

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	永山 充
論文題目	Studies on maturation process of CPY precursor by intramolecular chaperone (分子内シャペロンが関与するカルボキシペプチダーゼYの成熟化機構についての研究)		
(論文内容の要旨)			
酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>の液胞由来のカルボキシペプチダーゼY(CPY)に存在するプロペプチドは、成熟体形成への分子内シャペロンとして、また細胞内での阻害剤として機能する。一方、CPYにはタンパク質性の阻害剤I^Cが細胞内に存在する。CPYとI^Cの相互作用は結晶構造により明らかとなっているが、プロペプチドとの相互作用で進むCPYの成熟化機構は未解明である。本研究では、プロペプチドが関与するCPYの成熟化機構を分子レベルで解析した。			
1. I ^C hの機能解析とCPYとの相関解析			
I^C と40%の相同性を有する機能未知タンパク質をコードする遺伝子が、I^C遺伝子に隣接して酵母ゲノム上に存在した。CPYのフォールディング（成熟化機構）に関する新たな知見を得るため、このホモログをI^Chと称し、I^Chの機能及びCPYとの相互作用を解析した。 まずは、I^Chの大量発現系及び精製系を構築し、酵母30gから6mgのI^Chを得た。精製したI^ChはN末シークエンスによる配列分析ができず、質量分析の結果より、I^ChのN末端は翻訳後修飾によりMet1が切断され、Ser2のアミノ基にアセチル基が付加していることが明らかとなった。次に、I^ChによるCPYへの結合及びCPY活性の阻害能を調べたところ、CPYへは結合せず、全く活性を阻害しないことが明らかとなった。また、GFPを融合させて、I^C及びI^Chの細胞内局在を観察したところ、両者は共に対数増殖期には細胞質に存在するが、I^Cは定常期になるとCPYが存在する液胞へと移行するのに対し、I^Chは定常期でも細胞質に留まったままであり、むしろ分解が起こっている可能性が示唆された。以上より、I^ChはCPYの機能との相関はなく、別の機能を有していると考えられた。従って、I^CとI^Chのアミノ酸配列のアライメントとCPY-I^C結晶構造解析より、I^ChはCPYの阻害に重要なI^C様のN末端配列を有さないために、CPYを阻害しないことが明らかとなった。			
2. プロペプチドによるCPY阻害機構の解析			
CPYとプロペプチドの相互作用における新たな知見を得るために、CPYとの相互作用が明らかなI^Cとプロペプチドを比較した。CPYに結合するI^CとCPYのアミノ酸を比較したところ、プロペプチドのC末端とそれに続く成熟領域にI^CのN末端と相同性が高い配列を見出した。特に阻害に必要とされるN末端配列と良く似た配列がプロペプチドのC末端側に存在した。つまり、この部位が前駆体において阻害配列となって、CPYの成熟領域に結合しているのではないかと考えられた。そこでこれら			

の配列のペプチドを合成し、mCPY（成熟型CPY）の阻害実験を行った。その結果、相同性を有するI^CのN末端配列ペプチド及びプロペプチドC末端配列ペプチドは、CPYの活性を阻害した。つまり、I^CのN末端と相同性のあるプロペプチド配列が活性阻害物としてCPYの基質認識部位に結合している可能性が示唆された。これらの結果から、CPYは前駆体から成熟体へと変換する過程において、プロペプチドがI^C様の結合様式でmCPYの基質認識部位に結合し、かつその周辺構造を形成しているという分子モデルを予測した。

3. 分子ディスプレイ法を用いたCPY成熟化機構の解析

CPYの詳細な成熟化機構を解析するために、上記で構築した分子モデルに基づき、プロペプチドのI^Cと相同性のある部位を順次I^Cの相同性配列へと置換したプロペプチド変異体を設計した。酵母分子ディスプレイ法を用いることで、2種類のプロペプチド変異体から形成された成熟体CPY(mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8})を作ること成功した。蛍光基質を用いた活性測定により提示したmCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8}の活性は、野生型よりも高いことが分かった。変異箇所をアラニン置換したプロペプチド変異体のmCPYの活性は野生型よりも減少したことから、この部位はフォールディングに重要な部位であることを見出した。さらに、精製した成熟体酵素（mCPY、mCPY^{ICN5}、mCPY^{ICN8}）の速度論的解析を行った結果、mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8}はmCPYよりも触媒効率が上昇することが認められた。

以上の結果から、プロペプチドに変異を導入することで、成熟体のアミノ酸配列は同一にも関わらず異なる活性を持つ成熟体を創出できることが初めて示された。すなわち、分子内シャペロンに成熟体の構造を決定するフォールディング経路の情報が入っており、その構造情報を成熟体へとインプリンティングして残すことから、この現象を‘protein folding memory’と命名した。今回の実験では、CDスペクトル解析でmCPY、mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8}間で2次構造に大きな差は見られなかったことから、全体の構造が変化するというよりも変異部位が結合する基質認識部位周辺の構造が微細に変化して活性上昇に寄与していることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

酵母*Saccharomyces cerevisiae*の液胞由来のカルボキシペプチダーゼY(CPY)に存在するプロペプチドは、成熟体形成への分子内シャペロンとして、また、活性阻害剤として機能することが知られている。しかしながら、プロペプチドとの相互作用で進むCPYの成熟化機構は未解明のままである。本研究は、CPYとI^Cとの相互作用に着目し、酵母分子ディスプレイ法を用いた解析によって、プロペプチドが関与するCPYの成熟化機構を分子レベルで解析したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. CPYの阻害剤I^CのホモログI^Chを見出し、CPYとI^Chの相互作用解析及びI^Chの細胞内局在観察により、I^ChはCPYとは相互作用しないことを示した。また、I^ChのN末端の配列がI^Cとは異なるため、CPYとは相互作用しないことと、I^CのN末端配列が阻害に重要な役割を果たすことを示した。
2. CPYとI^Cのアミノ酸配列を比較し、プロペプチドのC末端領域とそれに続くmCPY（成熟型CPY）のN末端領域は、I^CのN末端領域の配列と相同性があることを示した。また、合成ペプチドを用いたCPY活性阻害実験により、I^CのN末端領域と相同性のあるプロペプチド配列が、CPYの阻害部位に結合することを示した。これにより、プロペプチドが関与する成熟化機構の分子モデルを提唱した。
3. 酵母分子ディスプレイ法を用いてCPYのプロペプチド変異体を作製し、生成したmCPYの活性を解析したところ、プロペプチドに変異を加えることでアミノ酸配列が同一にも関わらず、野生型のmCPYよりも高い活性を示す成熟体を作製できることを示した。CDスペクトルの結果から、全体の構造が変化したのではなく、変異部位がmCPYの基質認識部位に結合し、その周辺の構造を変化させたことを示した。プロペプチドが成熟体の構造変化を決定する情報を有しており、その情報を成熟体へインプリンティングして残す現象‘protein folding memory’を見出した。

以上のように本論文は、プロペプチドが関与するCPYの成熟化機構を分子レベルで解明したものである。更に、本研究では、プロペプチドに変異を加えることでアミノ酸配列が同一にも関わらず機能の異なるタンパク質を作製できることを示したものであり、生体高分子化学、タンパク質構造化学、生体触媒化学に寄与することが大きい。

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24年4月12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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降