

氏 名	上 原 由 紀 子 うえ はら ゆ き こ
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 300 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Structure and Function of <i>Streptomyces</i> Subtilisin Inhibitor Using Fluorescence as a Probe (蛍光を指標としたストレプトマイセスズブチリシンインヒビター の構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 廣海啓太郎 教 授 千葉英雄 教 授 森田雄平

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、放線菌の1種が生産する蛋白性のプロテアーゼ阻害物質、*Streptomyces subtilisin inhibitor* (以下 SSI と略称) の構造の特性と、SSI が蛋白分解酵素であるズブチリシン BPN' と結合する際の特性と、主として蛋白質の蛍光を指標として解明したもので、2 部に分けることができる。

〔I〕 SSI の構造の特性について。

SSI は蛋白質としては稀にしか見られぬ特徴的な蛍光スペクトルをもつことを見出し、トリプトファン残基の蛍光が著しく消光されていることを明らかにした。

また、溶媒の pH の低下による SSI の立体構造の変化と、pH を中性に戻すことによる変性の復元の過程を、蛍光変化を指標として、ストップフロー法により測定し、速度論的解析を行い、この過程を説明しうる反応機構を提唱し、その各段階の平衡論的及び速度論的パラメーターを求めた。さらに、この反応機構を、SSI の立体構造モデルと対応させて微視的に具体的に説明することを試み、妥当な解釈を示した。また、この酸変性と復元には、SSI の阻害活性の喪失と回復が伴うことを見出し、活性保持に關する構造変化の段階を、反応速度定数に基づいて推定した。

〔II〕 SSI とズブチリシン BPN' との結合の特性について。

この結合に際して、トリプトファン残基由来の蛍光が増大することを見出し、これを指標として光子計数法を用いることにより、 10^{-9} M 程度の稀薄溶液での結合平衡の静的測定を行い、 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ M という低い解離定数を、直接的な滴定により求めることに成功した。さらに解離定数の温度依存性より結合の熱力学的諸量を求め、この反応がいわゆる“エントロピー駆動”であることを明らかにした。

またこの蛍光増加を指標として、結合反応過程につき、ストップフロー法により速度論的解析を行い、この結合が少なくとも2段階からなる過程を経て進行することを示し、それぞれの段階の速度論的定数を求め、さらに結合反応速度定数の温度依存性から、結合の活性化熱力学量を求めた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、蛋白質の構造とその変化を鋭敏に反映する蛋白質蛍光を測定の主たる指標として、放線菌が生産する蛋白性のプロテアーゼ阻害物質、*Streptomyces subtilisin inhibitor* (以下 SSI と略称) の構造と機能に関し、種々の特色ある成果を著述したものである。

すなわち著者は、SSI の特徴的な蛍光スペクトルと、溶媒の pH の低下と復元に伴うこの蛍光の可逆的变化とを見出し、これを指標として、SSI の酸による可逆的構造変化の速度論的解析を行い、また、この構造変化には、SSI の阻害活性の喪失と回復が伴うことを見出した。著者はこれらを統一的に説明できる SSI 構造変化の反応機構を提唱し、この反応機構を、X線結晶解析に基づく SSI の立体構造モデルと対応させて微視的に説明しようとし、また、反応速度定数の比較から、活性保持に関与する構造変化の段階を推定した。これらの機構および解釈は十分に納得のいくものである。蛋白質の変性復元の機構に関して、この様に微視的かつ具体的な解明を行い得た例は極めて稀であり、さらに、蛋白質の活性との対応を明らかにし得た例は甚だしい。本研究は、蛋白質化学と反応速度論とが見事に結合して興味深い成果を挙げることができた好例といえよう。

一方、著者は、SSI と酵素ズブチリシン BPN' との結合に際して蛍光強度の増大を見出し、これを指標として、 10^{-10} ~ 10^{-11} M の極めて小さい解離定数を直接滴定により求め得た。蛋白性プロテアーゼ阻害物質について、直接滴定によりこの様に強い結合を証明し得た例は他にはない。さらに著者は、この酵素 SSI 間の結合がいわゆる“エントロピー駆動”であることを証明したが、このことは、近年他の蛋白-蛋白間相互作用系においてもようやく明らかにされつつあるところであり、特異的でかつ強い蛋白-蛋白間相互作用における溶媒(水)の構造の寄与を示唆するもので、重要かつ甚だ興味深い。

また、著者がこの蛍光増加を指標として速度論的解析から明らかにした事実、すなわち酵素-SSI の結合が少なくとも2段階からなる過程を経て進行するという点は、蛋白性プロテアーゼ阻害物質に関しては、これまでに動物起源および植物起源のもの各1種のみについて明らかにされているだけであり、微生物起源の阻害物質については、ここに初めて立証されたのである。

本論文はこの様に、SSI の構造と機能の特色について、詳しくかつ特色ある解析を行い、極めて有用な種々の新知見を明示しており、その研究内容は該当分野の第一級の水準にあるものと言える。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。