

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 横山 敬一

本論文は、食品加工分野で広範に使用されているトランスグルタミナーゼ（以下 TGase）という酵素に関する研究で、序論、本論（3章）、総括と展望から構成されている。

序論では、研究の背景を述べている。TGase は、ポリペプチド鎖中の Gln 残基の γ -カルボキシアミド基と各種一級アミン間のアシル転移反応を触媒する酵素である。タンパク質中の Lys 残基の ϵ -アミノ基も一級アミンとして作用し、タンパク質分子内、および分子間で ϵ - (γ -Glu) Lys 架橋結合を形成することにより、タンパク質が架橋重合化し、食品などの物性変化や接着などの現象が起こる。TGase は、脳、肝臓、腎臓、表皮、血液等といった動物の諸組織、血液細胞及び血漿等に広範に存在し、様々な生命現象に関与していることもわかっているが、生理的な役割については未解明な部分が多い。

味の素(株)及び天野エンザイム(株)の共同研究グループは、TGase 活性を有する微生物を探索し、その産生菌を発見し、醗酵生産法によって量産化することに成功した。微生物起源 TGase（以下 MTGase）の発見は、実用的なコストでこの酵素を食品加工などに利用可能にする画期的なものであった。MTGase が反応することができるタンパク質は、動物由来 TGase に比べ、非常に広範囲のものであった。基質特異性の広さが、MTGase の特徴であり、広範な食品タンパク質に適用可能であった。

味の素(株)グループでは、さらに、自然界より新規な TGase を探索した。その中でマダイ肝臓由来 TGase (FTGase) は、他の動物由来 TGase と類似していることから、動物由来 TGase のモデルとして構造、機能相関研究に使用できると考えられた。FTGase、MTGase は、基質特異性等が異なり、TGase の構造と機能の関連性を研究する材料として最適であると思われた。

以上のような背景から、TGase の構造、機能相関を解明することを目的として研究を開始した。

第1章においては、マダイ肝臓由来 TGase (FTGase) の高発現系の構築について述べた。大腸菌菌体内に分子シャペロン DnaJ を共発現させることにより、FTGase を菌体内に可溶性の形で高

発現させることに成功した。大腸菌分子シャペロンのうち、DnaK と GroEL が過剰発現した異種タンパク質のフォールディングに重要な機能を果たしていることは既に知られていたが、DnaJ については初めての知見である。DnaJ は、ポリペプチドの凝集を防ぎ、TGase のタンパク質を可溶化するのに主要な役割を果たしていると考えられた。

第2章においては、微生物（放線菌）由来 TGase (MTGase) の高発現系の構築について述べた。MTGase は、大腸菌発現用に遺伝子の全合成を行うことにより、成熟型 MTGase の配列を持つ不溶性顆粒の形で大腸菌内に高発現させることに成功した。リフォールディングした MTGase は、天然型 MTGase と同等の比活性を持つことを示すことができたが、希釈でのタンパク質回収率は低く、さらなるリフォールディング条件の探索が必要と考えられた。

第3章においては、大腸菌内で不溶性顆粒の形で大量発生した MTGase を効率的にリフォールディングする方法を確立した。効率的なリフォールディングを行うためには、酸性で希釈を行い、溶解度の高い状態（リフォールディング中間体）を経由させることが重要であった。

リフォールディングのポイントは、酸性で希釈し保持することによって中間体を形成させることであったが、この中間体は、天然構造とは異なること、pH をシフトしないと天然構造へと移行しないこと、天然構造を酸性にしてもこの構造にはならないことから、リフォールディング中間体であると結論付けた。この中間体は、天然構造の約 35%の活性を持ち、CD による解析により、2次構造は天然構造とほぼ同じで3次構造に違いが見られること、超遠心による沈降速度実験で、この中間体は、天然構造より膨張した構造をとっていることを明らかにした。この中間体は典型的なモルテングロビュール状態をとっているリフォールディング中間体であると考えられた。

本研究を通して得られた結果を基に、現在、TGase の構造、機能関連の解明研究が進められており、いずれ、改変型 TGase の創出による TGase の機能拡大、食品以外への TGase の用途拡大に資するようになると考えられた。

以上、本論文は、食品加工分野で広範に使用されている TGase に関して、その大量発現法、さらには活性型タンパク質のリフォールディング法を確立することにより、食品およびそれ以外への新たな用途拡大への道を切り開いたものであり、学術的および産業応用的に貢献するところが多い。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。