	いけうち　ひでかず
氏　　名	池内　秀和
学位(専攻分野)	博　　士（学術）
学位記番号	博甲第２８３号
学位授与の日付	平成14年11月27日
学位授与の要件	学位規程第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	Structural and Catalytic Stability of Enzymes and Their Domain Structures
	(主査)
審査委員	教　授　功力　滋
	教　授　黒田　裕久
	教　授　小田　耕平

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、本論文での研究の背景とその目指す所について解説を行っている。すなわち、好熱性細菌および好冷性細菌由来のタンパク質（主にタンパク質分解酵素）を対象にその温度・圧力安定性について検討する学術的意義、学界のこれまでの状況、対象タンパク質についてこれまでに報告されていること（三次元構造など）を概説している。

第２章では、研究全体に共通する実験的手法等について解説している。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・圧力による変化を（その温度・圧力において）調べる方法、また温度・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調べる方法と、さらに一つのタンパク質（thermolysin）について変化の動力学的側面を把握すべく導入した圧力ジャンプ法対象を詳解し、対象としたタンパク質の調製方法を解説している。

第３章では好熱性細菌由来のタンパク質分解酵素である thermolysin と好冷性細菌由来のタンパク質分解酵素である vimelysin を対象に活性と構造の温度・圧力安定性を詳細に検討した。

前者の動力学的側面は第４章において緩和法を用いることにより検討し、平衡法では捉えられなかった変性中間体の存在を示している。

第５章では、熱安定性な serine-carboxyl 型タンパク質分解酵素である kumamolysin を取り上げ、温度・圧力に加え化学的変性剤に対する安定性を調べ、通常細菌由来の同種酵素について申請者の属する研究室などから発表されている結果と比較検討することで、複数ドメインタンパク質である serine-carboxyl 型タンパク質分解酵素の構造・活性安定性を議論している。

さらに第６章では、比較対照となるべき複数ドメインタンパク質としてその熱安定性・熱変性挙動について多くの研究が行われてきた phosphoglycerate kinase をとりあげて温度・圧力挙動を調べ、３－５章において得られた結果と比較を行うことにより、温度・圧力に対

するタンパク質の安定性について一般的議論を行っている。

第７章では論文全体を総括し、タンパク質のドメイン数・ドメイン間相互作用と構造安定性の相関という観点から考察している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、好熱性細菌および好冷性細菌由来のタンパク質（主にタンパク質分解酵素）を対象にその温度・圧力安定性について検討したものである。取り上げられているタンパク質（thermolysin, vimelysin, kumamolysin, phosphoglycerate kinase）はすべて一本のペプチド鎖からなる単一サブユニットタンパク質であるが、そのドメイン構造（ドメイン数）により、単一ドメインタンパク質と複数ドメインタンパク質に分類することができる。また、１つ（vimelysin）を除きそれらの３次元構造はＸ線解析法によって明らかにされ報告されており、得られた結果を、主にこれらのタンパク質のドメイン数・ドメイン間相互作用と構造安定性の相関という観点から考察している。

全てのタンパク質について、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・圧力による変化を（その温度・圧力において）調べ、また温度・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。さらに一つのタンパク質（thermolysin）については、圧力ジャンプ法という動的方法によっても検討を加えている。

申請論文は、温度軸に圧力軸を加え、二次元的観点から、適応環境性の異なる、しかも機能的・構造的に関連したタンパク質（酵素）の安定性と構造中間体を考察したものであり、特に単一サブユニットタンパク質内のドメイン間相互作用と構造安定性の関連を明らかにした点で特徴がある。タンパク質の構造安定性、構造形成の問題は、現在いわゆるプロテオミックスにおいて中心的課題となっているが、本論文はその基盤的知見を提供し、今後の同分野の発展に資する内容を提示している。さらに、極限環境におけるタンパク質など生体高分子の有効利用につながる知見をも与えている。

以下に示すように、申請者はすでに２編の論文（いずれもレフリー制）を発表しており、また２編の論文が投稿中である。それらのうち３編において筆頭著者となっている。

1) Ikeuchi, H , Kunugi S, and Oda K.
Activity and Stability of a Neutral Protease from *Vibrio* Sp. (vimelysin) in a Pressure-Temperature Gradient.
Eur. J. Biochem, 267, 979-983(2000)

2) Ikeuchi, H , Kunugi S, and Lange, R.
Observation of a Pressure-Induced Unfolding Intermediate of Thermolysin by Using Pressure-Jump Method.
Polymer J, 34 (8) , 383-388(2002)

3) Ikeuchi, H , Kunugi S, Oyama, H, and Oda, K.
Stability of a thermostable serine-carboxyl-type proteinase in a Pressure-Temperature Diagram.
Eur. J. Biochem, in contribution

4) Tanaka, T, Ikeuchi, H , and Kunigu, S.
Pressure-induced Denaturation of Yeast Phosphoglycerate Kinase.

Biochim, Biophys, Acta, in contribution