

氏名(本籍)	伊藤良樹(東京都)
学位の種類	理学博士
学位記番号	博甲第844号
学位授与年月日	平成3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on the processing of exported proteins in <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌における分泌タンパク質のプロセッシングに関する遺伝生化学的研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男
副査	筑波大学教授 理学博士 柳 沢 嘉 一 郎
副査	筑波大学教授 理学博士 平 林 民 雄
副査	筑波大学助教授 農学博士 田 仲 可 昌

### 論 文 の 要 旨

生物が生命活動を維持していくためにはタンパク質がその機能を正しく発現しなくてはならない。そのためには各々のタンパク質が機能する場所に輸送される局在化という段階と、それが活性化され、成熟型タンパク質になるマチュレーションという段階を正しく受ける必要がある。

タンパク質の中にはマチュレーションの過程でプロテアーゼによる限定分解を受けるプロ構造を持つ前駆体として合成されるものがある。プロ構造を持つタンパク質は細菌から高等哺乳動物にいたるまで広く知られている。枯草菌をはじめとするグラム陽性細菌にもこのようなプロ構造をもつ前駆体として合成されるタンパク質が数多く知られ、プロ構造のプロセッシングを解析するための有効な系であると考えられる。そこで、グラム陽性細菌中最も遺伝的解析が進んでいる枯草菌を材料にその分泌タンパク質のプロセッシングを解析した。

枯草菌における分泌タンパク質のプロセッシングやプロ構造の分泌に与える影響を解析するために、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナルペプチドと成熟型耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼの間にpBR322DNA由来のペプチドを挿入した融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼおよび枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼを指標酵素として利用した。

融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを枯草菌、大腸菌で発現させたところpBR322DNA由来のペプチドの挿入によりほとんどの場合分泌量が低下した。しかし21アミノ酸から成るペプチドの挿入を受けた融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを枯草菌で発現させた場合親株の1.7倍に分泌量が増加した。これよりプロ構造の改変により分泌量を増大させ得る可能性が示唆された。枯草菌、大腸菌により分泌された耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼの分子量及びN末端付近のアミノ酸配列を解析した結果、融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼは大腸菌ではプロセッシングされないが枯草菌では正しくプロセッシングされ成熟型酵素になることが示さ

れた。枯草菌におけるこのプロセッシングに関与している酵素を調べるために大腸菌よりプロセッシングをうけていない融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを純化し、それを基質として *in vitro* で解析した。その結果融合耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼのプロセッシングに関与しているのは枯草菌アルカリ性プロテアーゼであることが明らかとなった。一方、枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼの場合も、アルカリ性プロテアーゼがプロセッシングに関与していたが、アルカリ性プロテアーゼ単独では成熟型より2アミノ酸長い中間体までしかプロセッシングされず他のプロテアーゼの関与も示唆された。またプロセッシングの反応条件の検討から枯草菌におけるタンパク質のプロセッシングはプロ構造のアミノ酸配列よりも、基質の立体構造を認識しておこることが示唆された。これらの結果をもとにして、枯草菌における分泌タンパク質のプロセッシングのモデルを提唱した。

## 審 査 の 要 旨

本研究は分泌されたタンパク質のプロセッシングに基質特異性をほとんど示さないプロテアーゼが関係していること、またプロセッシングを受ける際にタンパク質の立体構造が重要な因子となっていることを遺伝生化学的に明らかにした。この結果はタンパク質の局在化およびプロセッシングの研究の中で新しい発見であり、極めて高く評価されるものである。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。