The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on the activity and stability of ribonuclease HI from Thermus thermophilus HB8
Author(s)	Hirano, Nobutaka
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184283
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏　　名	平　野　展　孝（ひら の のぶ たか）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　16173　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学　位　論　文　名	Studies on the activity and stability of ribonuclease HI from *Thermus thermophilus* HB8 （*Thermus thermophilus* HB8 由来リボヌクレアーゼ HI の活性と安定性に関する研究
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金谷　茂則 教　授　福住　俊一　教　授　宮田　幹二　教　授　柳田　祥三 教　授　横山　正明　教　授　高井　義造　教　授　梅野　正隆

論　文　内　容　の　要　旨

本論文では、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 RNase HI（好熱菌 RNase HI）を対象とした、好熱菌由来酵素の安定性－活性相関の解析、また、本酵素を用いた産業的利用法の開発について論じている。

序論では、一般の酵素における安定性－活性相関研究、及び RNase HI を対象として行われてきた安定性－活性相関研究の背景に触れ、本研究の目的について述べている。

第一章では、本酵素の新たな耐熱化因子の同定を目的とし、C末端を段階的に欠失させたC末端欠失変異体を構築し、その熱安定性、酵素活性の解析から、Cys^{149}が本酵素の耐熱化に寄与している事を明らかにしている。また、本酵素に存在する4個の Cys を Ala に置換した変異型酵素を構築し、その熱安定性、酵素活性の解析、及びペプチドマッピングによる解析から、本酵素の Cys^{41}、Cys^{149}間に、試験管内において自発的にジスルフィド結合が形成される事、ジスルフィド結合形成による耐熱化は T_mにして約6～7℃である事、酵素活性にはほとんど影響しない事を明らかにしている。これらの結果は、好熱菌由来酵素の安定性を、酵素活性を減少させる事なく向上させられる事を示している。

第二章では、本酵素の常温における酵素活性の向上を目的として、サプレッサー変異法を用いたスクリーニングを行い、30℃における酵素活性を向上させるアミノ酸置換3種類（Ala12→Ser、Lys75→Met、Ala77→Pro）を同定している。これら3種類のアミノ酸置換をすべて組み合わせた場合、ほとんど不安定化する事なく、30℃における酵素活性が k_{cat}/K_mにして40倍に向上する事、また、60℃における酵素活性も向上する事を明らかにしている。これらの結果は、好熱菌由来酵素の酵素活性を、安定性を減少させる事なく向上させられる事を示している。

第三章では、耐熱性 RNA 制限酵素の開発を目的として、本酵素に DNA オリゴマーを連結したハイブリッド RNase H（好熱菌ハイブリッド酵素）を構築し、大腸菌 RNase HI を用いて構築したものと RNA 切断の配列特異性、耐熱性、及び反応至適温度を比較している。その結果、好熱菌ハイブリッド酵素は、RNA を配列特異的に切断できる事、また、大腸菌 RNase HI を用いて構築したものよりも、はるかに高い耐熱性を有している事を示している。これらの結果は、好熱菌ハイブリッド酵素が、高次構造を形成する RNA でも、その高次構造が変性する高温において効率良く配列特異的に切断できる事を示唆している。

総括では、本研究から得られた知見をもとに、好熱菌由来酵素の活性と安定性が、必ずしも反比例するとは限らず、酵素の一部を改変するだけでその活性、あるいは安定性だけを改変できる事を述べている。また、本研究において構

築した好熱菌ハイブリッド酵素が、耐熱性 RNA 制限酵素として機能しうる可能性についても言及している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、好熱菌 RNase HI の安定性－活性相関を解析すること、さらにはその新たな産業的利用法を開発することを目的として行われた結果、以下に示す知見を得ている。第一章では、本酵素の新たな耐熱化因子として、試験管内において自発的に形成されるジスルフィド結合を同定している。第二章では、サプレッサー変異法を用いて、本酵素の酵素活性を改善し、好熱菌由来酵素の酵素活性を、安定性を減少させる事なく向上させられる事を示している。第三章では、耐熱性 RNA 制限酵素の開発を試み、大腸菌 RNase HI を用いたものより耐熱性に優れた酵素を構築している。

以上のように、本論文は好熱菌 RNase HI の安定性－活性相関を理解し、本酵素の産業的利用を図る上で有益な知見を与えるものであり、本論文は博士論文として価値あるものと認める。