

氏 名	なか せ ひろし 中 瀬 博
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1154 号
学位授与の日付	平成 12 年 11 月 24 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 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Action Mode and Subsite Properties of Carboxypeptidase Y (カルボキシペプチダーゼ Y の作用機序およびサブサイトの性質)

論文調査委員 (主 査) 教 授 林 力 丸 教 授 池 田 篤 治 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

パン酵母液胞中に存在するカルボキシペプチダーゼ Y は、ペプチドや変性タンパク質、ペプチドアミドの C 末端よりアミノ酸やアンモニア、アミノ酸アミドなどを順次遊離するセリンカルボキシペプチダーゼである。本研究では、本酵素のタンパク質やペプチドアミドを基質としたときの C 末端認識機構やタンパク質を基質としたときの全サブサイトを同定しており、そのサブサイトの重要性を示している。本論文は三章より構成されており、その主な内容は以下に示すとおりである。

第一章では、セリンおよび金属カルボキシペプチダーゼにおける基質認識および反応機構について、現在までの研究成果をまとめるとともに、本研究の目的を明確にしている。

第二章では、構造は変化せず活性のみが消失した変異体 H397A を作製し、これの糖鎖構造を介してセンサーチップに固定化し、4 つの変性タンパク質 (α -casein, RCM-BSA, RCM-RNase A, RCM-lysozyme) を作用させることにより、本酵素とタンパク質基質との親和性を表面プラズモン共鳴センサーにより測定し、本酵素は複数のサブサイトを有していることを明確にしている。また、タンパク質基質分解反応はエステル基質分解反応と異なり、アシル化段階が律速であることを明らかにしている。

第三章では、固相合成法により Fmoc-(Glu)_nAla-OH (n=1—6) を合成し、これを基質とした速度論的解析により、本酵素が 6 つのサブサイト (S₁', S₁-S₅) を有することを明らかにしている。また、pH6.5 と pH5.0 における反応速度パラメータの値より、各サブサイトの性質を明らかにしている。さらに、固相合成法により Fmoc-(Glu)_nAla-NH₂ (n=1—5) および Fmoc-Lys(Glu)₃Ala-NH₂ を合成し、これらに対する同様の解析を行ない、本酵素がペプチドアミド基質を認識する場合に、水素結合ネットワーク以上にサブサイトとの強い相互作用が重要であることを示している。これらの結果をふまえ、各サブサイトを構成するアミノ酸残基を推定している。

以上の研究成果は、本酵素は現在までに報告されている 2 つのサブサイト (S₁', S₁) 以上に 4 つのさらなるサブサイト (S₂-S₅) を有していることを明確にしている。また、消化管にあるカルボキシペプチダーゼ A とは異なり、真核生物の液胞にある本酵素が基質を認識する際には、これらのサブサイトが重要な役割を果たしていることを示している。このことは以下のような理由によると説明している。

カルボキシペプチダーゼ A には、S₁' サブサイトと C 末端カルボキシル基の認識部位からなるプライマリーサブサイトが知られている。特に基質の C 末端カルボキシル基は、プライマリーサブサイトに存在する Arg145 残基の側鎖と強い塩結合をし、基質を認識している。この結合が強いため、他のサブサイトと基質の強い相互作用がなくてもカルボキシペプチダーゼの機能を発揮することができる。

一方、カルボキシペプチダーゼ Y は、Gly52 の主鎖のアミド基と Asn51 と Gly145 の側鎖が水素供与体として働き、基質の C 末端カルボキシル基と塩結合よりはるかに弱い水素結合を形成し C 末端を認識している。この弱い相互作用を補うため、本酵素ではサブサイトが関与し、基質を結合すると考えられる。プライマリーサブサイト以外に強いサブサイトを持

つことは基質結合の選択性を弱めるため、本酵素は広い特異性を発揮でき、生体内でさまざまな高分子を基質として代謝しうると考えている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、変性タンパク質、Fmoc-オリゴペプチド、およびFmoc-オリゴペプチドアミド基質に対するパン酵母液胞由来カルボキシペプチダーゼ Y の作用機序とサブサイト構造を明らかにしようとした研究であり、評価すべき点は以下のとおりである。

1) 変性タンパク質と本酵素の親和性を表面プラズモン共鳴センサーを用いて測定し、これが N 末端アシル化ジペプチドに比べ非常に高い親和性を有していることを明らかにした。また、反応機構を検討し、タンパク質基質分解反応はエステル基質分解反応と異なり、アシル化段階が律速であることを解明した。

2) 6 種の Fmoc-ペプチド基質、 $\text{Fmoc}-(\text{Glu})_n\text{Ala}-\text{OH}$ ($n=1-6$)、を合成し、これを基質とした速度論的解析により、本酵素が S_1' , S_1 サブサイト以上に 4 つのサブサイト (S_2-S_5) を有することを明らかにした。また、そのサブサイトと基質の相互作用はきわめて強いことを明らかにした。

3) 合成した 6 種の Fmoc-ペプチドアミド、 $\text{Fmoc}-(\text{Glu})_n\text{Ala}-\text{NH}_2$ ($n=1-5$) および $\text{Fmoc-Lys}(\text{Glu})_3\text{Ala}-\text{NH}_2$ 、を基質としたときの反応特性より、本酵素がペプチドアミド基質を認識するときには、水素結合ネットワーク以上にサブサイトとの強い相互作用が重要であることを示した。

以上のように、本研究は、カルボキシペプチダーゼ Y におけるサブサイトの構造およびその役割を解明するとともに、タンパク質基質分解反応は、アシル化段階が律速となることを証明し、本酵素の触媒機構に関して重要な知見を得たものであり、生体高分子化学、構造生物学およびタンパク質工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12年9月14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。