

Title	Bacillus stearothermophilus由来の耐熱性中性プロテアーゼに関する研究
Author(s)	久保, 幹
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3065972
DOI	10.11501/3065972
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	久保 幹 <small>もとまき</small>
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 1 0 4 9 2 号
学位授与年月日	平成 4 年 12 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	<i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来の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 大嶋 泰治 教授 菅 健一 教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

本論文は、アスパルテーム（APM）合成のため自然界より新規にプロテアーゼ生産菌を分離し、当該菌株と酵素の諸性質を決定し、その遺伝子発現メカニズムや酵素活性増強を遺伝子工学・タンパク質工学的手法を用いて研究した成果をまとめたもので、序論と本論6章及び総括と展望から成っている。

序論では研究の背景と目的を述べ、本論文の構成を示している。

第1章では、APMの合成用酵素取得を目指し、自然界より耐熱性プロテアーゼを生産する菌株のスクリーニングを行っており、その結果従来より APM 合成能が高い酵素を生産する菌株を分離している。また本菌を *B. stearothermophilus* と同定すると共に、高生産変異株の取得を行っている。

さらにこの酵素（NprM と命名）の諸性質も検討している。

第2章では、第1章で得られた NprM 生産菌株を DNA 供与体とし、*B. subtilis* を宿主として *nprM* 遺伝子のクローニングを行っている。*nprM* 遺伝子の全塩基配列は、1, 656塩基から構成され、N末端から236アミノ酸はプレ・プロ構造であり、菌体外酵素は316アミノ酸から構成されていることを明らかにしている。

第3章では、この *nprM* 遺伝子の高生産メカニズムを解析するため、核酸上の2次構造強度と遺伝子発現との関係について調べている。*nprM* 遺伝子中の mRNA 2次構造は一カ所のみであったため、この領域に2次構造の強度を変えた変異導入を行い、2次構造強度と遺伝子発現量との関連性を明らかにしている。さらに原核生物で核酸上の2次構造強度と遺伝子発現との関係について解析し、生物学的閾値が存在することを示している。

第4章では、*nprM* プロモーターを解析するため、このプロモーターを基本として改良型プロモーターを構築し、その強度を比較することにより *nprM* プロモーターの特徴を明らかにしている。さらに大腸菌中で働く強力かつ制御可能なプロモーターの構築を試み、従来から強いプロモーターとして知られる *tac* プロモーターより約3倍強い新規プロモーターを構築している。

第5章では、タンパク質工学的に NprM の活性と安定性を上昇させるべく、5カ所の部位にアミノ酸置換を導入している。Phe114 を Ala に、また Tyr110 および Tyr211 を Trp に置換したものは1.3~1.6倍の比活性上昇を達成して

いる。一方、自己分解部位の Tyr93 を Gly と Ser に置換することにより、熱安定性の向上した変異体を取得している。

第6章では、NprM の大量醗酵生産を目指し、*nprM* 遺伝子発現の特徴を解析している。低コピー数プラスミドベクターを用い、*nprM* 遺伝子の発現を行わせ、この遺伝子は培養温度の違いで発現様式が異なること、また高温で醗酵生産が増強されることを見出している。

総括と展望では、本研究で得られた成果をまとめ、今後の展望と解決すべき課題を述べている。

論文審査の結果の要旨

酵素反応と有機反応の両方を利用したハイブリッド・プロセスではその反応系において基質特異性と安定性の高い酵素を選択することが重要である。ハイブリッド・プロセスを利用した APM 合成において、最適な酵素を取得するためにはまず自然界より酵素生産菌をスクリーニングし、菌株および酵素の諸性質を決定することから研究が始まる。また酵素分子やその遺伝子発現メカニズムを詳細に解析するためには、当該遺伝子の分離等、遺伝子工学的手法を用いて研究する必要がある。本論文は、遺伝子工学的およびタンパク質工学的手法を用いて耐熱性中性プロテアーゼ（APM 合成酵素）の構造解明、遺伝子発現メカニズムの解析、酵素活性や安定性の増強、生産方法の検討を行ったものであり、主な成果は以下のとおりである。

- (1) 自然界より APM 合成に適した新規耐熱性中性プロテアーゼを生産する菌株をスクリーニングし、菌株を同定すると共に酵素の諸性質を明らかにしている。また種々の変異株を分離し、NprM 高生産変異株の育種を行っている。
- (2) NprM をコードする遺伝子をクローン化してその全塩基配列を決定し、本酵素タンパク質の一次構造を推定している。また成熟酵素の N 末端アミノ酸を決定し、NprM はプレ・プロ構造を有していることを明らかにしている。さらにこの *nprM* 遺伝子を用い、遺伝子増幅効果により親株より約10倍高い酵素生産性を達成している。
- (3) *nprM* 遺伝子の高発現メカニズムを解明するため、構造遺伝子内の2次構造に着目し、2次構造強度を変化させる部位特異的変異導入を行い、2次構造強度と遺伝子発現との関連性を示している。また原核生物における2次構造強度と遺伝子発現との関係について解析し、生物学的閾値の存在を示唆している。
- (4) *nprM* プロモーターを種々改良し、大腸菌中でのプロモーター強度に関与する領域を明らかにしている。またこれらの知見を基礎として従来の強力なプロモーターよりも約3倍強くかつ制御可能な新規プロモーターを構築している。
- (5) タンパク質工学的手法を用いNprMにアミノ酸置換を導入することにより、各部位におけるアミノ酸残基の酵素活性や安定性に及ぼす影響について解析している。またこれらの変異導入により酵素活性と安定性の向上した新規酵素を取得している。
- (6) 工業的大量生産を目指し、微生物培養時における温度と *nprM* 遺伝子発現との関係について詳細に解析している。また高温で培養することにより従来に比べ約2倍高い酵素生産性を達成している。

以上のように、本論文は微生物の産生する耐熱性中性プロテアーゼの構造、機能、遺伝子発現ならびにその生産方法に関して多くの知見を与えており、これらの成果は APM 合成用酵素を開発する上で有用性が極めて高く、応用生物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。