

氏名	ますだもんま けいこ 増田(門間) 敬子
学位(専攻分野)	博士 (農学)
学位記番号	農博第 808 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	Structure and Functions of <i>Streptomyces</i> Subtilisin Inhibitor (SSI): Studies with Site-specifically Modified and Mutated Proteins (放線菌ズブチリシンインヒビターの構造と機能: 部位特異的修飾および変異蛋白質を用いた研究)
論文調査委員	(主査) 教授 外村辨一郎 教授 松野隆一 教授 廣瀬正明

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質加水分解酵素(プロテアーゼ)の作用を強く阻害する蛋白質性のインヒビターが生物界に広く存在している。これら蛋白質性プロテアーゼインヒビターの阻害機構は、プロテアーゼ反応機構のモデルとして、また、蛋白質分子間の特異的分子認識機構のモデルとして極めて有用である。

本論文は、放線菌が産生する蛋白質性プロテアーゼインヒビターである *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI と略称) とセリンプロテアーゼであるズブチリシン BPN' (S-BPN' と略称) との相互作用の様相を、平衡論的並びに速度論的に解析し、SSI の構造と機能の関係を明らかにしようとした研究について論述したものであり、その内容は以下の通りである。

(1) 著者は、SSI 添加により反応が阻害されてゆく S-BPN' の 1 本の反応曲線から、SSI と S-BPN' の結合と解離の速度定数を同時に求める新たな方法を考案した。SSI の酵素に対する反応部位 Met 73-Val 74 のメチオニン残基を遺伝子工学的的手法により他のアミノ酸残基に置換した 10 種の変異 SSI 分子種について、これら速度定数を求めた。イソロイシンとアスパラギン酸とグルタミン酸に置換した各分子種で、酵素に対する結合が野生型 SSI に比して有意に弱いこと、そして、速度論的にみると、それは、イソロイシン変異種では解離の速度定数が増大し、アスパラギン酸およびグルタミン酸変異種では結合の速度定数が減少することに起因することを明らかにした。さらに、これら変異 SSI と S-BPN' との結合が、野生型 SSI と同じく 2 段階で進行することを明らかにし、各段階での速度論的定数を求めた。

(2) SSI と S-BPN' とが結合する際に、アルカリ性 pH 領域で観測される紫外外部吸収差スペクトルは、チロシン残基の解離型から非解離型への移行を示すが、著者は、遺伝子工学的に調製した SSI 変異種並びに S-BPN' 変異種を用いて、これが S-BPN' の Tyr 104 の状態変化に起因することを明らかにした。また、同時に観測される蛋白質蛍光の増加とその pH 依存性は、S-BPN' の Trp 106 の環境が Tyr 104 の状態変化の影響を受けることによることを明らかにした。

(3) SSI の反応部位 Met 73-Val 74 のペプチド結合は、中性 pH、常温においても、極めて遅くではあるが S-BPN' によって加水分解され、この結合のみが切断された分子種すなわち修飾 SSI (SSI * と略称) が生ずる。SSI * もまた S-BPN' を阻害するが、著者は、その際切断されていた反応部位結合が修復されることを実証し、修復の速度を測定した。また、酵素との複合体を介して成立する SSI と SSI * の間の加水分解平衡定数を求め、その pH 依存性を明らかにした。これらの測定値に基づいて、SSI と S-BPN' の相互作用の各段階の速度定数を算出し、反応部位結合切断の段階が最も遅いことを明らかにした。

(4) SSI は均等なサブユニットからなるホモダイマー蛋白質であるが、SSI と SSI * とを単に混合するだけで、両者のサブユニット間に組替えがおり、混合型のヘテロダイマーが生ずることを著者は明らかにした。この現象を利用して、ダイマーのサブユニットへの解離速度を測定することに成功し、さらにその活性化エネルギーを測定した。

(5) SSI の反応部位を挟んで位置する 2 個のプロリン残基をアラニン残基に置換した変異 SSI を調製し、S-BPN' との相互作用、円偏光二色性、蛋白質蛍光、及び熱容量の測定を行い、これらプロリン残基が SSI の構造安定性に大きく寄与するものであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、放線菌が産生する蛋白質性プロテアーゼインヒビターである *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI と略称) とセリンプロテアーゼであるズブチリシン BPN' (S-BPN' と略称) との相互作用の様相を、平衡論的並びに速度論的に解析し、蛋白質性プロテアーゼインヒビターの構造と機能の関係を明らかにしようとした研究について論述したものである。得られた成果について評価すべき点は次の通りである。

(1) 著者は、SSI 添加による阻害により直線から外れてくる S-BPN' の 1 本の反応曲線から、SSI と S-BPN' の結合と解離の速度定数を同時に求める新たな方法を考案した。これにより少量の試料で両速度定数の決定が可能となり、希少なインヒビター試料についての研究に大きく貢献した。SSI の酵素に対する反応部位結合 Met 73-Val 74 のメチオニン残基を遺伝子工学的手法により他のアミノ酸残基に置換した 10 種の変異 SSI について、この方法を用いてこれら速度定数を求め、インヒビターと酵素との結合の強さの速度論的な解釈を示し、置換したアミノ酸残基の構造との関係を明らかにした。

(2) SSI と S-BPN' とが結合する際に、アルカリ性 pH 領域で観測される紫外部吸収差スペクトル及び、同時に観測される蛋白質蛍光の増加とその pH 依存性が、どの特定のアミノ酸残基の状態変化に由来するかを、SSI 及び S-BPN' の変異分子種を活用して解明した。この差スペクトルと蛍光変化は、これら蛋白質の結合を観測する際の有用な指標であり、その原因が特定されたことは、観測結果のより精密な解釈を可能にするものである。

(3) SSI の反応部位結合のみが S-BPN' の作用により切断された分子種すなわち修飾 SSI (SSI * と略称) もまた S-BPN' を阻害するが、著者は、その際、切断されていた反応部位結合が修復されることを実証し、修復の速度を測定した。また、酵素との複合体を介して成立する SSI と SSI * の間の加水分

解の平衡定数を求め、その pH 依存性を明らかにした。これらの知見は、SSI と S-BPN' の系が、いわゆる「蛋白質性プロテアーゼインヒビターの標準阻害機構」に従うことを明示するものである。著者はこれらの測定値に基づいて、相互作用の各段階の速度定数を算出した。これにより、この系の全体像をよりの確に把握することが可能となった。

(4) SSI は通常極めて安定なホモダイマー蛋白質であるが、これが動的平衡にあることを明らかにし、ダイマーの解離速度を求めることに成功した。安定な蛋白質ダイマーについてこのような例は少なく、蛋白質の四次構造の実体の理解に一つの貢献をなした。

(5) SSI の反応部位を挟んで位置する 2 個のプロリン残基が SSI の構造安定性に大きく寄与するものであることを実証し、SSI の阻害物質としての構造的要因の解明を一步進めた。

以上のように、本論文は、放線菌の蛋白質性プロテアーゼインヒビター SSI の構造と、その標的酵素ズブチリシン BPN' との相互作用につき詳細な解析を加え、SSI の阻害機構についての理解をより深く進めたものであり、酵素化学並びに蛋白質化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 6 年 2 月 15 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（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。