

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名

玉越雅忠

本論文は、酵素を進化分子工学的手法により耐熱化することを目的として、高度好熱菌を宿主とした酵素の耐熱化実験系を開発し、それを用いて多くの耐熱化変異酵素を取得した結果について述べたものである。

第1章では、本研究の背景を述べた。まず高次構造に基づいて人為的にアミノ酸置換を行い酵素を安定化する従来の手法を述べ、その問題点を指摘した。それを克服するためには進化分子工学の手法が有望であり、その先駆的な研究として中等度好熱菌を用いた酵素の耐熱化実験系を紹介した。その実験系には改良の余地が大いにあるため、耐熱化実験系の宿主として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* がより適していることを述べた。またモデルとした酵素、3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（以下 IPMDH）を選んだ理由について述べた。

第2章では、*T. thermophilus* のロイシン合成系オペロンの塩基配列解析と大腸菌の変異株を用いた相補試験を行い、*T. thermophilus* のロイシン合成系遺伝子の配置を確定した。IPMDH はロイシン合成に関わる酵素であるが、以前からその遺伝子の機能上重要な部分が他の遺伝子とオーバーラップしている可能性が指摘されていた。しかし本章の結果からはその可能性が否定され、かつオペロンの構造が明らかになったので、IPMDH を *T. thermophilus* 内で発現させるためのベクターを開発することが可能になった。

第3章では、*T. thermophilus* のインテグレーションベクター系の開発と、それを用いてキメラ酵素（好熱菌 IPMDH と常温菌 IPMDH との間のキメラ酵素）を耐熱化した結果を述べた。すなわち、ノックアウトベクターを用いて IPMDH の遺伝子を染色体から完全に欠失させた *T. thermophilus* の変異株を作製し、次いでインテグレーションベクターを用いてキメラ酵素を *T. thermophilus* 内で発現させた。得られた形質転換株は培地中にロイシンがない場合、キメラ酵素の耐熱性が低いために 76℃以上では生育できなかったが、自然に起きる突然変異によって 76℃以上でも生育できるような株を2株得た。塩基配列を解析したところ、それぞれ別々の変異が起きていた。熱処理後の残存活性を指標として耐熱性を調べたところ、両酵素とも元のキメラ酵素よりも耐熱化していることを確かめた。立体構造の解析から、側鎖内の高いエネルギー状態を解消するか、あるいは分子内部の疎水性パッキングを高めることによって耐熱化したことが推定された。

第4章では、*T. thermophilus* のプラスミドベクター系の開発と、それを用いた酵母 IPMDH の耐熱化について述べた。すなわち酵母 IPMDH を発現する *T. thermophilus* の形質転換株は、培地中にロイシンがない場合 50℃程度まで生育できたが、それを出発として、60、62、65、67、および 70℃でも生育できるようになった株を自然に起きる突然変異によって段階的に得た。それらの IPMDH 遺伝子の塩基配列を解析したところ、選択温度が上昇するにつれてアミノ酸変異が 1 つずつ蓄積していった。精製酵素を用いて耐熱性を調べたところ、どの変異酵素も酵母の野生型 IPMDH より耐熱性が上昇しており、かつ選択温度が上昇するにつれて耐熱性も上がっていることがわかった。また、酵母の野生型 IPMDH は室温付近でもグリセロールなどの保護剤がないと急速に失活することが知られていたが、得られた耐熱化酵素は全て保護剤がなくても活性を維持できることがわかった。

第5章では、IPMDH 以外の多くの酵素を耐熱化できるように *T. thermophilus* の宿主・ベクター系を改良した結果について述べた。まず形質転換の際のマーカースとして、新たにピリミジン合成に関わる *pyrE* 遺伝子(オロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする)をマーカースとするベクター系を構築した。*pyrE* 遺伝子の欠損株は薬剤である 5-フルオロオロチン酸(5-FOA)耐性になることを利用して、ノックアウトベクターを用いて *pyrE* 遺伝子欠失株を作製した。同様に *pyrE* 遺伝子をマーカースとしたベクターを用いて他の遺伝子の欠失株を容易に選択する実験系を確立した。さらにプラスミドベクターが好熱菌内で安定に保持されるように組換え能欠損株を単離した。

第6章では、本研究で得られた耐熱化変異の特徴をまとめ、酵素を耐熱化するためのメカニズムを考察した。特に従来の安定化ルールでは説明できない新しいタイプの耐熱化戦略を発見した。また今後の進化分子工学の展望や問題点を述べた。具体的には、変異導入の効率やブロック単位での変異導入に関する問題、および耐熱化酵素を得るための新しい選択技術について述べた。

第7章では、各章で用いた材料と方法について述べた。

以上、本論文は高度好熱菌を用いた酵素の耐熱化実験系を開発し、その有用性を明らかにしたものである。これは、蛋白質を安定化し、その優れた特質を多方面で利用するための技術開発に貢献するものであり、基礎科学のみならず工学的にも資するところが大きい。よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。