

氏 名	杉 野 弘 すぎ の ひろむ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 189 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文論目	放線菌の生産する蛋白性プロテアーゼ・インヒビター“プラスミノストレプチン”に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 山科郁男 教授 矢島治明 教授 井上博之

論 文 内 容 の 要 旨

著者は、ここ数年来、微生物の生産する生理活性物質に関する研究の一環として、血液凝固系および線維素溶解（線溶）系に作用する物質の検索を続けてきたが、この過程で、土壌から分離した一放線菌の培養液中から、プラスミンを強く阻害する蛋白性インヒビターを単離、結晶化することに成功した。

従来、動植物界からは数多くの蛋白性プロテアーゼ・インヒビターが得られており、その一次構造や高次構造が明らかにされつつあるが、微生物起源の蛋白性プロテアーゼ・インヒビターに関する詳細な研究は比較的少なく、2, 3の例をみるに過ぎない。今回得られたインヒビターが、微生物起源の蛋白性プラスミン・インヒビターとしては最初のものであることから、著者は本物質を“プラスミノストレプチン”と命名し、その本質の解明を目的として一連の研究を実施した。

本論文では、プラスミノストレプチンの単離、結晶化法、蛋白化学的諸性質、プロテアーゼ阻害スペクトルならびに阻害機構と阻害活性部位、および一次構造に関して行なってきた研究の結果について論述する。

ファイブリン平板法あるいはファイブリンゲル溶解時間測定法により、微生物培養液中に線溶系作用物質を検索した結果、土壌から新たに分離し *Streptomyces antifibrinolyticus* と命名した一放線菌株がその培養液中に強力なプラスミン・インヒビターを生産する事実を発見し、その培養液から硫酸沈澱、ゲル濾過による脱塩、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-25 カラムによるゲル濾過を経て、本インヒビターをポリアクリルアミドゲル電気泳動のおよび超遠心沈降的に単一の標品として結晶状に単離した。

プラスミノストレプチンは単純蛋白質で、その分子量はアミノ酸分析 および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約11,500と算出されたが、ゲル濾過および超遠心によって求めた値は約25,000で、本物質が通常の水溶液中ではダイマーとして存在していることが示された。プラスミノストレプチンは109個のアミノ酸残基から成り、構成アミノ酸としてアラニン、バリン、グリシンが多く、イソロ

プラスミノストレプトチンはプラスミン ($K_i: 2.34 \times 10^{-8} M$) 以外にトリプシン ($K_i: 1.57 \times 10^{-8} M$) および微生物起源のアルカリ性プロテアーゼ, たとえばサブチリシン ($K_i: 1.60 \times 10^{-8} M$) などをも強力に阻害するが, キモトリプシン, スロンビン, カリクレイン, エラスターゼなどのセリンプロテアーゼ, カルボキシペプチダーゼ A および B, ロイシンアミノペプチダーゼ, コラゲナーゼ, サーマライシンなどの金属プロテアーゼおよびパパイン, ブロメライン, フィシンなどのチオールプロテアーゼなどに対する阻害能は認められなかった。

プラスミノストレプトチンをトリニトロベンゼンスルホン酸あるいは O-メチルイソ尿素を用いて修飾すると、プラスミンおよびトリプシンに対する阻害活性は完全に消失し、サブチリシン阻害活性も 50% にまで減少した。また、プラスミノストレプトチンに触媒量のトリプシンあるいはサブチリシンを酸性下で作用させると、いずれの場合にも、プラスミノストレプトチン分子内に存在する S-S 架橋中 Lys⁶⁹-Gln⁷⁰ の結合のみが限定分解された。これらの結果と Laskowski の一般則とから、著者はプラスミノストレプトチンのプロテアーゼ阻害活性部位をこの Lys⁶⁹-Gln⁷⁰ 結合と結論した。なお、カルボキシペプチダーゼ A を用いて、プラスミノストレプトチン分子の COOH 末端部分から、6 個のアミノ酸残基を切り離すとそのプロテアーゼ阻害活性が消失することから、本インヒビターの阻害活性発現には、阻害活性部位のほかに COOH 末端部分のアミノ酸配列の存在が重要であることをも見いだした。

