氏　　名	きたやき　もと **北　焼　素**
学位(専攻分野)	博　士（工学）
学位記番号	博甲第　４５０　号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学位論文題目	Study on the Structural and Functional Stability of Some Hydrolytic Enzymes （ニ、三の加水分解酵素の機能および構造的安定性に関する研究）
審査委員	（主査） 教授　黒田裕久 教授　功刀　滋 教授　田中信男

論文内容の要旨

本論文は全七章から構成されている。第１章では、本研究の目的と現在までの内外の研究状況を解説し、さらに本論文でとりあげた３種類の加水分解酵素（タンパク質分解酵素であるサーモライシンとカルボキシペプチダーゼ-Y、および多糖分解酵素であるセルラーゼ）の酵素触媒としておよびタンパク質としての特徴と概要を解説している。

第２章では、本研究で用いられた研究手法のうち共通的なもの、すなわち高圧力下における速度論的、分光学的な測定方法と、示差走査熱量計（DSC）の測定方法などについて説明している。

第３章、第５章、第６章は、中度好熱菌由来の亜鉛含有タンパク質分解酵素であり、工業的には甘味剤アスパルテームの前駆体製造などに用いられている、サーモライシンを対象とした研究成果について書かれたものである。

第３章では、400MPa までの高い圧力がこの酵素の触媒活性と、蛍光および紫外吸収スペクトルに対してもたらす効果を検討したものである。サーモライシンが 100MPa 程度の圧力の印加により 10 数倍の活性化をもたらすことは、過去に報告されているが、本論文では、さらに高い圧力までの観察と、触媒活性のみではなく、蛍光スペクトル、４次微分紫外吸収スペクトル（4th-UV）などの分光学的性質ついても同時に観測を行っている。その結果、この酵素が 220MPa を頂点に大気圧下の 45 倍の触媒活性を示すことを見出し、さらに、サーモライシンの内部 Trp からの蛍光スペクトルは 200MPa 以上の圧力領域で、強度・最大波長とも大きく変化し、4th-UV の結果からも極性環境側へ露出され、不可逆的な二状態転移の様相が見られることを示している。円偏光二色性スペクトルでの観察結果から、この不可逆的変化においてタンパク質の二次構造に大きな変化は見られず、いわゆるモルテン－グロビュール様状態となっている可能性を示唆している。

第５章では、同酵素における触媒活性および、分光学的スペクトルに対する NaCl, KCl などの無機塩による効果を研究した成果をまとめている。この酵素において、NaCl などの無機塩類の添加が触媒活性を上昇させることもすでに知られているが、広範なイオン種を対象とするとともに、触媒活性と分光学的性質、熱力学的変化量との関係を明らかにすべく研究を行ったものである。DSC で測定した転移温度は 2M までの高濃度の塩存在下において（コントロールよりも）低下し、その不安定化の順はカチオンでは、Ca^{2+}＞Mg^{2+}＞K^{+}＞Na^{+}となるとともに、アニオンでは Hofmeister 系列に合致する

こと、塩による活性の上昇効果とタンパク質の不安定化の値とは良好な相関関係を示すことを見出している。さらに、無機塩添加と高圧力印加を併せて行った場合の結果では、塩濃度の上昇によって構造の安定性がもたらされること、また塩による活性上昇と圧力による活性上昇とは独立に起こることを指摘している。また、第 3 章の結果をも総合し、シュミレーションデータの検討をも行い、圧力および塩による活性化は、それぞれ水和の状況やカウンターイオンの状況の変化に伴って、遷移状態の複合体のフレキシビリティが高まった結果生まれたものであると考察している。

第 6 章では、第 5 章での無機塩添加の効果から得られた知見をもとに、高分子量のイオン性化合物、水溶性化合物で、サーモライシンの安定性を増す物質を探索した結果を述べたものである。分子量数万の高分子アニオン（ポリアクリル酸（PAA）、ポリスチレンスルホン酸）、高分子カチオン（ポリジアリルジエチルアンモニウム(PDADMA)）および水溶性高分子（ポリビニルピロリドン(PVP)など）について、触媒活性の変化と保存安定性、および熱量測定による安定性を精査した結果、PDADMA が熱処理安定性を 70%程度向上させること、および圧力耐性については 3.5 倍に上昇させることを発見し、今後のサーモライシンの高圧酵素工学的な応用において、可能性のある高分子安定化剤への展開を示した。

一方、第 4 章では、カルボキシペプチダーゼ-Y（CPY）について触媒活性と分光学的、熱力学的性質に対する圧力印加の効果を検討し、前述のサーモライシンとは異なり、CPY が圧力による変性は多段の転移を示すこと、また、CPY の触媒活性は圧力によって減少し、それに伴う活性化体積変化も正の値を示すことを見いだした。高圧力側で誘引される二段目の転移は、内部蛍光や外部蛍光プローブによるスペクトルに大きな変化をもたらす不可逆な変化であり、この転移が完了する領域では、タンパク質の高次構造は崩壊しているものの、二次構造自身はほとんど保存されており、この場合、モルテン－グロビュール様構造となっていることが示唆されている。さらに、この酵素では、低温・高圧領域において変性状態が発生し、いわゆる「低温変性」が高圧力の印加によって（測定可能温度内に）可視化されることをはじめて示している。

