The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	超好熱始原菌酵素と常温菌酵素の比較研究
Author(s)	古賀, 雄一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/432
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏　　名	古賀雄一（こが ゆういち）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　16432　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1項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学　位　論　文　名	**超好熱始原菌酵素と常温菌酵素の比較研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　金谷　茂則 （副査） 教　授　室岡　義勝　　教　授　宮田　幹二　　教　授　福住　俊一 教　授　柳田　祥三　　教　授　横山　正明　　教　授　高井　義造 教　授　梅野　正隆

論文内容の要旨

本論文では、超好熱始原菌と常温菌由来の glycerol kinase と subtilisin を比較研究し、好熱菌酵素の耐熱化機構の解析に適した超好熱菌酵素と常温菌酵素をペアとするシステムの構築について論じた。

序論では、酵素の構造機能相関、および酵素の耐熱性研究における背景について触れ、本研究の目的について述べた。

第1章では超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のグリセロールキナーゼ（GK）をコードする *Tk-glpK* 遺伝子のクローニング及び大腸菌内での発現を行った。この遺伝子の塩基配列から予測される本酵素（Tk-GK）のアミノ酸配列は、大腸菌由来 GK（Ec-GK）と57%の同一性を示した。Tk-GK を大腸菌から精製し、その特性の解析を行ったところ、Tk-GK は、その反応至適温度と残存活性から、Ec-GK と比べて極めて高い耐熱性酵素であることが明らかになった。そこで、Tk-GK の立体構造モデルを構築し Ec-GK の立体構造と比較したところ、Tk-GK においては分子表面のイオンペアが増強されていることが示唆され、これらのイオンペアが Tk-GK を安定化していることが示唆された。

第2章では第1章で見つかった Tk-GK に特異的なイオンペアを site-directed mutagenesis によって Ec-GK に導入して、その熱安定化効果を解析した。点変異によってイオンペアを導入した16種類の変異 Ec-GK を構築し、熱処理後の残存活性を野生型の Ec-GK と比較したところ、Thr196と Asn480へ変異を加えた Ec-GK は、わずかに安定化が認められた。1重変異酵素の個々の効果を生かしてより強い安定化効果を期待して、2重変異酵素 Ec-T196K/N480D を構築したが、不測の構造変化によって野生型よりも不安定化してしまった。この結果から、たとえ Tk-GK のアミノ酸配列を参考にしたとしても、Ec-GK の耐熱性を向上させる変異をデザインすることは大変難しいことが明らかになった。

第3章では DNA shuffling の特性を生かし、Tk-GK と Ec-GK のランダムなキメラ酵素を構築した。野生型の Ec-GK よりも耐熱性の向上したキメラ酵素を選別し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、Tk-GK のC末端領域に安定性に関与しているアミノ酸残基が局在している可能性が高いことがわかった。本章の研究から、単純に見比べただけではわからない、アミノ酸配列の安定化の可能性を突き止めることができた。以上の結果は、Tk-GK と Ec-GK をペアとして用いるシステムが超好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するのに大変適したシステムであることを示している。

第4章では、glycerol kinase を用いるシステム以外にも常温菌酵素とペアを組ませることにより、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するのに適したシステムを構築することが可能かどうかを調べる目的で、T.*kodakaraensis* KOD1 由来の subtilisin 型酵素（Tk-subtilisin）遺伝子のクローニング、組み換え蛋白質の発現、精製、特性解析について研究を行った。Tk-subtilisin の特性を解析したところ、熱処理に対する安定性が他と比べて非常に高かった。また、構造上の大きな特徴として、バクテリア型 subtilisin には見られない荷電残基の局在した挿入配列が見られていることから、これらの挿入配列が耐熱性に関与している可能性が考えられる。バクテリア由来 subtilisin（subtilisin E、BPN'、carlesberg 等）は、その構造や機能が良く研究されており、Tk-subtilisin はこれらの酵素と高い（約45%）相同性を示すので、Tk-subtilisin とこれらのバクテリア由来 subtilisin をペアとするシステムも、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するシステムとして大変有効であると考えられる。

以上の結果から、本研究では超好熱始原菌と常温菌の glycerol kinase や subtilisin をペアとする、好熱菌酵素の耐熱化機構解析システムを構築することに成功した。今後、X線結晶構造解析法、進化工学的手法、蛋白質工学的手法等を用いて、これらの酵素の耐熱化機構を総合的に解析することにより、蛋白質耐熱化機構に関して、有用な知見が得られるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、超好熱菌酵素と常温菌酵素の比較研究系を構築し、超好熱菌酵素の耐熱化機構を明らかにすることを目的として行われた結果、以下に示す知見を得ている。第1章では、分子表面のイオンペアが超好熱菌由来 glycerol kinase を安定化している可能性が有ることを示している。第2章では部位特異的変異法による個々の因子の安定性評価を行い、その問題点を明らかにしている。第3章では、問題点を解決する新たな方法として DNA shuffling 法を用いることにより、熱安定化に寄与するアミノ酸配列を同定している。第4章では、subtilisin を用いた比較研究系の有用性を示している。

以上のように、本論文は超好熱菌酵素と常温菌酵素の比較研究を行い、超好熱菌酵素の耐熱化機構を理解する上で有益な知見を与えるものであり、本論文は博士論文として価値あるものと認める。