

氏名	みまじょうじ 三間 穰 治
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2466号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	The Regulation of Vacuolar Proteinases in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Structure and Function of the Cytoplasmic Inhibitor, I ^c (酵母液胞タンパク質分解酵素の制御:細胞質インヒビター I ^c の構造と機能)
論文調査委員	(主査) 教授 林 力丸 教授 關谷次郎 教授 佐藤文彦

論文内容の要旨

細胞内タンパク質分解の主要な経路の一つ、リソソームあるいは液胞のプロテアーゼ系は、細胞の生育や成熟との関連性はいまでもなく、その活性制御機構に関して不明な点が多い。本研究は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の液胞タンパク質分解の制御機構を解明することを目標におき、酵母分子生物学の指標のひとつとして知られている液胞のカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) を特異的に阻害する細胞質インヒビター (I^c) の構造と機能を解析したものである。論文は以下の4章よりなり、I^cの大量発現系の構築を行い、一次構造、生化学的諸性質、翻訳後修飾の阻害機能への役割、CPYとの複合体形成機構などを明らかにしている。

第一章では、I^cの一次構造の解析を行っている。酵母野生株より I^cを単離し、化学的および酵素的切断により得られたペプチド断片の構造解析を総合し、アミノ酸配列を決定している。その結果、I^cは219アミノ酸残基からなる *TFS1* 遺伝子産物 (*TFS1* 遺伝子は当初、細胞シグナル伝達に関与する *CDC25*の変異抑制因子として同定されている) と同一であり、フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) ファミリーに属することを明らかにしている。

第二章では、I^cの大量調製方法を新たに構築し、I^cの生化学的諸性質を述べている。発現系の宿主として液胞プロテアーゼ欠損酵母を用い、精製には凍結融解法による細胞破碎の後に、疎水性カラムを用いることで、I^cの簡便な大量調製に成功している。精製タンパク質を用いた解析により、I^cは他のプロテアーゼインヒビターと異なり、翻訳後修飾により N 末端がアセチル化され、ジスルフィド結合を持たず、主にβシートから構成されていることを明らかにしている。

第三章では、N末端アセチル基の阻害機能における役割を解明するため、大腸菌発現系により無アセチル化型 I^c (unaI^c) を作成し、野生型 I^cと比較している。その結果、unaI^cは野生型と同一の高次構造を保持し、CPYと1対1で複合体を形成する一方で、その阻害能力が大きく減少していることを明らかにしている。さらに、CPY-unaI^c複合体においては、CPYの活性中心および基質結合ポケットが露出し、溶媒と接触していることを見出している。これらの結果から、N末端アセチル基は I^cの阻害機能の発現に必須であり、複合体を形成するとき CPYの活性部位近傍に結合するという結論を得ている。

第四章では、I^cと CPYの結合様式を明らかにするため、タンパク質変性剤や塩類の CPY-I^c複合体の解離会合へ及ぼす影響を詳細に解析している。その結果、低濃度の塩酸グアニジン存在下で、I^cと CPYは複合体を形成したままで、CPYの活性部位近傍のみが局所的に解離することを見出している。さらに、複合体をトリプシン分解すると、共に CPYと相互作用する二つの断片に I^cが限定分解されることを見出している。本研究から、I^cは二つのドメインから構成され、それぞれが反応部位と結合部位という独立した機能を担うと考察している。

以上、本論文は I^cの構造と阻害機能に関わる諸性質を明らかにし、液胞プロテアーゼ/細胞質インヒビター系の活性制御の分子機構を究明する基盤を確立している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、酵母液胞プロテアーゼの特異的インヒビター群 I^A, I^B, I^cのうち、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) イン

ヒビター I^c のタンパク質化学的諸性質から阻害機構に至る諸性質を詳細に解析したものであり、評価すべき成果は以下のとおりである。

1. アミノ酸配列を決定した結果、I^c は既知のプロテアーゼインヒビターと相同性がなく、細胞内シグナル伝達への関与が予想される *TFS1* 遺伝子産物と同一であり、フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 (PEBP) ファミリーに属することを明らかにした。

2. 酵母液胞プロテアーゼ欠損株を発現系の宿主として大量発現に成功し、従来の方法より格段に高い収率の大量調製法を確立し、タンパク質化学的諸性質を明らかにする途を拓いた。その結果、I^c は分子量が約24,399と小さく、ジスルフィド結合を持たず、80%のβシートから構成され、N末端がアセチル化されていることを示し、β型タンパク質という構造的特徴を有することを明らかにした。

3. 大腸菌発現系から無アセチル化型 I^c を得、その諸性質を野生型 I^c と比較し、N末端アセチル基が阻害機能に大きく関与することを明らかにした。これにより、N末端アセチル化という翻訳後修飾が機能発現に必須であることを初めて実証した。

4. CPY-I^c 複合体に与える変性剤およびトリプシンの作用を詳細に解析し、複合体の特徴を明らかにした。さらに、I^c は阻害反応部位を含む複数の相互作用部位を介して CPY と結合することを示し、I^c のプロテアーゼに対する結合様式がトロンピンインヒビターに類似することを見出した。

以上のように、本研究は、カルボキシペプチダーゼ Y インヒビターを大量調製し、その諸性質を詳細に明らかにすることで、酵母液胞タンパク質分解系の制御の分子機構の解明に新たな知見を与えたものであり、生体高分子化学、酵素化学、細胞生化学および応用微生物学の分野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15年1月9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。