



Title	Structural and functional studies of subtilisin-like serine protease, Tk-SP, from <i>Thermococcus kodakaraensis</i> with β -jelly roll domain
Author(s)	Foophow, Tita
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27632
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	フバオチタ Foophow, Tita		
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)		
学 位 記 番 号	第 2 4 2 6 8 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 22 年 12 月 31 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻		
学 位 論 文 名	Structural and functional studies of subtilisin-like serine protease, Tk-SP, from <i>Thermococcus kodakaraensis</i> with β -jelly roll domain (β ジェリーロールドメインを持つサチライシン様セリンプロテアーゼ Tk-SP の構造と機能の解析)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金谷 茂則 (副査) 教 授 福井 希一 教 授 原島 俊 教 授 紀ノ岡正博 教 授 福崎英一郎 教 授 大竹 久夫 教 授 渡邊 肇 教 授 村中 俊哉 教 授 仁平 拓也 教 授 藤山 和仁		

論 文 内 容 の 要 旨

Tk-SP is a subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. To examine whether the enzymatic properties, maturation mechanism, and structure of Tk-SP are similar to those of Tk-subtilisin, which is another subtilisin homologue from the same organism, Tk-SP was overproduced in *E. coli* in a pro-form (Pro-Tk-SP), purified, matured, and structurally and functionally studied. Pro-Tk-SP consists of 640 amino acid residues and is overproduced in *E. coli* in a soluble form. Tk-SP is matured from Pro-Tk-SP upon autoprocessing and degradation of N- and C-propeptides. Tk-SP exhibits activity in gel assay in the absence of Ca^{2+} , suggesting that Tk-SP requires neither propeptide nor Ca^{2+} for folding. Tk-SP is highly active at alkaline pH even at 100°C and highly resistant to thermal and chemical denaturation as Tk-subtilisin is. Thus, Tk-SP has great potential for biotechnological application. The crystal structure of the active site mutant of Pro-Tk-SP, which lacks C-propeptide (ProN-Tk-S359A), has been determined at 2.0 Å resolution. The overall structure of ProN-Tk-S359A is similar to that of Pro-Tk-subtilisin, except that it contains the β -jelly roll domain at the C-terminus of the subtilisin domain and does not contain Ca^{2+} ions in the subtilisin domain. Two Ca^{2+} -binding sites were identified in the β -jelly roll domain. The β -jelly roll domain contributes to the hyperstabilization of Tk-SP only in a Ca^{2+} -bound form. Mutation of the catalytic residue, Ser³⁶⁹, to Cys was used to analyze the maturation process of Tk-SP because this mutation reduces the enzymatic activity of Tk-SP by ~2000 fold. The result shows that N-propeptide is autoprocessed first and the Pro-Tk-SP derivative lacking N-propeptide is an intermediate form of maturation process.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、サチライシンの一種である超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来サチライシン (Tk-SP) の酵素学的諸特性、X線結晶構造、成熟化機構について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論 3 章、および総括から構成されている。第一章 (序論) では、サチライシンは洗剤添加物など産業酵素として広く利用されていること、サチライシンはプロペプチドの自己切断および分解により成熟化すること、プロペプチドは活性阻害剤および分子内シャペロンとして働くことなど、これまで主として中温細菌由来サチライシンを用いて行われてきた研究の背景について触れ、本研究の目的と意義を述べている。第二章では、Tk-SP のプロ体 (Pro-Tk-SP, Ala¹-Gly⁶⁴⁰) を大腸菌で発現させ精製すると、Tk-SP は Pro-Tk-SP としてではなく、N 末端プロペプチド (ProN, Ala¹-Ala¹¹³) と C 末端プロペプチド (ProC, Asp³⁴⁰-Gly⁶⁴⁰) の除去された活性型の成熟体 (Tk-SP, Val¹¹⁴-Val⁵³⁹) として精製されることを明らかにしている。またこの成熟化は、片方のプロペプチドが付加した中間体を経て発現と同時に自己触媒的に進行することを明らかにしている。さらに、Tk-SP は至適温度 100°C、100°Cでの半減期 100 分と極めて高い耐熱性を示すこと、SDS、尿素、EDTA などの様々な界面活性剤や変性剤に対して高い安定性を示すことを明らかにしている。第三章では、ProN の付加した Tk-SP の活性中心変異体 (ProN-Tk-S359A) の結晶構造を決定することにより、ProN-Tk-S359A はプロペプチドドメイン、サチライシンドメイン、 β ジェリーロールドメインの 3 つのドメインから成ること、 β ジェリーロールドメインは中温細菌由来サチライシンやもう一つの *T. kodakaraensis* 由来サチライシンである Tk-subtilisin には存在しないこと、プロペプチドドメインとサチライシンドメインの構造は中温細菌由来サチライシンや Tk-subtilisin の構造と類似していること、などを明らかにしている。さらに、 β ジェリーロールドメインの欠損した Tk-SP 変異体 (Tk-SP Δ J) を構築し、その安定性や活性を解析することにより、 β ジェリーロールドメインは、Tk-SP のフォールディングや活性には必要ではないが、安定性に極めて重要であることを明らかにしている。第四章では、Pro-Tk-SP の活性中心残基 Ser³⁶⁹ を Cys に置換した変異体を構築し、その成熟化を解析することにより、Pro-Tk-SP の成熟化は N 末端プロペプチドの自己分解、ついで C 末端プロペプチドの自己分解の順に進行することを明らかにしている。第五章 (総括) では、本研究で得られた結果に基づき Tk-SP の安定化機構、成熟化機構について考察するとともに、産業酵素としての応用の可能性について展望している。

以上のように、本論文は超好熱古細菌由来 Tk-SP の構造、機能、安定化機構、成熟化機構に関して新たな知見を見いだした点で意義深い。また、本論文は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る。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。