

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加茂昌之

本論文は、第一章序論、第二章 *Thermus thermophilus* HB8 株由来 peptide deformylase の結晶構造解析、第三章 NaCl によって誘起される thermolysin の活性化機構の解明、第四章総合考察よりなり、二つの金属プロテアーゼを材料として X 線結晶構造解析により、耐熱性獲得メカニズムと活性発現機構を分子レベルで解明している。

第一章の序論では、プロテアーゼの分類や生理的重要性について記述し、アミノ酸配列上の特徴からの金属プロテアーゼファミリーの分類ならびに活性発現機構について詳細に述べている。

第二章では *Thermus thermophilus* HB8 株由来 peptide deformylase について、耐熱性を付与する立体構造上の特徴を解析している。筆者はまず、大腸菌での大量発現系を構築し電気泳動上均一になるまで精製を行っている。次に高分解能で結晶構造を決定し、耐熱性を有しない構造既知の大腸菌由来酵素との構造比較を行い、C 末端のヘリックス部分の構造が異なっていることを明らかにしている。大腸菌由来酵素においては、この部分は溶液中で二次構造を形成していないことがすでに示されていることを述べ、両者の詳細な構造比較を行っている。*Thermus thermophilus* 由来酵素においては、アミノ酸組成の特徴、溶媒露出表面積、水素結合の数は大腸菌由来酵素に代表される常温菌由来酵素と比べて顕著な変化は認められなかったが、*Thermus* 由来酵素に代表される好熱菌由来酵素においてはイオン結合の数が顕著に増加していること、大腸菌由来酵素には認められない幾つかの因子により C 末端ヘリックスが安定化されていることを述べ、また、両者の酵素活性の温度依存性、示差走査熱量計による解析結果から両酵素は耐熱性ならびに、熱変性プロファイルが大きく異なることを示した。以上の結果に基づいて、耐熱性を付与する立体構造上の因子について明確に示している。

第三章では NaCl により顕著に活性化される thermolysin について、その構造変化を X 線結晶構造解析により明らかにしている。thermolysin 結晶は NaCl の濃度変化による溶解度の変化や浸透圧の変化に敏感であり、thermolysin 結晶をそのまま、高濃度の NaCl 溶液にさらすと結晶が崩壊してしまい、回折データの収集に至らなかったが、筆者はここで、独創的な方法を開発し高濃度の NaCl を thermolysin 結晶中に安定に導入することに成功したことを述べている。筆者はその方法を用いることにより、4 M NaCl 存在下の結晶構造を決定した。構造解析の結果、NaCl の添加により、NaCl 非存在下では揺らいでいた活性部位の Tyr のコンホメーションが固定されること、この構造変化により活性部位の立体障害が解消されることを明らかにした。この Tyr の側鎖と基質との疎水性相互作用により遷移状態が安定化され、その結果として k_{cat} が増加したことを示唆している。また、NaCl 溶液中での活性を担う水分子の pK_a の変化についても、活性部位の亜鉛イオンへの塩化物イオンの結合が観察されたことから、塩化物イオンの

結合が亜鉛イオンの電子状態を変化させ、水分子を分極させる能力が低くなった結果、水分子の pK_a を上昇させた可能性を示唆している。第四章では本研究の総括を行い、酵素の耐熱性の獲得と食塩による活性の上昇について考察している。

以上、本論文は、X線結晶構造解析の手法を用い、金属プロテアーゼの構造機能相関を明確に示しており、学術上貢献するところが少なくない。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。