



Title	グルコース脱水素酵素の構造と機能
Author(s)	牧野, 泰孝
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37005
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【3】

氏名・(本籍)	まさ 牧	の	やす 野	たか 泰	孝
学位の種類	工	学	博	士	
学位記番号	第	8839	号		
学位授与の日付	平成元年9月22日				
学位授与の要件	工学研究科 醸酵工学専攻 学位規則第5条第1項該当				
学位論文題目	グルコース脱水素酵素の構造と機能				
論文審査委員	(主査)	教授 岡田 弘輔			
	(副査)	教授 大嶋 泰治	教授 山田 靖宙	教授 高野 光男	
		教授 菅 健一	教授 二井 将光	教授 吉田 敏臣	
		教授 今中 忠行			

論文内容の要旨

グルコース脱水素酵素は、同一のプロトマーからなる4量体でNAD(P)を補酵素としてグルコースからグルコノラクトンへの酸化反応を触媒する。本酵素はアルカリ溶液中、また低イオン強度下で可逆的にプロトマーに解離することから、オリゴマー-蛋白質の解離会合を研究するモデルとして注目されている。

本研究では、グルコース脱水素酵素の構造と機能の相関を調べる目的で、化学変異剤による人工変異によって、低イオン強度下でも安定な変異酵素を作成し、変異酵素でのアミノ酸置換がどのような安定化効果を及ぼすかを検討している。

第1章では、*Bacillus megaterium* I AM1030の栄養細胞で、*B. megaterium* IWG3の孢子由来の酵素とは補酵素依存性の異なる酵素を見出し、両酵素を精製しその性質を比較している。

第2章では、グルコース脱水素酵素遺伝子のクローン化を行い、塩基配列の決定ならびに大腸菌内の遺伝子の発現について検討している。単離した遺伝子は261アミノ酸残基をコードしており、上流にはSD配列、下流には転写終結点と思われる配列が存在している。大腸菌内で遺伝子を発現させたところ、グルコース脱水素酵素の生産量は宿主菌の可溶性蛋白質の8%を占めることを報告している。

第3章ではクローン化した遺伝子に化学変異剤処理を行い人工変異を起させ、低イオン強度下で熱安定な酵素を作成している。結果12株の熱安定性酵素生産株を取得し、それらの遺伝子の塩基配列を決定し、8種類の熱安定化遺伝子を同定している。変異酵素は1ないし4アミノ酸置換を有しており、負電荷のアミノ酸が消失した例が多い。また置換位置は中央よりC末端側に偏っており、この傾向と酵素の安定化には何らかの関係があると推定している。

第4章では、熱安定化変異酵素のうち1アミノ酸置換をもつもの、E96A, E96G, Q252LとY253Cを精製し、野性型酵素と比較している。いずれの酵素も中性において野性型酵素より耐熱性であり、アルカリ性溶液中においても各酵素により差があるが野性型酵素より安定である。以上の結果より、変異酵素では、サブユニット間相互作用が強化されたと結論している。

論文の審査結果の要旨

本論文は *B. megaterium* のグルコース脱水素酵素をモデルとして蛋白質4次構造の強化が酵素の安定化に寄与することを証明したもので次のような重要な結果を得ている。

- (1) 従来 *Bacillus* 属細菌のグルコース脱水素酵素は孢子形成に伴うマーカー酵素と考えられて来たが、栄養細胞もグルコース脱水素酵素を生産しており、精製酵素の段階で同者を比較したこと。
- (2) *B. megaterium* I WG 3 からグルコース脱水素酵素遺伝子をクローン化し、その塩基配列を決定したこと、およびこの遺伝子を大腸菌内で発現させることに成功し、グルコース脱水素酵素の生産量を宿主菌の8%にまで高めたこと。
- (3) クローン化したグルコース脱水素酵素遺伝子を化学変異剤を用いて人工変異酵素を作成し、耐熱性の増加した酵素を取得している。特にその中の1酵素は20℃も耐熱性が増加したこと。
- (4) 変異酵素遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸置換の位置と種類を決定しているが、特定位置での負電荷の消失を伴うアミノ酸置換が多いと結論したこと。
- (5) 1アミノ酸置換を含む耐熱性向上酵素を精製しその性質を調べている。その結果グルコース脱水素酵素のサブユニット相互作用の強化が耐熱性を増大させたと結論していること。

以上の成果は、酵素学ならびに蛋白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。