The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Alterations of Structures and Functions of Useful Proteins : Cholesterol Oxidase and Human Metallothionein
Author(s)	外山, 光俊
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44246
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【9】

氏　　名	外山光俊（とやまみつとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学位記番号	第　17291　号
学位授与年月日	平成14年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Alterations of Structures and Functions of Useful Proteins : Cholesterol Oxidase and Human Metallothionein （有用な機能性タンパク質、コレステロールオキシダーゼ及びヒトメタロチオネインの構造と機能の改変）
論文審査委員	（主査） 教授　室岡　義勝 （副査） 教授　谷澤　克行　　教授　吉田　敏臣　　教授　仁平　卓也 教授　福井　希一　　教授　原島　　俊　　教授　小林　昭雄

論文内容の要旨

本論文は、工業的に有用なタンパク質の作成を目指して、タンパク質工学的手法を用いて2つの異なる機能を持つコレステロールオキシダーゼ及びメタロチオネインタンパク質の改変を行ったもので、緒論、本文5章及び総括より構成されている。

緒論では、タンパク質工学の重要性、標的としてコレステロールオキシダーゼ及びメタロチオネインを選んだ理由及びこれらのタンパク質の研究の歴史、特徴、利用価値を述べると共に、本研究の目的について述べた。

第1章では、活性部位と思われる周辺のアミノ酸残基を置換することによってコレステロールオキシダーゼの酸化及び異性化の一方の活性のみを有する酵素を作成した。また、これらの変異酵素の中には触媒活性の向上、野生型酵素では殆ど生成しない4-cholesten-6β-ol-3-oneを生成するものが含まれていた。

第2章では、基質およびFAD周辺のアミノ酸残基を部位特異的変異導入によって置換することによって、熱安定性の向上したコレステロールオキシダーゼの作成を試みた。この結果、salt-bridgeを形成するように設計した酵素において熱安定性が向上した。

第3章では、コレステロールオキシダーゼの基質特異性の変換について述べた。基質およびFAD周辺のアミノ酸残基を部位特異的変異導入によって置換したところ、基質周辺の大きな空間を埋めるように設計した酵素において、プレグネノロンに対する反応性が向上した。さらに、この変異酵素はコレステロールに対する親和性も向上した。

第4章では、多くの金属を結合するタンパク質であるヒトメタロチオネインに、金属結合部位を1つ追加した。金属結合部位になりうる部位の検索、変異をかけたときの構造の妥当性の確認、変異の導入、変異タンパク質の性質の確認を行った。この結果、変異タンパク質は1 molあたり8 molのCd^{2+}やZn^{2+}を結合するようになり、低pH領域における結合力も向上した。

第5章では、メタロチオネインをヒ素の除去に利用することを目的として、メタロチオネインとヒ素との結合について調べた。メタロチオネインは1 molあたりヒ素を少なくとも6 mol結合すること、また3つのCys残基が1つのヒ素と結合することを明らかとした。

総括では、本研究の成果、意義を要約し、問題点と今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

タンパク質工学の技術を用いて、酵素を主とする種々な機能性タンパク質の機能改変、改良が試みられてきた。その結果、今や酵素の構造と機能について多くのデーターが蓄積されつつある。それにもかかわらず、未だ自由にタンパク質を目的どおりに改変する理論構築には至っていない。そのためには、さらに多くの知見の蓄積が必要と思われる。本論文は、工業的に有用なタンパク質の作成を目指して、タンパク質工学手法を用いて２つの異なる機能を持つ有用タンパク質、１つは臨床検査に利用されている酵素であるコレステロールオキシダーゼを、いまひとつは生体内の重金属解毒タンパク質であるヒトメタロチオネインの改変を部位特異的変異により行っている。両タンパク質とも機能変換の可能性が高い改変部位をホモロジーモデリングによる３次構造予測に基づいて推定している。その結果、前者においては触媒反応の分割、熱安定性の向上および基質特異性の変換に成功している。後者においては、カドミウムなどの重金属を１原子多く結合できるように改変している。また、メタロチオネインの砒素結合量を初めて明らかにしている。

これらの成果の要約は、以下のとおりである。

(1)放線菌コレステロールオキシダーゼの３次構造予測から、活性部位と思われる周辺のアミノ酸残基を置換することによって、コレステロールオキシダーゼの持つ２つの触媒反応を分割し、酸化及び異性化の一方の活性のみを有する酵素の作成に成功している。また、触媒活性の向上、野生型酵素では殆ど生成しない 4-cholesten-6β-ol-3-one を生成する酵素の作成も行っている。

(2)放線菌コレステロールオキシダーゼの基質および FAD 周辺のアミノ酸残基を部位特異的変異導入により置換し、熱安定性の向上したコレステロールオキシダーゼの作成を試みている。その結果、ソルトブリッジを形成するように設計したタンパク質において熱安定性が向上した改良酵素を得ている。

(3)放線菌コレステロールオキシダーゼの基質特異性の変換を、基質および FAD 周辺のアミノ酸残基を置換することにより試みている。基質周辺の大きな空間を埋めるように設計した酵素において、プレグネノロンに対する反応性が向上した変異酵素を得ている。この変異酵素はコレステロールに対する親和性の向上も見られている。

(4)一方、金属を多数結合する機能性タンパク質であるヒトメタロチオネインに、金属結合部位を１つ追加している。３次構造予測により、金属結合部位になりうる部位の検索、変異をかけたときの構造の妥当性の確認を行い、それに沿って変異の導入、変異タンパク質の性質の確認を行っている。その結果、変異タンパク質は１分子あたり８原子の Cd^{2+} や Zn^{2+} を結合するようになり、低 pH 領域における結合力も向上している。多金属結合タンパク質において、金属結合量を増加させたのは初めてである。

(5)ヒトメタロチオネインが体内ヒ素の解毒に関与するかどうかを傍証するためおよび環境汚染砒素化合物の除去への応用を目的にして、ヒトメタロチオネインへのヒ素の結合量について調べている。メタロチオネインは１分子あたりヒ素を少なくとも６原子結合し、また３つのシステイン残基が１つのヒ素と結合することを初めて明らかにしている。

以上のように、本論文はホモロジーモデリングによる構造予測と部位特異的変異手法により、２つの有用な機能タンパク質の改良、改変を行い、機能の向上したタンパク質の取得に成功し、構造と機能の関連について幾つかの知見を得ている。これらはタンパク質工学、生物工学の発展に少なからず寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。