって酸化を受け、活性が大きく低下すると言われている。これは、活性中心のセリン残基のC-末端側に隣接したメチオニン残基が酸化されてスルホキシド基を形成し、そのスルホキシドの酸素原子がオキシアニオンホールに配向して正四面体中間体の形成を妨げるためだと考えられている。好アルカリ細菌である *Bacillus* sp. KSM-KP43 株が分泌するアルカリセリンプロテアーゼ、KP-43 プロテアーゼは、一般的に酸化による活性低下の原因とされている、活性セリン残基に隣接したメチオニン残基を有しているが、酸化剤に耐性を示すという珍しい性質を有している。本研究では、KP-43 プロテアーゼが酸化剤に耐える構造的特徴を解明するために天然型および酸化型の KP-43 プロテアーゼの結晶構造解析および生化学実験を行い、他のズブチリシン様酵素との比較を行った。天然型および酸化型 KP-43 プロテアーゼは硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で結晶化し、異常分散効果を考慮した重原子多重同型置換法で構造解析を行い、天然型および酸化型について、それぞれ 1.30Å および 1.73Å 分解能で精密化された立体構造を得た。構造解析の結果は、メチオニンスルホキシドによるオキシアニオンホール妨害説に疑問を呈するもので、これを検証する生化学的な実験を行った結果、酸化による活性の低下の主たる原因は、基質特異性の変化による合成ペプチド基質のアミノ酸配列の不適合化であり、タンパク質性基質を用いた場合は失活に近いほどの活性の低下は起こらないという結果が得られた。

2) 動物、植物、および微生物由来の全ての既知の α -アミラーゼは、構造の安定化に寄与するいくつかのカルシウムイオンを含んでいる。AmyK38 は好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. strain KSM-K38 株から発見された α -アミラーゼで、分子量約55,000、480残基で、アルカリ至適で酸化剤や界面活性剤にも耐える酵素である。典型的な細菌由来の α -アミラーゼとのアミノ酸配列の相同性は約67%であるが、AmyK38 は Ca^{2+} イオンを含まず、その酵素活性は Na^{+} イオンに依存する。本研究では、AmyK38 のカルシウム非依存性を結晶学的に証明し、その構造維持の機構を解明するために、天然型、金属イオン置換型酵素および変異体型酵素の X 線結晶構造解析を行った。また、本酵素がアルカリ至適酵素であり弱酸性以下の pH 領域で活性が低いことを利用して、マルトペンタオースとの複合体を調製し、その構造解析にも成功した。AmyK38 はポリエチレングリコールを沈殿剤として用いて結晶化し、分子置換法で構造解析を行った。AmyK38 分子中にはいかなるカルシウムイオンも存在しないことが示され、また、カルシウムイオンの代わりにナトリウムイオンを使って活性のある構造を安定化していることが明らかになった。さらに、AmyK38 とマルトペンタオースとの複合体の構造解析の結果から、 α -アミラーゼの反応機構に関する考察を行った。

論文審査の結果の要旨

本論文は、*Bacillus* sp. KSM-KP43 株由来のアルカリセリンプロテアーゼ、KP-43 プロテアーゼ、および *Bacillus* sp. KSM-K38 株由来のアルカリ α -アミラーゼ、AmyK38 の結晶構造解析を行い、その立体構造を検討することによって酸化剤耐性や構造安定化機構、触媒機構について議論したものである。

ズブチリシンは、過酸化水素のような酸化剤によって酸化を受け、活性が低下することが示されていた。このことは、活性中心のセリン残基の C-末端側に隣接したメチオニン残基が酸化され、生成したスルホキシド基がオキシアニオンホールに影響を与えて正四面体反応中間体の形成を妨げるために活性が著しく低下することに由来すると考えられていた。しかし、本研究の結果からは、酸化剤耐性を示す天然型および酸化型の KP-43 プロテアーゼの構造と、天然型および酸化型のズブチリシンの構造との間に大きな違いがないことが示され、酸化による失活の機構に疑問を呈することとなった。その結果行った生化学実験によって、酸化による活性の低下の主因は酸化されたメチオニンの反応機構への干渉ではなく、基質特異性の変化であることが見出されている。

一方、全ての既知の α -アミラーゼは、構造安定化のためにカルシウムイオンが必要であり、さらにほとんどの α -アミラーゼは、基質結合部位の一部の領域の構造を安定化する、高度に保存されているカルシウムイオンを有することが知られている。生化学実験や元素分析によって、カルシウムを含まないことが示されていた α -アミラーゼ、AmyK38 を、天然型と数種の金属イオン置換型において構造解析することによって、結晶学的にもカルシウムイオンを含まないことを証明し、さらにカルシウムイオンの代わりにナトリウムイオンが構造を安定化しているということを明らかにしている。さらには、このような必要とされる金属イオンの違いは、金属イオンに配位しているアミノ酸残基の荷電を変更するような置換によって生じていることも見出し、 α -アミラーゼのみならず、金属タンパク質全般の金属イオン結合性の改変の可能性を示している。また、AmyK38 がアルカリ至適酵素で、結晶化条件である中性付近の pH において触媒能が低いことに着目して、変異体酵素や阻害物質を用いることなく酵素基質複合体を調製し、その構造解析に成功している。この構造は、変異体を用いて得られた共有結合型との異なる反応中間体である可能性を示すものである。この結果は、現在まだ議論が分かれている α -アミラーゼを含むアノマー立体構造保持型のグルコシダーゼの反応機構に関して、その解明に大きく寄与するものと考えられる。

以上のようにこれらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。