

氏 名	李 守 馥
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 918 号
学位授与の日付	平 成 9 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	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Halophilic Properties of a <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> Neutral Metalloproteinase, Thermolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i> の中性金属プロティナーゼ, サーモライシンの好塩的性質に関する研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世	教 授 熊 谷 英 彦	教 授 廣 瀬 正 明
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

サーモライシンは *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の中性金属プロティナーゼであり、疎水性アミノ酸を含むペプチド結合を特異的に加水分解する基質特異性を持つ好熱性酵素である。最近、サーモライシンの活性が、高濃度 (1-5M) の中性塩の存在下に顕著に上昇することが見い出された。また、熱安定性や溶解度も高濃度の塩により増大することから、サーモライシンは好塩性酵素であると考えられた。本研究では、サーモライシンの好塩性を分子レベルで解明することを目的とし、種々のジペプチド合成基質を用い、塩によるサーモライシンの活性化挙動を調べた。また、活性化に対する pH や温度及び有機溶媒の効果を検討した。さらに、本酵素のチロシン残基をニトロ化及びアミノ化することにより、活性化に対する酵素表面のチロシン残基の電荷の変化の影響を検討した。その主な内容は以下のとおりである。

1. 基質切断部位に疎水性の異なるアミノ酸残基を含有する一連のジペプチド合成基質を用い、サーモライシンの塩による活性化挙動を観測した。用いた基質に対する酵素活性は塩濃度の増大につれて指数関数的な上昇を示した。酵素活性は基質切断部位でのアミノ酸残基の疎水性に大きく依存したが、塩による活性化の度合はほとんど依存しなかった。この活性化は酵素反応の基底状態と遷移状態のギブス自由エネルギーの差の減少を伴うものであり、その変化量を測定した。ジペプチド基質の加水分解反応に対する速度パラメータを求め、塩による活性化が分子活性 k_{cat} の増大のみに起因し、ミカエリス定数 K_m には依存しないことを明らかにした。この活性化は一価カチオンに大きく依存し、その依存性は、 $Na^+ > K^+ > Li^+$ であり、離液系列の順とは異なることから、カチオンと酵素との特異的反応が活性化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2. サーモライシンの活性化挙動に対する pH や温度及びアルコール添加の効果を検討した。塩濃度の増大につれてアルカリ側の pK_a 値は変化せず、酸性側の pK_a 値のみ増加し、pH プロファイルの幅が狭くなることから高濃度の中性塩の存在下では対イオンの存在にもかかわらず、酵素の活性部位への静電的効

果が上昇することが示された。高濃度の塩による活性化は中性 pH で極大値を示すベル型の pH 依存性を示し、pH 変化に伴う酵素の静電的性質の変化の関与が示唆された。温度の上昇及びアルコールの添加により活性化度は減少したが、これはイオン間の静電的相互作用に影響を及ぼす誘電率の減少に起因する可能性が考えられた。

3. サーマライシンのチロシン残基の存在状態を pH ジャンプ及び pH 依存的なイオン化により求め、溶液中の酵素表面の性質を評価した。表面のチロシン残基は異なる解離性を示しており、比較的解離しにくい状態に置かれていることが示され、その周辺には解離を抑制する静電的環境あるいは疎水的环境が比較的多く存在することが示唆された。

4. 酵素表面に露出しているチロシン残基をニトロ化及びアミノ化することによりもたらされる表面の静電的性質の変化が塩による活性化に及ぼす影響を検討した。ニトロ化に続いてアミノ化するとサーモライシンの活性は低下し、 k_{cat} が低下し、 K_m は変化しなかった。ニトロ化した酵素の塩による活性化度は pH の上昇に伴い低下し、続いてこれをアミノ化すると活性化度は未修飾酵素の水準にまで回復した。このことから表面のチロシン残基に基づく静電的性質が本酵素の活性化に深く関わっていることが示唆された。蛋白質の分子表面におけるイオン結合部位の増大は、蛋白質周囲の水和構造を堅固にすることによりコンホメーションの安定性を増大させる可能性が考えられる。サーモライシンの分子表面のチロシン残基をニトロ化した場合、熱失活の活性化エネルギーは、未修飾酵素の活性化エネルギーに比べて大きく増大し、熱安定性が増大した。すなわち、ニトロ化によるサーモライシン分子表面の負電荷の増大が熱安定性の増大をもたらした。酵素表面の負電荷の増大により、塩による活性化度の増大ももたらされることから、塩による活性化は、水和イオンの酵素表面への結合による酵素の構造の安定化に強く関連する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

サーモライシンは *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の中性金属プロティナーゼであり、疎水性アミノ酸を含むペプチド結合を特異的に加水分解する好熱性酵素である。最近、本酵素が数 mole/L レベルの高濃度の中性塩の存在下に数十倍にも達する顕著な活性化を受けることが見い出された。また、熱安定性や溶解度も高濃度の塩により増大することから、本酵素は典型的な好塩性酵素であると考えられる。好塩性酵素はその工業的利用において、塩の添加が酵素のコストの実質的な低下をもたらす点で有用である。本研究は、塩によるサーモライシンの活性化挙動を蛋白質化学、反応速度論、分光学的手法を用いて検討し、サーモライシンの好塩性を分子レベルで解明したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 基質切断部位に疎水性の異なるアミノ酸を含有する一連のジペプチド合成基質に対し、サーモライシンの活性は塩濃度の増大につれて指数関数的に上昇した。この活性化は酵素反応過程における基底状態と遷移状態とのギブス自由エネルギーの差の減少に対応した。酵素活性は基質切断部位のアミノ酸残基の種類に大きく依存したが、活性化の度合は依存しなかった。また、塩による活性化は分子活性 k_{cat} の増大のみに起因した。この活性化は一価カチオンに大きく依存し、その依存性が離液系列の順と異なることから、カチオンと酵素との特異的相互作用の関与が示唆された。

2. サーマライシンの活性化に対する pH や温度及びアルコールの効果を検討した。塩による活性化は中性 pH で極大を示し、酸性とアルカリ性ではほとんど消失した。活性化には酵素表面の静電的性質の関与が示唆された。活性化度は、温度の上昇及びアルコールの添加により減少し、溶媒の誘電率の減少による静電的相互作用にも依存する可能性が示された。

3. サーマライシンの活性化に対する酵素表面の静電的性質の変化をチロシン残基の解離を指標にして検討した。pH ジャンプ及び pH 滴定から、チロシン残基の存在状態を決定した。溶媒に露出しているチロシンをニトロ化及びアミノ化した。ニトロ化酵素の活性化度は pH の上昇に伴い大きく低下したが、アミノ化酵素の活性化度は未修飾酵素の場合と同程度であった。これより、サーモライシンの塩による活性化は酵素分子表面のチロシン残基の解離による静電的性質の変化に依存することが示された。

以上のように、本論文はサーモライシンの好塩的性質と塩による顕著な活性化の分子機構について、酵素化学的に重要な多くの知見を示しており、酵素学並びに生化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9年2月14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。