

氏名(本籍)	やすぎまさこ 安木 聖子 (鳥取県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2546号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Cold Adaptation of a Thermostable Enzyme, 3-Isopropylmalate Dehydrogenase (耐熱性3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温適応)
主査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一

論文の内容の要旨

酵素の活性を上昇させることはタンパク質工学の大きな目的の1つである。特に、高い耐久性をもった酵素は通常低温では非常に低い活性しか示さない。よって、耐熱性酵素を低温で抗活性化させることは、酵素の取り扱いが容易になり応用面にも有用である。しかし、低温高活性化と構造との相関はほとんど理解されていないため、低温高活性化した変異酵素を設計することは現状では困難である。一方、進化分子工学的手法は、標的酵素の立体構造の情報がなくても目的の性質を持った変異酵素を入手できる利点がある。この手法は標的酵素遺伝子にランダム変異を導入し、目的の性質を持った変異酵素を然るべき系を用いて単離する方法である。

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の耐熱性酵素、3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) を出発材料とし、低温で高活性化とした変異酵素、低温適応型変異酵素を進化分子工学的手法を用いて選択する方法が既に開発されており、IPMDH 遺伝子を欠損した大腸菌ゲノムに好熱菌 IPMDH 遺伝子をインテグレートした株を用い、選択培地上で低温高活性化した変異株を選択した例が報告されている。解析された変異酵素は40℃で高活性化しており、これらの低温適応型変異酵素には、kcatが上昇したkcat改良型変異酵素と、Kmが低下したKm改良型変異酵素の2種の機構が見られた。またこれらの変異酵素は野生型酵素の耐熱性をほとんど損なっていなかった。

本研究ではまず、プラスミドを用いた新たな選択系を用い、さらに低温30℃で低温適応型変異酵素を多数選択することに成功した。この選択系はエラープローンPCRを用いて変異を導入するため、報告されている例と比べ操作が簡単で変異導入効率を容易に設定でき、目的遺伝子のみに変異を導入できる。解析した5つの変異酵素には、既知の変異酵素同様2種の低温高活性化機構がみられた。常温生物である大腸菌由来のIPMDHとの比較から、kcat改良型変異酵素では酵素反応の補酵素結合状態が大腸菌並に不安定化することによりkcatが上昇したこと、Km改良型変異酵素では遷移状態が安定化し、大腸菌に近づいたことによってkcat/Kmが上昇したことが明らかとなった。Km改良型変異酵素の高活性化機構について詳細に解析したのは本研究が初めてである。またこれらの変異酵素は、野生型酵素の耐熱性を保持していた。

次に、kcat改良型変異酵素の低温高活性化機構を詳細に解明するため、低温でkcatが最も上昇したV126M変異酵素に着目し、126番目のアミノ酸算基を他の9種のアミノ酸に置換したV126変異酵素の作製と解析を行った。酵素反応の熱力学的解析から、この変異酵素では置換したアミノ酸の体積に相関して、補酵素結合状態が不安定化

していることが明らかとなった。すなわち、アミノ酸の体積の増加によって補酵素結合部位の構造がゆがめられ、補酵素結合状態が不安定化されたことが k_{cat} の上昇の原因であると推定した。

最後に、低温適応型変異の組み合わせの効果を検討した。これまでに低温での選択系により得られた低温適応型変異酵素には、酵素反応の遷移状態が大腸菌並に安定化したものはなかった。そこで既に報告されている変異部位を組み合わせで多重変異酵素を作製し、耐熱性への影響と、遷移状態が大腸菌並に安定化した変異酵素が得られるかどうかを解析した。その結果、耐熱化変異部位 I11V を他の変異部位と組み合わせることで、さらに耐熱化した変異酵素が得られたことが分かった。しかし活性については、組み合わせによって親酵素より遷移状態が安定化した変異酵素は得られなかった。耐熱化とは異なり、高活性化には微妙な構造変化による fine tuning が必要であり、親変異酵素が選択された時点でそれらの構造がかなり最適化されており、変異部位を組み合わせることでさらなる高活性化をすることは難しいことが予想された。

本研究から、耐熱性を保持した低温適応型変異酵素を効率的に選択することができることが示された。また、変異酵素の低温高活性化機構を熱力学的に解析した初めての例を示した。そこから、活性は構造の微妙な変化に影響され、低温高活性化には補酵素結合部位の構造変化が関わっていることが推定された。

審査の結果の要旨

酵素の高活性化はタンパク質工学の大きな目的の1つである。特に耐熱性酵素は低温での活性が低いので、その低温高活性化は応用面にも有用である。しかし低温高活性化した変異酵素の理論的設計は現状では困難である。そこで著者の所属する研究グループでは、進化分子工学的手法を用い、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を出発材料とし、低温で高活性化した低温適応型変異酵素を選択した。この手法では、標的タンパクの立体構造の情報がなくとも目的の性質を持った変異酵素を入手できる利点がある。またこの方法ではインテグレーションベクター系を用いられたが、本研究で、著者はプラスミドを用いた新たな選択系を構築し、30℃での低温適応型変異酵素を多数選択することに成功した。解析した5つの変異酵素には、2種の低温高活性化機構がみられた。すなわち酵素反応の補酵素結合状態が大腸菌並に不安定化することにより k_{cat} が上昇した k_{cat} 改良型と、遷移状態が安定化して K_m が低下したことにより k_{cat}/K_m が上昇した K_m 改良型の2つの機構である。

次に、 k_{cat} 改良型変異酵素の低温高活性化機構を詳細に解明するため、126番目のアミノ酸残基を変異させたいくつかの酵素を作製、解析した。この変異酵素は、置換したアミノ酸の体積に相関して酵素反応の補酵素結合状態が不安定化していた。よってアミノ酸の体積の増加により補酵素結合部位の構造がゆがめられ、補酵素結合状態が不安定化したことが高活性化の原因であることが推定された。

さらに、初期に得られた変異を組み合わせで多重変異酵素を作製し、低温活性と耐熱性への影響を解析した。その結果、耐熱化変異 I11V を他の変異部位と組み合わせることで、さらに耐熱化した変異酵素が得られた。しかし活性上昇変異どうしを組み合わせることによって親酵素より酵素反応の遷移状態が安定化したものは得られなかった。低温高活性化には耐熱化より微妙な構造の最適化が必要であり、変異部位の組み合わせによるさらなる低温高活性化は難しいことが分かった。

本研究から、耐熱性を保持した低温適応型変異酵素を効率的に選択できることを示した。また、変異酵素の低温高活性化機構を熱力学的に解析した初めての例を示し、さらに、低温高活性化に関わるいくつかの新しい知見を得ている。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。