

氏 名	青 島 均 あおしまひとし
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第 565 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Inactivation of <i>Streptomyces</i> SubtilisinI nhibitor by Chemical Modifications (化学修飾法によるストレプトマイセスズブチリシンインヒビターの失活)
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行 教 授 香月裕彦 教 授 川出由己

論 文 内 容 の 要 旨

Streptomyces Subtilisin Inhibitor (略して S-SI と呼ぶ) は微生物 *Streptomyces albogriseolous* S-3253 から分離精製された蛋白質性の蛋白質分解酵素阻害剤であり、アルカリ性蛋白質分解酵素ズブチリシンを特異的に阻害する新しい蛋白質である。この S-SI は 113 個のアミノ酸残基より成る分子量 11,500 の単量体 2 個から構成されている。この蛋白質の一次構造はすでに決定されており熱的にかなり安定で固い構造を持った蛋白質である。

本論文はこの蛋白質について化学的に化学修飾法を用いて、また、物理化学的に核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて研究し、阻害活性に関与するアミノ酸残基の種類、およびヒスチジンの存在状態を明らかにしたものである。

メチレンブルーを増感剤として S-SI の光酸化を行ったところその活性は一次反応に従って阻害されることが明らかになった。失活速度を pH に対して描いた滴定曲線は pK 約 6.0 に変曲点を示した。この光酸化した S-SI のアミノ酸分析を行なったところヒスチジンとメチオニンが著しく減少した。この場合の阻害活性の減少は 1 個のヒスチジンの減少と 3 個のメチオニンの減少およびメチオニンスルホキシドの増加とに相関関係があることが明らかとなった。また、S-SI を NMR 法を用いて測定すると 2 個のヒスチジンの C(2)-プロトンによるシグナルが観測された。光酸化を行なうと pK 約 6.0 の滴定曲線を示す低磁場側のピークが選択的に減少することが見出された。光酸化をした S-SI をブロムシアン分解法とゲル濾過法とにより分離してえられた各ペプチドをアミノ酸分析した結果、光酸化によって減少し NMR 法によって pK 約 6.0 の滴定曲線を示すヒスチジンは 106 番目のヒスチジンであり光酸化されないヒスチジンは 43 番目のヒスチジンであることが明らかとなった。つぎに、ジアゾニウム-1-H-テトラゾール (DHT) を用いて S-SI の化学修飾を行ったところリジン、チロシン、トリプトファンは修飾されても S-SI の活性はほとんど阻害されないことが明らかとなった。

以上の結果よりつぎの結論を得ている。(1) S-SI に含まれるメチオニン残基のうち少なくとも 1 つのメ

チオニン残基が S-SI の阻害活性に必須の役割を果たしている。(2) S-SI の光酸化による失活には 106 番目のヒスチジンが関与している。(3) S-SI 中のリジン, チロシン, トリプトファン残基は阻害活性に関与していない。また, S-SI の活性部位については蛋白質分解酵素阻害剤の活性部位の特徴を考慮すると化学修飾法によりメチオニンとヒスチジンの阻害活性への関与が示唆されたが, これは 73 番目のメチオニンのアミノ基側, すなわち Met (73)-Val (74) の部位が活性部位であると考えられる。さらに 106 番目のヒスチジン残基は蛋白質の表面に存在し, 43 番目の残基は蛋白質の内部に埋もれた形で異常な状態にあるものと結論される。

参考論文は還元糖の高感度検出法を確立したもの, 液化型 α -アミラーゼのサブサイト親和力を決定したもの, S-SI の NH プロトンの重水素交換強度を測定したもの, ペプシンの活性部位をスピントラベルして ESR 法を用いて研究したもの, および, リポキシダーゼのスピントラッピング法による研究である。

論文審査の結果の要旨

最近, 蛋白質で構成される蛋白質分解酵素阻害剤については数種の動物や植物の中から分離精製された例があり, その性質や阻害機構が徐々に明らかにされはじめている。本論文のストレプトマイセスズブチリシンインヒビタ —*Streptomyces Subtilisin Inhibitor* (略して S-SI と呼ぶ) もその一種で, 村尾らをはじめて微生物 *Streptomyces albogriseolous* S-3253 から分離精製することに成功したものである。この S-SI は 113 個のアミノ酸残基より成る分子量 11,500 の単量体 2 個から構成されている新しい蛋白質で, アルカリ性蛋白質分解酵素ズブチリシンを特異的に阻害する。この蛋白質の一次構造は池中らにより決定されているが, 細菌から見出された蛋白質性の阻害剤である点で大変珍しいものである。この蛋白質の阻害機構を明らかにすることは, 特にその活性部位の位置を解明することは植物や動物から見出された他の蛋白質分解酵素阻害剤と比較する上で重要な課題である。また, 蛋白質と蛋白質との相互作用を研究する上でも大変興味ある課題である。

申請者はこの蛋白質について, 主として化学的に化学修飾法を用いて, またさらに, 物理化学的に核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて研究し, その活性に関与するアミノ酸残基を明らかにしその阻害機構を解明する上で重要な知見をえている。化学修飾法としてはまづメチレンブルーを増感剤とする光酸化法, 塩素および過酸化水素を用いる酸化法, ジアゾニウム -1-H- テトラゾール (DHT) を用いる化学修飾法を用い, 物理化学的方法としては NMR 法を用いている。その結果つぎの結論をえている。(1) S-SI に含まれるメチオニン残基のうち少なくとも 1 つのメチオニン残基が S-SI の阻害活性に必須の役割を果たしている。(2) S-SI の光酸化による失活には 106 番目のヒスチジンが関与している。(3) S-SI 中のリジン, チロシン, およびトリプトファン残基は阻害活性に関与していない。

蛋白質分解酵素阻害剤の活性部位の特徴としては阻害剤の活性部位は酵素により切断され易いアミノ酸配列のところにあり, その活性部位のアミノ基側のアミノ酸はアルキル基で疎水的なアミノ酸, イソロイシン, ロイシン, バリン, アラニンなどであり, また, 活性部位は S-S 結合にかこまれた部分にあって活性部位の近くには陰イオンは存在せずプロリンが多く存在する, という点があげられている。この点を考慮して活性部位は Met(73)-Val(74) の部分であると結論している。このような例は本論文の例がはじ

めてのものである。また、43番目のヒスジンは蛋白質の内部に埋もれた形で異常な状態にあって活性に関係なく、106番目のヒスチジン残基は蛋白質の表面に存在して活性に関係があることを明らかにしている。

このような結果と、参考論文に示されたいずれもユニークな結果などを併せて申請者の研究は生物物理化学の分野において貴重な知見をえたもので、この分野の進歩に寄与する処が少なくない。また申請者がこの分野で豊富な知識と優れた研究能力を有していることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。