OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on characterization and functional modification of hyperthermostable metalloenzymes from archaeon Pyrococcus horikoshii
Author(s)	東, 紀子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48850
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

氏名	東（ひがし）　紀子（のりこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学位記番号	第　２２１０７　号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学位論文名	Studies on characterization and functional modification of hyperthermostable metalloenzymes from archaeon *Pyrococcus horikoshii* （アーケア *Pyrococcus horikoshii* 由来の超耐熱性金属酵素の特製解析と機能改変に関する研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　田谷　正仁 （副査） 教　授　久保井亮一　　教　授　實川浩一郎　　主任研究員　石川　一彦

論文内容の要旨

本論文では、*Pyrococcus horikoshii* 由来の超耐熱性酵素を対象として、大腸菌による大量発現系を適用することで、酵素機能のデザイン基盤となる酵素反応機構と反応特性解析および機能改変を行った。特に、補欠分子族として金属を含有し、産業応用上でも有用な２種の酵素、L-スレオニン脱水素酵素（TDH）およびアミノアシラーゼ（ACY）について、共通する方法論に基づき特性を検討した。

第１章では、取得した L-スレオニン脱水素酵素（PhTDH）の組み換え体を用い、反応速度論的解析を行い、速度論パラメーターの決定および反応機構予測を行った。PhTDH に含有される亜鉛原子は酵素の耐熱性に寄与することが明らかになった。65℃ での PhTDH の L-Thr および NAP^+ に対する Michaelis 定数（K_m）は他の生物由来の TDH と比較して高い親和性を示した。第２章では、PhTDH の単結晶化手法について記した。さらに、放射光を用いた構造解析を行い立体構造データを示した。第３章では、得られた立体構造情報を基に、触媒部位近傍のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、得られた変異体酵素の反応速度論解析から、Proton relay システムについて考察した。また、野生型に対し３倍の反応速度をもつ変異体の取得に成功した。

第４章では、*P. horikoshii* 由来アミノアシラーゼ（PhACY）の組み換え体酵素の生産・精製を実施した。本酵素は亜鉛含有金属酵素であることに特徴づけられ、基質特異性や反応速度論解析など酵素学的特性を明らかにした。さらに、ホモロジーモデリングによる立体構造予測から活性部位近傍の触媒活性に関与するアミノ酸残基の特定を行い、触媒機構について考察した。第５章では、PhACY 酵素の機能改変を目的として、酵素に含まれる Zn の除去、置換および金属イオン添加といった操作が酵素活性特性や構造安定性に及ぼす影響について検討した。

論文審査の結果の要旨

本論文では、*Pyrococcus horikoshii* 由来の超耐熱性酵素を対象として、まず L-スレオニン脱水素酵素（PhTDH）の組み換え体に関する反応速度論的解析を行い、速度論パラメーターの決定とそれに基づく反応機構予測を行った。

PhTDH に含有される Zn が酵素の耐熱性に重要であることを DSC の結果より明らかとした。PhTDH の L-Thr と NAD^+ に対する Michaelis 定数はそれぞれ 0.013、0.01 mM であり、他の TDH と比較して高い親和性を示した。次に、PhTDH タンパク質結晶の精密な構造解析を行った。得られた補酵素複合体結晶および他の生物由来の酵素との遺伝子相同性より、本酵素は Ordered Bi Bi 反応機構に従うものと推測した。さらに、上記の立体構造情報を基に、触媒部位近傍のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、変異体酵素の反応速度論解析から、PhTDH に関する作業仮説として、Proton relay システムを提案するとともに、152 位のグルタミン酸が触媒活性に重要な役割を担っていることを明らかにした。本酵素が属するアルコール脱水素酵素の触媒活性中心モデルを参考に、このアミノ酸残基をアスパラギン酸に置換したところ、野生型に対し 3 倍の活性をもつ変異体の取得に成功した。別の Zn 含有金属酵素として、*P. horikoshii* 由来アミノアシラーゼ（PhACY）に着目し、基質特異性や反応速度論解析など酵素学的特性を明らかにした。さらに、ホモロジーモデリングによる立体構造予測から活性部位近傍の触媒活性に関与するアミノ酸残基の特定を行い、触媒機構について考察した。さらに、PhACY 酵素の機能改変を目的として、酵素に含まれる Zn の除去、置換および反応系への金属イオン添加といった操作が酵素活性特性や構造安定性に及ぼす影響について検討した。その結果、Ni^{2+} や Mn^{2+} 置換は、酵素活性の向上や基質特異性の変化に対し著しい効果を示すことがわかった。また、過剰の Zn^{2+} の添加により、本酵素の熱安定性を顕著に向上させることに成功した。

以上、本論文は産業応用上有用な 2 種の金属酵素に焦点を当て、詳細な特性解析とその機能改変を行なったものであり、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。