

氏名(本籍)	まえ はら とも こ (広島県) 前 原 智 子 (広島県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4675 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		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b><i>Thermus thermophilus</i> HB27 株の推定 Lon protease の機能解析</b>		
主 査	筑波大学教授	農学博士	星 野 貴 行
副 査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副 査	筑波大学准教授	博士(農学)	中 村 顕
副 査	筑波大学准教授	博士(農学)	高 谷 直 樹

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株の宿主・ベクター系を利用した異種遺伝子発現では、大腸菌などの常温菌を宿主とした場合には発現が確認できなかった遺伝子の発現にも成功しているが、概して異種タンパク質の生産量が低いことが問題点であった。この原因の一つとして、宿主プロテアーゼによる産物の分解が考えられた。そこで本研究では、*T. thermophilus* HB27 株のゲノム上で Lon protease (ATP-dependent protease La) とアノテートされていた 3 つの遺伝子 *TTC0418*, *TTC0746*, *TTC1975* に着目し、その機能解析を行うと共に、これら遺伝子の破壊株を宿主とした異種遺伝子発現について検討した。

#### (1) *TTC0418*, *TTC0746*, *TTC1975* の酵素学的解析

*TTC0418*, *TTC0746*, *TTC1975* のアミノ酸配列を基に系統解析を行ったところ、*TTC0418* 及び *TTC0746* は Bacterial LonA-type Lon protease に分類され、Lon protease で保存されているドメイン構造を全て有しているのに対して、*TTC1975* は Lon protease の C 末端側の protease domain とのみ相同性を示し、今まで機能解析の例がない“Bacterial LonB-like ATP-dependent protease”に分類されることを明らかにした。これら 3 つの酵素を大腸菌を宿主として発現・生産し、精製酵素を用いて酵素学的性質を検討した結果、*TTC0418*, *TTC0746* は共に ATP 依存性、ATPase 活性を示す Lon protease であるが、その基質特異性は異なり、*TTC0418* は低分子ペプチドに、*TTC0746* はカゼインに対して特異性を示す事を明らかにした。さらに *TTC1975* は、プロテアーゼ活性は有しているが ATP 依存性を示さず、Lon protease には分類されないことを明らかにした。

#### (2) *TTC0418*, *TTC0746*, *TTC1975* の生理学的解析

*TTC0418*, *TTC0746*, *TTC1975* の各遺伝子破壊株及び二重破壊株を作製し、栄養培地 (TM), 最少培地 (MM) での生育、さらに TM から MM への移行に伴う栄養飢餓 (nutritional downshift) の際の生育を観察した。その結果、*TTC0418* と *TTC0746* の二重破壊株でのみ、MM 培地での生育が悪化し、かつ nutritional downshift 時の生育も著しく悪化した。0.2% カザミノ酸の添加により nutritional downshift 時の生育が回復したことから、*TTC0418*, *TTC0746* は共にアミノ酸飢餓時にアミノ酸を供給する役割を担っていることが考えられた。この結果は *E. coli* Lon 破壊株で見られる結果と同様であった。また、TM 培地中で高温 (78°C) で培養した

場合、TTC0418 破壊株で生育の悪化が認められ、高温での正常な生育に TTC0418 が必要であることが示された。

### (3) 異種遺伝子発現系への lon 破壊株の利用

最後に TTC0418, TTC0746, TTC1975 の各遺伝子の破壊が、異種遺伝子産物の生産に与える影響を検討した。異種遺伝子には *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来  $\alpha$ -mannosidase, threonine dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, *Geobacillus stearothermophilus* 由来  $\alpha$ -amylase 遺伝子を用いた。TTC0746 破壊株では、野生株と比較して特に  $\alpha$ -mannosidase 及び  $\alpha$ -amylase の生産量が約 2 倍に上昇することが確認されたが、TTC0418, TTC1975 破壊株では異種タンパク質の生産量の増加は認められなかった。この結果は、TTC0746 がカゼインのような大きな基質に対して特異性を示すことと一致していた。また、HB27 株由来の  $\beta$ -glycosidase 遺伝子を各一重破壊株へ導入した場合には、その生産量は野生株と各破壊株の間で差は認められなかったことから、TTC0746 は外来遺伝子産物の分解に対して機能していると考えられた。

以上のように、本論文では、*T. thermophilus* HB27 株の持つ 3 種の推定 Lon protease について、酵素学および生理学的解析を行い、それらの機能を明らかにするとともに、HB27 株を宿主とした異種遺伝子産物の生産の改善に TTC0746 の欠損が有効であることを明らかにした。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

以前の研究から、TTC0418 が Lon protease としての機能を有していることは明らかになっていたものの、本論文で TTC0746 も Lon protease に分類されること、並びに両者の機能的な差異を明らかにしたことは、学術的に重要である。また、今までに解析例のない“Bacterial LonB-like ATP-dependent protease”に分類される TTC1975 が、Lon protease としての特徴を有していないプロテアーゼであることを明らかにしたことも学術的に価値がある。さらに、TTC0746 欠損変異が HB27 株を宿主とした異種タンパク質生産の改善に有効であることを明らかにした点は、今後の HB27 株の宿主・ベクター系の改良の上で重要である。

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。