



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Crystal Structure of Glucose Dehydrogenase from Bacillus megaterium IWG3 and Its Mutants of Enhanced Stability                                  |
| Author(s)    | 山本, 恵三  |
| Citation     | 大阪大学, 2001, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43167">https://hdl.handle.net/11094/43167</a>   |
| 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           | やまもと けい ぞう<br>山 本 恵 三   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 6 4 3 9 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 13 年 5 月 24 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     | Crystal Structure of Glucose Dehydrogenase from <i>Bacillus megaterium</i> IWG3 and Its Mutants of Enhanced Stability<br>( <i>Bacillus megaterium</i> IWG3 由来グルコース脱水素酵素および安定性が向上した変異型酵素の構造解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 ト 部 格   |
|               | (副査)<br>教 授 金谷 茂則 助教授 楠木 正巳 教 授 小林 昭雄<br>教 授 塩谷 捨明 教 授 原島 俊 教 授 福井 希一<br>教 授 室岡 義勝 教 授 吉田 敏臣  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、サブユニット間相互作用の強化によるオリゴマータンパク質の安定化の可能性を探るために、*Bacillus megaterium* IWG3 由来グルコース脱水素酵素および安定性が向上した変異型酵素の構造解析を行い、本酵素の安定性と安定化のメカニズムを構造の面から明らかにしたものであり、緒言、本論 3 章、総括からなる。

緒言では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第 1 章ではグルコース脱水素酵素 (GlcDH) の結晶化と、結晶学的性質について述べている。GlcDH の結晶化は蒸気拡散法で行っている。再現性よく結晶を得るためには、操作時の実験室内の湿度コントロールが重要であることを見いだしている。GlcDH の結晶は、空間群 C2 に 属することを示している。

第 2 章では野生型 GlcDH の 1.7 Å 分解能における構造解析について述べている。その結果、本酵素の構造は他の短鎖型脱水素酵素/還元酵素群に属する酵素に類似していることを示している。一般的に短鎖型脱水素酵素/還元酵素群に属する酵素はアルカリ性条件下で安定であるとされている。しかしながら、四量体を形成している境界面の 1 つにおいて、疎水性相互作用が弱いこととイオン結合が形成されていないことが、本酵素のみがアルカリ性条件下で四量体を維持できずに単量体に解離する原因であることを示している。

第 3 章では進化分子工学的手法によって得られた、1 アミノ酸置換で耐熱性、pH 安定性ともに向上した変異型酵素 (E96A、Q252L) のアルカリ性条件下での分子量決定と構造解析について述べている。変異型酵素はアルカリ性条件下で四量体 (E96A)、あるいは二量体 (Q252L) であり、サブユニット間相互作用が強化されたために全体に安定化したことを示している。また構造解析の結果、アミノ酸置換の生じた箇所はいずれも四量体の形成、維持に関与するサブユニット境界面に存在しないこと、および野生型酵素と変異型酵素の三次元構造はほとんど一致することを示している。これらの結果から、変異型酵素の安定化はサブユニット間相互作用の強化によるものであるが、それは非常に小さな構造変化により達成されたことを示している。

最後に、以上で得られた知見を総括し、サブユニット間相互作用の強化によるオリゴマータンパク質の安定化が可能であること、およびタンパク質の安定化に対する分子進化工学的手法の有用性について記述している。

## 論文審査の結果の要旨

酵素は本来不安定なものであり、その安定化のための研究は、酵素を理解し、改良するにあたっての中心的課題として位置付けられている。本論文は、サブユニット間相互作用の強化によるオリゴマータンパク質の安定化の可能性を探るために、*Bacillus megaterium* IWG3 由来グルコース脱水素酵素および安定性が向上した変異型酵素の構造解析を行い、本酵素の安定性と安定化のメカニズムを構造の面から明らかにしたものである。これらの成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) グルコース脱水素酵素 (GlcDH) を結晶化し、その結晶が空間群  $C2$  に属すること等の結晶学的性質を明らかにしている。
- (2) 野生型 GlcDH の  $1.7\text{\AA}$  分解能における構造解析を行い、本酵素の構造が他の短鎖型脱水素酵素/還元酵素群に属する酵素に類似しているが、四量体を形成している境界面の 1 つにおいて、疎水性相互作用が弱いことと、イオン結合が形成されていないことを明らかにし、その四量体構造の安定性に及ぼす影響について考察している。
- (3) 進化分子工学的手法によって得られた、1 アミノ酸置換で耐熱性、pH 安定性ともに向上した変異型酵素 (E96A、Q252L) がアルカリ条件下でも E96A は四量体、Q252L は二量体で存在しており、単量体になる野生型酵素に比べてサブユニット間相互作用が強化されていることを明らかにしている。
- (4) 両変異型酵素の結晶構造解析を行い、その構造が野生型酵素とほとんど同一であることを明らかにしている。
- (5) 以上の結果より、両変異型酵素の安定化が非常に小さな構造変化により達成されていると結論している。

以上のように、本論文は酵素の安定性と構造との相関関係について重要な知見を得ており、酵素工学ならびに進化分子工学の発展に寄与することが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。