



Title	Lactobacillus sp. No.1株由来の2種の金属プロテアーゼに関する研究
Author(s)	前田, 拓也
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38787
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	前田拓也
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 11351 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科醗酵工学専攻
学位論文名	<i>Lactobacillus</i> sp. No. 1 株由来の 2 種の金属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 山田 靖宙 教授 高野 光男 教授 菅 健一 教授 新名 惇彦 教授 卜部 格 教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣 教授 二井 将光

論文内容の要旨

本論文は、特殊な基質特異性を有するプロテアーゼを自然界からスクリーニングすること、そのプロテアーゼ構造遺伝子のクローニングと塩基配列決定、その発現制御機構の遺伝子レベルでの解明、さらにタンパク質工学的的手法によるプロテアーゼの基質特異性改変と基質特異性に関する基礎的知見を得ることを目的として行ったものである。

第 1 章では、環状ペプチド“グラミシジン S (GS)”を資化する新菌株 No.1 を分離し、これを *Lactobacillus* 属と同等するとともに、本株の生産する新規プロテアーゼ Mpr42 の精製と諸性質の検討を行っている。Mpr42 は、GS を L-Orn-L-Leu 間で切断し、分子量 42K、反応最適温度 45°C、最適 pH 5.5、45°C、30 分処理後約 70% の残存活性を示し、EDTA で阻害される金属プロテアーゼの一種であることを明らかにしている。また本酵素は、既報の例（サチライシン BPN', L-Val-L-Orn 間切断）と全く異なり、新規酵素であることを明らかにしている。

第 2 章では、No. 1 株のプロテアーゼ NprL の構造遺伝子を枯草菌の宿主ベクター系を用いてクローニングし、塩基配列（1,698塩基、566 アミノ酸）決定と酵素諸性質の検討を行っている。本酵素はプレプロ構造領域（249 残基）を有し、*Bacillus* 属細菌由来の中性プロテアーゼのアミノ酸配列と相同性が高く、機能部位残基を保存している。NprL は、分子量 37K、反応の最適温度 60°C、最適 pH 8.0、60°C、30 分処理後約 70% の残存活性を示し、EDTA で阻害される金属プロテアーゼである。種々のペプチド切断活性から、Leu, Phe 残基 N 末端に特異性が高く、Phe 残基に対してサーモライシンより特異性が高いことを明らかにしている。

第 3 章では、中性プロテアーゼ生産活性化因子 PreL の遺伝子塩基配列（1,272塩基、424 アミノ酸）を決定し、アミノ酸配列が *B. stearothermophilus* 由来中性プロテアーゼ活性化因子 NprA と 33% の相同性があり、DNA 結合ドメインを有し、標的となり得る DNA 配列回文構造が *nprL* 遺伝子と *preL* 遺伝子のプロモーター領域に存在することを示している。ノーザン解析で、PreL は NprL 発現を転写レベルで活性化し、また自己活性化も行っていることを示している。

第 4 章では、タンパク質工学的的手法でプロテアーゼの基質特異性改変を試みている。その際、設計基準として、①同一機能、異種起源酵素のアミノ酸配列と比較し、相同性の高い残基は極力置換しない。②立体構造をもとに酵素基質間相互作用に影響し得る残基を標的に選ぶ。③疎水度、容積変更に寄与するアミノ酸に置換する。を採用している。その結果、種々のペプチド切断活性から、L134V, Y152N, Y111W に変異導入の効果を認めている。反応条件を検討し、Y111W にて S/E=800 μg/U, 0°C, 60 分で、インスリン B 鎖の Gly-Phe 間のみを部位特異的に切断できるこ

とを確認している。

最後に、これらの結果と展望を総括している。

論文審査の結果の要旨

タンパク質工学の手法を用いて種々の酵素機能（触媒活性，安定性，pH 特性，基質特異性など）の改良が試みられ，多くの知見が蓄積されつつある。

本論文は，微生物由来のプロテアーゼを対象として，特殊な基質特異性をもつ酵素の取得法について検討し，自然界からのスクリーニング法とタンパク質工学的手法が有効であることを示している。また，基質特異性の異なった新規プロテアーゼの諸性質を明らかにすると共に，本酵素の効率的生産を目的としてその生産活性化因子の機能解析も行っている。これらの成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 環状ペプチド“グラミシジン S (GS)”を資化する新菌株を分離し，これを *Lactobacillus* 属と同一すると共に，本株の生産する新規プロテアーゼ Mpr42 の精製と諸性質の検討を行っている。
- (2) 新規中性プロテアーゼ遺伝子をクローニングし，その塩基配列を決定している。また，本酵素のアミノ酸配列が他の中性プロテアーゼと高い相同性を有するにもかかわらず，基質特異性が異なることを示している。
- (3) 酵素の効率的生産を行う上で，生産活性化因子の存在が不可欠であることを示し，その活性化因子の遺伝子構造や作用機構の解明を行っている。
- (4) 一定の設計基準に基づき，種々のアミノ酸残基を置換し，基質特異性が異なる変異型酵素を取得している。すなわち，タンパク質工学的にプロテアーゼの基質特異性を改変し得ることを示している。

以上のように，本論文は，プロテアーゼの基質特異性について種々の知見を得ただけでなく，基質特異性の人為的改変についても論じており，タンパク質工学ならびに応用生物学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。