

Title	Study of the acid-unfolding and refolding of microbial transglutaminase
Author(s)	鈴木, 基孝
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59462
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	鈴木基孝
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 25219 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Study of the acid-unfolding and refolding of microbial transglutaminase (微生物トランスグルタミナーゼの酸変性とリフォールディングに関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 佐藤 尚弘 教授 中川 敦史

論文内容の要旨

微生物トランスグルタミナーゼ (microbial transglutaminase; MTG) は蛋白質分子間にイソペプチド結合を導入する活性を有することよりソーセージや蒲鉾の加工成形の際に添加される場合が多く、食品酵素として日本やヨーロッパで広く利用されている。MTG の製造方法に関しては開発が進められており、その中でも E. coli 封入体からのリフォールディング (Yokoyama *et al.*, 2002, Protein Expr. Purif.), Corynex[®] による分泌発現 (Kikuchi *et al.*, 2003, Appl. Environ. Microbiol) などの微生物を利用した革新的な物質生産技術が産み出されてきた。しかし、物理化学測定を用いた MTG の蛋白質科学的な解析は詳細に行われていなかった。

本研究では pH 条件や塩濃度の影響による MTG および N 末端にプロ配列が付加された MTG(proMTG)の構造安定性評価と酸変性状態からのリフォールディング条件検討を行った。

蛍光測定、円二色性偏光 (CD) 測定、分析超遠心などの物理化学的測定を用い、中性及び酸性条件下での MTG の解析を行った結果、pH 4.0 で中間体を形成し、pH 2.0 で酸変性状態になることが分かった。また、pH 3.0 近傍で塩濃度を増加させると中間体が形成されやすいことも分かった。酸変性状態の MTG を pH 4.0 に滴定することリフォールディングできたが、活性回収率は 50%程度に留まった。

proMTG に関しても同様の解析を行った結果、MTG と比較して構造安定性が高いことが分かったが pH 2.0 の条件下で変性することが分かった。また、pH 2.0 の酸変性状態で塩濃度を増加させると、MTG の場合と同様、中間体が形成されやすいことが分かった。proMTG も酸変性状態から pH 4.0 に滴定することでほぼ完全にリフォールディングできることが、CD、酵素活性測定、NMR による解析から分かった。以上の結果より、プロ配列が付加されることで MTG の酸変性からのリフォールディングが促進されることが示された。

pH と塩濃度が MTG の構造安定性に与える影響を相関化することで、ステップワイズにリフォールディングする方法を見出すことができた。また、proMTG に関しても酸変性から pH 4.0

に滴定することで効率的にリフォールディングできることが分かった。さらに、一般的に困難と言われる NMR による蛋白質の構造解析に必要な重水素化蛋白質のコア領域の軽水への置換も、酸変性からのリフォールディングを用いれば簡便且つ容易に達成できることが分かった。このことより、酸変性からのリフォールディング技術を用いれば、MTG 程度の比較的大きな蛋白質 (分子量 30000 以上) の NMR による構造解析が促進される可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

微生物トランスグルタミナーゼ (microbial transglutaminase; MTG) は食品酵素として国内外で利用されている。大腸菌の封入体からのリフォールディングを用いた MTG の発現、プロ配列が付加された前駆体 (proMTG) の微生物分泌発現などの技術が開発されているが、物理化学的手法を用いた蛋白質科学的な解析は行われていない。本研究では、蛍光スペクトル、円二色性スペクトル、核磁気共鳴スペクトルなどを用いて、MTG、および proMTG の構造安定性、酸変性状態からのリフォールディングを研究した。

MTG は強い酸性条件下では酸変性するが、そこに高濃度の塩が存在すると中間的構造を形成することを明らかにした。酸変性からのリフォールディングさまざまな条件で検討した結果、低塩濃度において、pH を弱酸性に上げることによって比較的高いリフォールディング効率の達成できることを示した。

次に proMTG についても同様の酸変性実験、酸変性からのリフォールディングを調べた。proMTG は酸変性に対して、MTG よりも安定であったが、同様の構造転移を示した。他方、プロ配列が付加することにより proMTG のリフォールディング効率は極めて高かった。これを利用して一般には困難な proMTG の重水素反応を容易に行うことができた。

本論文では、331 アミノ酸残基からなる大きな球状蛋白質である MTG とその前駆体 proMTG の構造安定性を調べ、酸変性状態の構造物性とリフォールディングの機構をはじめ明らかにした。また、酸変性を利用した水素交換反応は、大きな蛋白質の核磁気共鳴研究に活用されることが期待できる新たな手法である。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。