OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	好熱菌 Bacillus stearothermophilus 由来耐熱性中性プロテアーゼに関する研究
Author(s)	高木, 昌宏
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1761
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名・(本籍)	高木昌宏(たかぎまさひろ)
学位の種類	工学博士
学位記番号	第8985号
学位授与の日付	平成2年2月28日
学位授与の要件	学位規則第5号第2項該当
学位論文題目	好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来耐熱性中性プロテアーゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 今中 忠行 教授 岡田 弘輔 教授 大嶋 泰治 教授 高野 光男 教授 山田 靖宙 教授 菅 健一 教授 二井 将光 教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

本論文は，好熱性細菌の生産する耐熱性酵素の熱安定性及び基質特異性のタンパク質工学的改変に関する研究をまとめたもので，緒論，本文5章および総括から成っている。

緒論では，タンパク質工学の現況について概観したうえで，酵素特性改変の意義を論じ，本研究の目的本論文の位置付けを行っている。

第1章では，*B. stearothermophilus* を宿主として好熱菌由来中性プロテアーゼ構造遺伝子をクローニングし，さらに組み換えプラスミドを枯草菌内でも発現させた結果，両組み換え体とも同じ性質の酵素を生産し，クローニングした遺伝子が構造遺伝子であることを証明している。

第2章では，遺伝子の塩基配列，酵素N末端アミノ酸配列並びに転写開始点を明らかにしている。構造遺伝子は1644塩基（548アミノ酸残基）のオープンリーディングフレームにコードされている事が判り，また精製酵素のN末端配列より230番目のアミノ酸以降が成熟タンパク質として分泌されている事が明らかになり，前駆体領域229残基はプレープロ構造として分泌に関わっていることを示している。

第3章では，プロ構造内の欠失が大きくなるほど生産性が低下する傾向が，また2アミノ酸の挿入で生産性が低下する傾向が認められ，同構造が前駆体タンパク質の膜透過に必要なコンフォメーションを与える役割を担っていることを示している。

第4章では，熱安定性向上の為の設計基準（①相同アミノ酸残基は置換しない。②統計的に熱安定性向上に寄与するアミノ酸置換を導入する。③α－ヘリックス構造を安定化する。）に従って，部位特異的突然変異によりGly144をAlaに置換した場合（M1），野生型に比べて熱安定性が向上したことを示している。熱安定性低下を目的とした置換（M3：Thr66→Ser）では低下が認められている。しかし，熱

安定性低下を回復させる為には，M３にM１置換及びM２置換（Gly61→Ala）を組み合わせた３重変異M１２３を作成する必要があり，熱安定性向上は，アミノ酸置換の協同的効果により達成されると考えられる。

第５章では，M１の比活性，基質特異性の変化を調べている。カゼインを基質とした場合の比活性は野生型酵素に比べてM１では５０％高くなっている。リゾチームやインスリンB鎖を基質とした場合には逆にM１の方が比活性が低く，インスリンA鎖を基質とした場合M１による分解が認められない事が示されている。オリゴペプチドを用いてミカエリス定数（Km），及びターンオーバー数（kcat）を測定した結果，M１ではkcat値が３分の１に低下している。Gly144近傍のGlu146は，求核攻撃を促進する残基であり，アミノ酸置換によって構造上の位置が変化し，比活性に影響を及ぼしたものと考えられる。

最後に，本研究で得られた結果を総括し，本論文の結論としている。

論文の審査結果の要旨

耐熱性中性プロテアーゼは，工業的にも重要な位置を占める酵素であるが，本論文において，プロテアーゼ構造遺伝子の遺伝子工学的解析並びに酵素機能のタンパク質工学的改変を行い，次のような重要な基礎的知見を得ている。

(1) 好熱菌（*B. stearothermophilus*）宿主－ベクター系を利用して耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子をベクタープラスミドにクローニングし，遺伝子を単離している。その遺伝子増幅効果により酵素生産性が野生株の約１５倍に向上している。

(2) 構造遺伝子の塩基配列を決定し，１６４４塩基（５４８アミノ酸残基）から成るオープンリーディングフレームにプロテアーゼがコードされていることを明らかにしている。また精製した菌体外プロテアーゼのN末端アミノ酸配列決定により，オープンリーディングフレームの２３０番目のアミノ酸（バリン）以降が成熟タンパク質領域として分泌されていることが示されている。

(3) プロテアーゼ前駆体のプレープロ領域は２２９アミノ酸に及び，その内シグナル配列を除くプロ領域の役割について種々の欠失や挿入変異を作製することにより調べ，プロ領域がプロテアーゼシグナル配列，並びに成熟タンパク質領域と協同的かつ特異的に働き，効率良い膜透過に必要なコンフォメーションを前駆体タンパク質に与える役割を果していることを示している。

(4) クローニングしたプロテアーゼ遺伝子領域を用いて部位特異的変異操作の手法によりアミノ酸置換を導入し，酵素耐熱性の計画的改変を行っており，５種類の変異酵素を一定の設計基準に従って作製し目的どおりにプロテアーゼ耐熱性を向上，または低下させている。酵素の熱安定性向上は，主鎖の立体構造を大きく変えない範囲でのアミノ酸置換の協同的な効果によると結論付けている。ここで示されたタンパク質工学的手法はプロテアーゼに限らず他の酵素においても充分適用可能である。

(5) 部位特異的変異操作により得られた耐熱性の向上した酵素（M１：Gly144→Ala）は，カゼインを基質とした場合野生型酵素の1.5倍の高い比活性を示し，他方，環元型リゾチーム，インスリンB鎖，

並びにインスリンA鎖を基質とした場合変異酵素の方が比活性が低い事を示している。更にオリゴペプチドを用いてKm，kcatを調べた結果，M1酵素ではkcatが野生型に比べ約1／3に低下していることを示している。

以上の結果は，遺伝子工学およびタンパク質工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。