また、第 7 章では、数種から十種程度の酵素コンポーネントからなり、セルロースを加水分解する酵素であるセルラーゼについて、特にその逆反応触媒によるオリゴ糖合成への応用に鑑み、有機溶媒中での安定性や触媒活性を評価すべく、セルラーゼから数種のエキソグルカナーゼを単離・精製し、各々の有機溶媒耐性を評価している。その結果、ExoI と称される成分酵素が高い有機溶媒耐性を示し、未分離酵素を使って報告されているこれまでの研究結果は主にこの成分酵素によってのみ実現されていることを示し、またそれらの酵素による逆触媒反応のスキームを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、タンパク質である酵素の機能と構造の変化の機構を、圧力、塩および有機溶媒という 3 つの人工条件を用い、加水分解酵素を対象として、特に酵素タンパク質の水和状態の変化がもたらす効果について着目して研究したものである。

取り上げられている加水分解酵素は中度好熱菌由来の thermolysin, 酵母由来の carboxypeptidase-Y, および糸状菌由来の cellulase であり、それぞれタンパク質の鎖中央部分、タンパク質のカルボキシ末端部分およびセルロースを水の添加により分解する作用を有している。前２者については、

酵素活性と構造変化を反映する分光学的性質（蛍光強度、蛍光波長、４次微分吸収スペクトル）の（温度・）圧力・無機塩添加・高分子イオン添加による変化を調べ、また圧力処理後に残る変化（不可逆的変化）を円二色性測定、示差走査熱量測定、残存活性測定などによって解析している。一方、cellulase については、多数の成分酵素からなるこの酵素から数種の重要な成分酵素を、市販のクルード標品から出発し、4 段階のクロマトグラフィーによって分離精製し、得られた数種類の成分酵素についてアセトニトリルを中心とする有機溶媒のもたらす影響・効果を、残存活性・分光学的性質・反応生成物定量などの方法により検討を加えている。

申請論文は、酵素の産業的応用において重要な問題である酵素タンパク質の安定性と活性への影響を、圧力・塩・温度・有機溶媒という物理的化学的因子を軸に評価したものであるが、特に圧力や塩添加による触媒活性の上昇が知られている thermolysin について、これらの因子の相互的な関係の考察、それぞれの安定化・活性化機構の異同の考察に論文の多くをさいていおり、酵素・基質複合体の活性化状態における、水和状態の変化を介した自由エネルギー変化の機構を明らかにした点に特徴がある。

また、それらの基礎的な成果をもとに、今後有用な酵素安定化剤の開発につながる高分カチオンを探索したことや、有機溶媒共存下における酵素の逆触媒反応の利用によって有用物質を合成しようとする過程においては鍵となる成分酵素の把握、個別の安定性・耐性の評価が必要であることなどを提言した点にも着目すべき点が多い。

タンパク質の安定性の問題は、いわゆるプロテオミックスにおいて基本的課題となっているが、本論文はその基礎的知見を提供するとともに、今後の同分野の産業的寄与・発展、タンパク質など生体高分子の種々の有効利用において活用できる内容も多く提示しており、工業的・工学的にも大きく貢献するものである。

以下に示すように、申請者はすでに４編の英文論文（いずれもレフリー制）を発表しており、それらのうち 1 編において筆頭著者となっている。また、また 1 編の論文（筆頭著者）が準備中である。

1. Kunugi S., Kitayaki M., Yanagi Y., Tanaka N., Lange R., Balny C., The Effect of High Pressure on Thermolysin.,
Eur. J. Biochem., **248**, 567-574 (1997)
2. Kunugi S., Yanagi Y., Kitayaki M., Tanaka N., Uehara Y., Effects of High-Pressure on the Activity and Spectroscopic Properties of Carboxypeptidase Y.,
Bull. Chem. Soc. Jpn., **7**0, 1459-1463 (1997)

3. Hayashi Y., Kitayaki M., Takezaki K., Ikeuchi H., Kunugi S., Possible Important Role of one Exoglucanase for Transcellobiosylation Reactions Catalyzed by Exoglucanase Components of *Trichoderma Viride* Commercial Cellulase in Aqueous Organic Solvant.
Biocat Biotrans., **21**(1), 25-31 (2003)
4. Kitayaki M., Kunugi S., Tada T., Matsumoto T.Calorimetric and High Pressure Fluorescence Studies of the Salt Effect on Thermolysin. *Polymer J.*, **39**(2), 147-154.

参考

（執筆中の論文）

* Effects of Polyelectrolytes and Water-soluble Polymers on the Stability of proteases. Kitayaki M., Tada T., Kunugi S.; in preparation.

（本論文に含められなかった論文）

* Kinetic Characterization of the Neutral Protease Vimelysin from *Vibrio* sp. T1800. Kunugi S., Koyasu A., Kitayaki M., Takahashi S., Oda K.; 1996, *Eur.J.Biochem.*, **241**, 368-373.