

氏 名	よし むね かず あき 吉 宗 一 晃
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2555 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on Biochemistry and Application of Hsp70 Family Proteins (Hsp70 ファミリータンパク質の生化学および応用に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教授 江 崎 信 芳 教授 喜 多 恵 子 教授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

分子シャペロンは新生および変性タンパク質に結合し、その折れたたみ過程を制御する補助因子としてタンパク質の機能発現に重要な役割を果たしている。Hsp70 ファミリータンパク質は多くの生物で高度に保存されている分子量約7万の分子シャペロンで、細菌のHsp70 ファミリータンパク質であるDnaKについては、外来タンパク質と共発現させることで、封入体の形成を抑制できることが明らかにされている。しかし、適用できるタンパク質の種類は限定されており、基質特異性の広いものや、低温での発現に利用できるものなど、新たなDnaKの開発が期待されている。本研究は、好冷菌 *Shewanella* sp. Ac10 や *Vibrio proteolyticus* のDnaKのほか、*Escherichia coli* から新しいDnaKホモログを見だし、それらの構造と機能を解析するとともに、応用面を開発したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. 好冷菌 *Shewanella* sp. Ac10 より SheDnaK 遺伝子をクローニングするとともに、その構造を解析し、SheDnaK 遺伝子上流域に *E. coli* のものとはほぼ同様な熱ショックプロモーターが存在することを見いだした。*Shewanella* sp. Ac10 において SheDnaK は熱ショック誘導されるが、誘導温度は *E. coli* の場合より 10°C 以上低いことを明らかにした。*E. coli* のDnaK (EcoDnaK) の場合、温度上昇とともに対数的に活性が上昇するのに対し、SheDnaK はそのような鋭敏な温度応答性を示さないものの、低温域においては EcoDnaK よりもはるかに高い活性を示すことを見いだした。

2. *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 株の D-アミノアシラーゼは D-アミノ酸の生産に利用できる有用酵素である。*E. coli* を宿主として本酵素を発現させると封入体を形成するが、SheDnaK を共発現させることで封入体の形成が著しく抑制されることを見いだした。特に、低温で培養することによって、可溶性の D-アミノアシラーゼを効率よく生産できることを示した。

3. DnaK は、*E. coli* では生育温度センサーとして機能すると推論されている。DnaK を構成する ATP 結合ドメインと基質結合ドメインのうち、どのドメインが温度検知に重要な役割を果たしているか、*V. proteolyticus* と *E. coli* のDnaK を比較することにより検討した。*V. proteolyticus* は *E. coli* と近縁でありながら、その生育許容温度ならびに生育至適温度は *E. coli* の場合より約 10°C 低い。両 DnaK のドメインを入れ替えたキメラ DnaK を作製して検討した結果、主に ATP 結合ドメインが温度応答に関係することを見いだした。*E. coli* に SheDnaK 遺伝子を導入すると、低温域で良好に生育できるようになることも見だし、細菌の生育温度と DnaK は密接に関連していることを明らかにした。

4. *E. coli* に新しい Hsp70 ファミリータンパク質を見いだした。Hsc62 と命名したこのタンパク質は、DnaK の場合よりも低温域で機能する新しい分子シャペロンであることを示すとともに、Hsp62 に対して特異的に作用する新しいコシャペロン Hsc56 を見いだした。DnaK のコシャペロンの一つ GrpE は、Hsc62-Hsc56 の系でも共用され、Hsc62、Hsc56 および GrpE の三者で新しいシャペロンシステムを構成していることを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

分子シャペロンの一種、Hsp70 ファミリータンパク質を遺伝子組換えに利用すれば、封入体形成を抑制し、高効率な発

現を達成できると期待される。本研究は、新規 Hsp70 ファミリータンパク質を見いだし、それらの生化学的機能の解明と応用開発を行ったものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 好冷菌に着眼した点がユニークである。*Shewanella* sp. AC10 において SheDnaK が低温で誘導され、しかも SheDnaK 自体、低温で高い活性をもつことを示したことは、Hsp70 ファミリータンパク質の生化学的機能の理解を深め、低温活性酵素の開発に新たな示唆を与えるものであり、評価できる。

2. 低温で発現させることで封入体形成を抑制できる場合がある。低温で高い活性をもつ SheDnaK を利用すれば、封入体形成をさらに抑制できるのではないかと着想した点は、高く評価できる。D-アミノアシラーゼの発現系において、EcoDnaK の利用では封入体形成を抑制できなかったが、SheDnaK を利用し低温で培養することで、効率よく可溶性酵素を生産できることを示した。その学術的意義は大きい。

3. *E. coli* と近縁でありながら、生育至適温度ならびに生育上限温度が *E. coli* の場合よりも約 10°C 低い *Vibrio proteolyticus* に着眼した点もユニークであり、評価できる。*V. proteolyticus* の DnaK と EcoDnaK の各種キメラ DnaK を解析することで、ATP 結合ドメインが主に温度変化を検知するという興味深い知見を得ており、これによって Hsp70 ファミリータンパク質の機能の理解をさらに深めた意義は大きい。

4. 温度応答という新しい切り口で *E. coli* の Hsp70 ファミリータンパク質を洗い直し、新しいホモログを見いだすとともに、新しいコシャペロンの関与するユニークなシャペロンシステムを見いだしたことは、高く評価できる。

以上のように本論文は新しい Hsp70 ファミリータンパク質を見いだし、それらの生化学的機能解明と応用開発を行ったものであり、生化学と応用微生物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17年1月13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。