

(論文内容の要旨)

チロシナーゼは、菌類、植物、昆虫、哺乳類など様々な生物に存在しており、それぞれの生物において生理的な役割を担っている。一方、チロシナーゼは、食品のフレーバー、味、食感の改良や、美白をめざした化粧品の開発、薬の製造などの様々な分野で、応用が期待されている酵素でもある。特に食用キノコを原料とするチロシナーゼは、長年の食経験から酵素自体の安全性が保障されるため、食品製造分野での使用に適していると考えられる。本論文は、ナメコ由来チロシナーゼの応用化を目指すための基礎研究として、チロシナーゼ前駆体のC末端領域は、成熟体チロシナーゼが触媒活性を示す立体構造を形成する際に不可欠な領域であることを、遺伝子工学的手法を用いて明らかにした論文である。

(1) General Introduction では、今までに報告されている数多くの論文をもとに、チロシナーゼの反応性、機能性、実用性および構造を検討し、チロシナーゼのC末端領域の役割解明を研究テーマと設定した背景について記述している。

(2) Chapter 1 では、遺伝子工学的手法を用いてチロシナーゼ前駆体のC末端領域 25 kDa が欠損している組換え成熟体チロシナーゼを調製し、その性質について検討を行った。その結果、C末端領域が欠損した組換え体には、活性中心に配位しているはずの銅が検出されず、また活性も認められなかった。従って、C末端領域は活性を持つ成熟体チロシナーゼの形成に不可欠であることを示した。すなわち、チロシナーゼ前駆体においてC末端領域 25 kDa は、分子内シャペロンの機能を有することが明らかになった。

(3) Chapter 2 では、C末端領域に部位特異的変異を入れたチロシナーゼ前駆体を融合タンパク質として大腸菌発現系を用いて調製し、活性への影響および銅の取り込みについて検討した。変異を導入するC末端領域のアミノ酸残基を選択するために、コウジカビ由来チロシナーゼおよび細菌由来 Caddie タンパク質との配列相同性を検討した。その結果をもとに調製した4種類 (F515G、H539N、L540G、Y543G) の組換え変異体のうち、F515G、H539N および Y543G には銅が検出されたが、L540G には検出されなかった。変異体から成熟体チロシナーゼを調製したところ、F515G では活性を示さなかったのに対して、H539N と Y543G では活性を示したが、その活性は野生型と比べてそれぞれ約 1/3 および 1/5 に減少していた。また、F515G と L540G はタンパク質分解酵素に対する抵抗性が低下しており、前駆体事態の立体構造が変化していることが示唆された。従って、前駆体のC末端領域は、活性を持つ成熟体チロシナーゼの構造の形成と銅の挿入に不可欠であることが明らかになった。

(4) Chapter 3 では、変異させた4箇所のアミノ酸残基について既報の立体構造からその位置を推定し、チロシナーゼ構造形成における重要性を論じた。すなわち、これらの残基は、銅の挿入反応への関与が示唆されている CXXC モチーフを中央付近に有するフレキシブルなループ構造の両端に位置し、ループの方向性を規定していると考えた。そのため、これらの変異によりループの方向性が変化し、チロシナーゼの構造形成および銅の挿入反応に影響を受け、チロシナーゼの活性が低下したと結論している。

氏名	Lai Lai Moe
----	-------------

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質が機能を果たすには、特定の立体構造をとることが必須である。ところが、遺伝情報が規定しているのは、タンパク質の一次構造、すなわちアミノ酸の配列にすぎない。一次構造により三次構造は決まるが、どのようにして生理機能を持つ立体構造が形成されるのか、また機能発現に必須である因子がいつ挿入されるのかなど、多種多様なタンパク質に関してほとんどが未だによく分かっていない。これらの課題は、学問的な興味からだけでなく、タンパク質を人為的に作り出すという実用面からも、きわめて重要で今日的な課題である。本論文は、遺伝子工学的手法を用いて、実用性が期待される酵素であるチロシナーゼを例に、タンパク質自身に自己の立体構造を構築して機能性を獲得するためのシャペロン部位が存在すること、すなわち分子内シャペロンがあることを示し、さらにその機能性獲得に関与するアミノ酸残基を推定することで、チロシナーゼの構造と機能の関係について新たな知見を見出した点に価値がある。

チロシナーゼは二核銅中心を持つ酸化還元酵素で、分子状の酸素を用いてモノフェノールあるいは *o*-ジフェノールを酸化して反応性の高い *o*-キノンを生成する酵素である。この反応は様々な分野、たとえば食品ではフレーバー・味・食感の改良や、美白をめざした化粧品の開発、薬の製造などでの応用が期待されている。しかし、実際にはチロシナーゼの実用化は遅れており、その理由の一つは活性を有する酵素を大量に得ることが難しいことに由来する。菌類のチロシナーゼは 80~90 kDa の不活性な前駆体として発現したのち、C 末端側の約 20 kDa が切断されるプロセッシングを受けて活性を有する成熟体チロシナーゼとなる。食用マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) や麹カビ (*Aspergillus oryzae*) のチロシナーゼでは、除去される C 末端領域は活性中心を覆う構造をしていることが X 線結晶構造解析で明らかになったことから、この領域はインヒビターとして働いていると提唱されている。すなわち、反応性の高いキノンを生成するチロシナーゼ反応を制御するために、チロシナーゼは活性中心を蓋で覆った構造として生体に蓄えられており、必要に応じて C 末端が切り取られ活性化されるという考えである。このプロセッシングを担う特異的なプロテアーゼは発見されておらず、活性化の詳細も不明である。

本論文では、この C 末端領域はインヒビターとしての役割だけでなく、分子内シャペロンとしての機能を有することを示した。C 末端領域はチロシナーゼにとって不要の部位ではなく、必要不可欠な部位であるという新たな見解を提唱した。この知見は、応用化をめざしたチロシナーゼの大量発現系構築において、有益な情報であるといえる。本論文の成果は、*Applied Microbiology and Biotechnology* (2013 年 Impact factor : 3.811) に受理され、その際にレビューアーからも高い評価を受けた。

よって、本論文は博士 (生物資源環境学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 年 月 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (生物資源環境学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。