¹
 NH₂-Gly-Leu-Tyr-Ala-Pro-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Thr-Met-Gly-His-Gly-Asn-
²⁰
 Ser-Ala-Ala-Thr-Val-Asn-Pro-Glu-Arg-Ala-Val-Thr-Leu-Asn-Cys-Ala-
³⁰
 Pro-Thr-Ala-Ser-Gly-Thr-His-Pro-Ala-Ala-Leu-Gln-Ala-Cys-Ala-Glu-
⁴⁰
⁵⁰
 Leu-Arg-Gly-Ala-Gly-Gly-Asp-Phe-Asp-Ala-Leu-Thr-Val-Arg-Gly-Asp-
⁶⁰
⁷⁰
 Vla-Ala-Cys-Thr-Lys-Gln-Phe-Asp-Pro-Val-Val-Val-Thr-Val-Asp-Gly-
⁸⁰
⁹⁰
 Val-Trp-Gln-Gly-Lys-Arg-Val-Ser-Tyr-Glu-Arg-Thr-Phe-Ala-Asn-Glu-
¹⁰⁰
 Cys-Val-Lys-Asn-Ser-Tyr-Gly-Met-Thr-Val-Phe-Thr-Phe-COOH
¹⁰⁹

この一次構造を詳しく吟味し、アミノ酸配列の特徴として、アミノ酸残基の分布にかたよりがあり、Thr-Val, Ala-Leu など14種類のジペプチドのくり返し構造が分子全体にわたって存在することを見出した。また、この構造を他のインヒビターのそれと比較して、特にプラスミノストレプチンのプロテ

アーゼ阻害活性部位近傍のアミノ酸配列と相同配列を持ったインヒビターが、動物、植物および微生物界に広く分布していることを指摘できた。

以上、蛋白性プロテアーゼ・インヒビター「プラスミノストレプチン」に関して著者が行なった研究の内容を総括した。本研究において、著者は、血液凝固系および線溶系に作用する物質を微生物中に検索し、土壌から分離した一放線菌の培養液から、微生物起源としては初めて、プラスミンおよびトリプシンを阻害する蛋白性プロテアーゼ・インヒビターを単離、結晶化することに成功した。そして、その蛋白化学的諸性質、プロテアーゼ阻害能ならびに阻害機構、およびプロテアーゼ阻害活性部位を明らかにしたうえ、本物質の全一次構造を決定して、その輪郭を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

プラスミンは血液中に生じたフィブリンを溶解する作用を持つプロテアーゼであるが、その活性が血液中で異常に上昇した場合には血液は凝固性を喪失する一方、血液の循環異常に附随する種々の症状が現われる。従って、このような場合にプラスミン活性を抑制することのできるプラスミン・インヒビター（阻害物質）の出現が望まれている。

本論文は従来ほとんど調べられていなかった微生物からプラスミン・インヒビターを単離してその性質、構造、作用機作を明らかにしたものである。

まず、多数の菌株についてその培養濾液の抗プラスミン活性を検索した結果、著るしく高い活性を示す菌株を見出し、大量培養を行って目的とするプラスミン・インヒビターを結晶状に単離することに成功している。このインヒビターはプラスミン、トリプシンのほか、微生物起源のアルカリ性プロテアーゼにも作用する点で、従来から知られているプロテアーゼ・インヒビターとは異なるものである。

次いで、トリプシンを用いて作用機作を調べ、阻害作用に伴って切断されるインヒビター中のペプチド結合、すなわち、阻害活性部位を決定している。

さらに、化学的、酵素的方法により 109 個の全アミノ酸の配列を決定した。阻害活性部位近傍の構造は他の種々の動植物、微生物起源のインヒビターに類似している。

以上、本論文は新しい型のプロテアーゼ・インヒビターを発見して、その性質、構造、作用機作を完全に明らかにしたものであり、多くの有用な知見を含んでいる。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。