

氏 名	わか いくずや けい こ 若 井(葛谷) 桂 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1227 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Remarkable Activation and Stabilization of Thermolysin by Solvent Engineering and Exploration of the Microenvironment of Its Active Site (溶媒工学によるサーモライシンの顕著な活性化と安定化および活性部位微小環境の探査)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 松 野 隆 一 教 授 伏 木 亨

論 文 内 容 の 要 旨

サーモライシン (TLN) は、中等度好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の耐熱性の中性金属プロテイナーゼである。アミノ酸配列、X 線結晶解析による三次構造が知られ、広範に研究されている。TLN は高濃度の中性塩の存在下で特定の基質に対する活性が顕著に増大することが知られている。人工甘味料アスパルテーム前駆体の合成など工業的に広く利用されており、中性、低イオン強度における溶解度が極めて小さいことが工業的利用における難点となっている。

本論文では、TLN の好塩性に着目し、溶媒に高濃度 (1~5M) の塩を添加することにより溶媒工学的に反応系を改変し、TLN の活性化および安定化を図った。また、活性部位微小環境の探査を目的として、塩の添加により生ずる TLN の UV 吸収差スペクトルを解析し、活性中心の亜鉛イオンのコバルト置換効果を検討した。その主な内容は以下のとおりである。

1. TLN の活性および溶解度に対する塩類の添加効果: TLN による合成ペプチド基質の加水分解活性は、塩の種類および濃度に依存して増大した。NaCl が特に効果的であり、塩濃度上昇に伴い活性は指数関数的に増大し、NaCl 4M では塩のない時の13~15倍に達した。また、TLN の溶解度は塩の添加により約 1mg/ml から最大 70mg/ml まで増大した。溶解度増大効果は低温でより大きく、カオトロピックイオン系列に従っていた。0~3M NaCl 存在下で TLN は単量体として存在しており、塩による活性増大および溶解度上昇は TLN の凝集や分散を伴わないことを確認した。塩による活性化と溶解度増大による酵素濃度増大を総合すると、塩のない時に比べて反応速度が数百倍にも増大することが示され、本酵素の工業的利用における塩類の有用性が示唆された。

2. TLN の熱安定性に対する NaCl の添加効果: TLN を 0~4M NaCl 存在下 60~85℃ で加熱し残存活性を測定した結果、NaCl 添加により熱失活速度が小さくなることを見出した。熱失活速度定数のアレニウスプロットから算出された熱失活の活性化エネルギーを熱安定性の指標とすると、TLN は 0.5~1.5M NaCl 存在下で塩のない時に比べて熱安定性が約 2 倍に高められることが示された。

以上のように、TLN の好塩性酵素としての特性を明らかにすると共に、活性亢進剤、安定化剤としての塩類の有用性を示した。高濃度の塩の存在下では解離したイオンに水分子が水和し溶液中の自由水が極めて少なくなっていると考えられ、このような溶媒系を目的酵素の活性化、安定化に利用することは溶媒工学の有用な手法になり得ると期待される。

3. トリプトファン (Trp) 残基の吸収変化を利用する TLN 活性中心の探査: TLN は 277nm に極大を持つ紫外外部吸収スペクトルを示す。TLN に高濃度の NaCl を添加すると微小の差スペクトルが観察され、塩の添加により Tyr や Trp 残基の存在状態に微小の変化が生じることが示された。Trp 残基に特有の 293nm のピークに着目して解析した結果、このピークが TLN の活性中心を拮抗的阻害剤 (phosphoramidon および zincov) で覆った状態では消失すること、NaBr を添加した場合は現れないことが認められた。したがって、NaCl 添加による 293nm の UV 吸収変化は活性中心に位置する Trp115 への負電荷の接近によるレッドシフトであり、この Trp115 は塩化物イオンと臭化物イオンの 0.2 Å の水和イオン半径の差

を認識していることが示唆された。Trp115は酵素—基質間結合の安定性に寄与すると言われており、活性部位探索のための有用なプローブになり得ると期待される。

4. 活性部位亜鉛のコバルト置換による TLN 活性中心の探索：活性に必須の亜鉛イオンをコバルト置換した TLN を作製し、諸性質を亜鉛 TLN と比較した。コバルト置換 TLN の活性は亜鉛 TLN の 3 倍に増大し、NaCl 添加によりさらに指数関数的に増大した。金属置換と塩添加の効果は相乗的に作用し、両者を同時に作用させたときの活性は最大40倍まで増大した。活性の pH 依存性を比べると酸性側解離基の挙動に多少の変化が認められた。拮抗的阻害剤 zincov は亜鉛 TLN よりもコバルト置換 TLN に 2～18倍強く結合し、コバルト置換による活性化には酵素基質複合体の安定化が寄与している可能性が示唆された。コバルト置換 TLN は亜鉛 TLN に勝る活性と同様の好塩性を示し、コバルトの内部プローブとしての有用性が示された。

論文審査の結果の要旨

好熱性プロテイナーゼ、サーモライシン（TLN）は、人工甘味料アスパルテーム前駆体の合成など工業的に広く利用されている。高濃度の中性塩の存在下で特定の基質に対する活性が顕著に増大することが知られており、好塩性酵素としても注目されている。本論文は、TLN の好塩性に着目し、溶媒に高濃度の塩を添加することにより溶媒工学的な反応系の改変を試みると共に、塩の添加により生ずる TLN の UV 吸収差スペクトルの解析や活性中心亜鉛イオンの金属置換効果の検討により活性部位微小環境の探索を試みたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. TLN の活性および溶解度に対する塩類の添加効果を検討し、TLN による合成ペプチド基質の加水分解活性が塩の種類および濃度に依存して最大15倍まで増大すること、TLN の溶解度が塩の添加により最大70倍まで増大することを示した。塩による活性化と溶解度増大による酵素濃度増大を総合すると、塩のない時に比べて反応速度が数百倍にも増大する可能性を示し、本酵素の工業的利用における塩類の有用性を示した。

2. TLN の熱安定性に対する NaCl の添加効果を検討し、60～85℃で NaCl 添加により TLN の熱失活速度が小さくなることを見出した。熱失活の活性化エネルギーを熱安定性の指標とすると、TLN は0.5～1.5M NaCl 存在下で塩のない時に比べて、熱安定性が約 2 倍に高められることを示した。高濃度の塩を添加して溶媒の物理化学的性質を溶媒工学的に改変することにより、目的酵素の活性化や安定化に利用し得る可能性を示した。

3. 高濃度の NaCl 添加により生じる TLN の極めて微小な紫外吸収差スペクトルを利用して TLN と塩類の相互作用を解析した。差スペクトルが活性中心 Trp115 に起因することを示し、この Trp115 が塩化物イオンと臭化物イオンの0.2Åの水和イオン半径の差を認識していることを推察した。Trp115 は酵素と基質の結合を安定化すると考えられている残基であり、活性部位探索におけるプローブとしての有用性を示した。

4. 活性に必須の亜鉛イオンをコバルト置換した TLN を作製し、活性部位微小環境に対する金属置換効果を解析した。コバルト置換 TLN は亜鉛 TLN と同様の好塩性を保持しつつ、活性増大と pH 依存性の変化を示すことを確認した。

以上のように本論文は、TLN の好塩性を利用した溶媒工学的手法により本酵素の活性化と安定化を達成し、さらに本酵素の活性部位微小環境に関して多くの重要な知見を得たものであり、酵素化学、食品工学、栄養化学の分野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14年1月17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。