Osaka University Knowledge Archive

Title	超好熱古細菌由来Tk-subtilisinの高温適応と成熟速度に関する研究
Author(s)	上原, 了
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59956
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【78】

氏　　名	上原　了（うえはら　りょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学　位　記　番　号	第　２６１４４　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学　位　論　文　名	**超好熱古細菌由来 Tk-subtilisin の高温適応と成熟速度に関する研究** Studies on the thermal adaptation and maturation rate of Tk-subtilisin from a hyperthermophilic archaeon
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金谷　茂則 （副査） 教　授　福住　俊一　　教　授　宮田　幹二　　教　授　菊地　和也 教　授　高井　義造　　教　授　伊東　一良　　教　授　渡部　平司 教　授　伊東　　忍　　教　授　兼松　泰男

論文内容の要旨

超好熱古細菌*Thermococcus kodakarensis*が分泌するTk-subtilisinは、高度な安定性を有する菌体外プロテアーゼであり、現存のプロテアーゼが抱える安定性の問題を克服する新規産業酵素として実用化が進んでいる。Tk-subtilisinはプロペプチドを含む不活性な前駆体として菌体外に分泌された後、カルシウムイオンの結合によるフォールディング、プロペプチドの自己切断と分解を経て成熟化することが明らかとなっている。本酵素は宿主が生育する高温環境において最も効率良く機能していると推測されるが、その構造や成熟化がどのようにして高温環境に適応してきたかは明らかではない。本研究では、Tk-subtilisinの構造と成熟化の高温適応機構を解明すること、また多様な環境においてTk-subtilisinを効率良く成熟化させるための手法を開発することを目的として研究を行った。第1章では、Tk-subtilisinに結合する7つのカルシウムイオン（Ca1-Ca7）がその構造と成熟化に果たす役割を解析した。その結果、Ca1、Ca6とCa7はTk-subtilisinの構造安定性に、Ca2-Ca5はそのフォールディングに寄与することが明らかとなった。Tk-subtilisinのカルシウム結合数は同酵素のファミリーでは最多であり、構造中のカルシウムイオンが異なる機能を持つことを本研究により初めて示した。第2章では、Tk-subtilisinに特異な挿入配列であるIS1が高温環境における成熟化に及ぼす影響を明らかにするため、その欠損変異体の成熟化を解析した。その結果、IS1はプロペプチド切断前のプロ体構造を特異的に安定化し、そのフォールディングとCa1サイトの形成に必要であることが明らかとなった。一次配列の保存性からこの挿入配列は一部の超好熱性古細菌のサチライシンが共通して獲得した高温環境への適応機構であることが提案された。第3章では、Tk-subtilisinのプロペプチドC末端のロイシンをプロリンへと置換することでその成熟化速度の改変を試みた。プロリンはTk-subtilisinの基質結合ポケットに対する親和性が最も低く、プロペプチドC末端のプロリン変異はその阻害能を低下させることでTk-subtilisinの成熟化を大幅に促進し、その結果低温における成熟化を可能にすることが明らかとなった。第1章から第3章までの研究成果により、超好熱性プロテアーゼの新奇な高温適応機構をはじめて明らかにし、更に高温環境とは異なる環境においても効率良く生産・運用するための新たな制御方法を提案した。本研究は、新規産業用プロテアーゼであるTk-subtilisinの生化学的特性の解明を行ったというだけでなく、その実用的な制御方法の提案を行ったという点で非常に意義深い。

論文審査の結果の要旨

本研究では、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* から菌体外に分泌されるプロテアーゼ Tk-subtilisin が宿主の生育する高温環境において機能するための構造と成熟化機構を明らかにし、その成熟化速度を理論的に制御する新たな手法を提案した。本研究内容は、超好熱菌由来プロテアーゼの高温環境への適応機構を初めて明らかにした点、また新規産業酵素である Tk-subtilisin の実用的な制御方法を提案した点において、学術・産業の両面において意義深い。第１章では、Tk-subtilisin に結合する Ca^{2+}を欠損させた変異体の構造、生化学的特性を解析することにより、Tk-subtilisin の７個の Ca^{2+}がフォールディングと熱安定性に対してそれぞれ異なる役割を持つことを明らかにした。これらの異なる役割を担う Ca^{2}を利用した Tk-subtilisin の新たな耐熱化機構を提案している。次いで、第２章では、Tk-subtilisin の持つ特異な挿入配列 IS1(Gly70-Pro82)について、その欠損変異体の成熟化における構造や熱安定性の変化を解析することにより、IS1 はプロ体の安定化に特異的に寄与し、Tk-subtilisin が高温環境で成熟化するために必要な配列であることを明らかにした。この挿入配列の保存性に基づき、高温環境に生育する古細菌のプロテアーゼが共通の戦略で環境に適応してきたことを提案している。さらに、第３章では、高い安定性と強い結合能を持つ Tk-subtilisin のプロペプチド（Tkpro）の C 末端に存在するロイシンを、Tk-subtilisin の結合部位に対する親和性が最も低いプロリンに置換することにより、本来高温でのみ速やかに起こる Tkpro の分解が促進され、Tk-subtilisin の成熟化が低温でも効率良く進むことを明らかにした。得られた変異体のプロペプチドの構造、生化学的特性の解析を行うことにより、Tkpro の C 末端への変異導入は、Tkpro の阻害機能のみを特異的に変化させて Tk-subtilisin の成熟化速度を制御するのに有効であること、また基質特異性という既知の情報に基づいて予測することが可能な成熟化速度改変の手法であることを提案している。第１章から第３章までの研究成果により、Tk-subtilisin の高温環境への適応機構を解明し、高温環境とは異なる環境においても Tk-subtilisin を効率良く生産・利用するための新たな制御方法を提案した。

以上のように、本論文は、これまで研究例のない超好熱由来プロテアーゼの構造と成熟化の高温環境への適応機構を明らかにした上で、その特徴的な成熟化を理論的に制御し、より効率的に利用するための実用的な手法を提案している。超耐熱性プロテアーゼという特徴を活かして、高温で Tk-subtilisin による異常プリオン蛋白質の分解を行う新規医療用洗剤の開発が現在進んでいるが、今回提案した成熟化速度の制御方法は、どのような使用環境においても Tk-subtilisin を効率良く生産・利用することを可能にするので、本酵素の産業酵素としての利用範囲をより拡大することに貢献したと考えられる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。