

氏 名	藤 井 茂 ふじ い しげる
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 680 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 56 年 3 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	水溶液中における <i>Streptomyces</i> ズブチリシンインヒビターの 構造に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 波多野博行 教 授 香月裕彦 教 授 丸山和博

論 文 内 容 の 要 旨

本論文の研究はストレプトマイセスズブチリシンインヒビター (*Streptomyces Subtilisin Inhibitor*, SSI と略す) の水溶液中での動的構造を研究したもので、ヒスチジン、およびチロシン残基の存在状態をプロトン核磁気共鳴法を用いて明らかにし、その周辺のアミノ酸残基との関連を調べたものである。SSI は113個のアミノ酸残基よりなる均等な単量体二個が会合した二量体であり、微生物を起源とするアルカリ性セリンプロテアーゼを阻害するタンパク質性阻害剤である。SSI はまた、非常に高い熱安定性を持ち、その結晶構造はすでに明らかにされている。

本研究においては、まずこの非常に高い熱安定性を利用して、単量体当たり二個存在するヒスチジン残基 (His 43, 106) のそれぞれの C_2 -プロトンを選択的に重水素化することに成功した。この重水素化された試料を用い、酸変性過程を定量的に解析した結果、酸変性過程は可逆的に未変性状態から、少なくとも一つの部分的に構造の崩れた中間状態を経て、大部分の構造の崩れた状態となることが明らかになった。さらに、その酸変性過程の Hill 係数より、中間状態への過程は、His 106 の近くに存在する一つの残基および Glu 102 に起因する局所的な変性過程であるのに対し、変性状態への過程は、C 末端の Phe 113, Asp 52, His 43 を含む 4~5 個の残基の協同的なプロトン付加による、疎水性残基の集まった中心核の大部分の構造変化を伴った変性過程であることを明らかにした。

次に、テトラニトロメタンを用いたチロシン残基のニトロ化反応と各チロシン残基を含むペプチドの分離、分析により、pH8.8:30°C では、Tyr93 は非常にニトロ化され難いが、Tyr7 および Tyr75 はともに容易にニトロ化されることも明らかにした。この非常にニトロ化され難い Tyr93 は異常に高い pK_a の値 (25°C で ≥ 12.6) を持ち、そのうえ $C_{2,6}$ -プロトンと $C_{3,5}$ -プロトンとの共鳴位置が、中性領域においても、フェノール性水酸基が解離した状態の遊離のチロシンの共鳴位置に非常に近いことが明らかとなった。これらの結果から、Tyr 93 は水溶液中においてプロトン供与体として水素結合に関与していると考えられる。一方、Tyr 7 および Tyr 75 はともに容易にニトロ化されることより、分子表面に存在す

ることが明らかとなった。しかしながら、これら二個のチロシン残基を比べると、pH 8, 10°C においては、Tyr 7 の方が Tyr 75 よりもかなり速くニトロ化されることも明らかになった。このことは NMR スペクトルの線形から明らかのように Tyr 7 の方が C_β - C_γ 軸に対してより速く回転していることを示している。さらに 25°C の Tyr 7 の pK_a の値は 10.95, Tyr 75 は 11.8 であり、Tyr 7 の方が遊離のチロシンの値に近いという結果から、水溶液中においては Tyr 7 の方が Tyr 75 よりも自由な環境に存在することが明らかとなった。この結果は、結晶状態では Tyr 75 の方が Tyr 7 よりも自由な環境に存在するという結果と全く逆である。以上の結果から、分子表面にあって、ある程度の運動性を持つ部分の溶液中での動的構造は結晶中での構造と著しく異なっていることがあることが証明された。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の構造は従来、その単結晶について X 線回折法で明らかにされてきた。しかしながらタンパク質がその生物学的機能を発現する場においては、単結晶状態に存在することを考えることはできないので、溶液中で低分子や高分子の種々の多くの化合物と相互作用する状態での構造すなわち動的構造と呼ばれる状態を明らかにしなければならない。本論文の研究において申請者はその水溶液中での動的構造に関連するいくつかのアミノ酸残基の存在状態をプロトン核磁気共鳴法を用いて研究する方法を用いている。

申請者はストレプトマイセスズブチリシンインヒビター (Streptomyces Subtilisin Inhibitor, SSI と略す) を研究の対象としているが、これは 1972 年に村尾らによって発見されたタンパク質で、微生物中に存在するアルカリ性セリンプロテアーゼを特に強く阻害するタンパク質性阻害剤である。このタンパク質は非常に高い熱安定性を持つ均等な単量体二個が会合した二量体であり、その単量体は 113 個のアミノ酸残基より成ることが知られており、その構造は X 線回折法によって明らかにされている。

申請者はこの非常に高い熱安定性を利用して、単量体当たり二個存在するヒスチジン残基 (His 43, 106) の C_α -プロトンを選択的に重水素化することに成功し、これら重水素化された試料を用いて、酸変性過程を定量的に解析している。その結果、酸変性過程は可逆的に未変性状態から、His 106 の近くに存在する Glu 102 に起因する部分的に構造の崩れた中間状態を経て、C 末端の Phe 113, Asp 52 および His 43 を含む 4~5 個の残基の協同的なプロトン付加による、疎水性中心核の大部分の構造の崩れた状態になることを明らかにしている。またチロシン残基のニトロ化反応の速度の差を測定し、Try 93 は非常にニトロ化され難いが、Try 7 および Tyr 75 はともに容易にニトロ化されること、および Tyr 7 の方が Tyr 75 よりも速くニトロ化されることを明らかにしている。また Tyr 93 は異常に高い pK_a 値を持ち、そのうへ、 $C_{\alpha,\beta}$ -プロトンと $C_{\beta,\gamma}$ -プロトンの共鳴位置が遊離のチロシンのそれに非常に近いことから、Tyr 93 は水溶液中においてプロトン供与体として水素結合に関与しており、さらに Tyr 7 および Tyr 75 はともに容易にニトロ化されることより、分子表面に存在するという存在状態を明らかにしている。しかしながら、Tyr 7 と Tyr 75 とを比べると Tyr 7 の方が C_β - C_γ 軸に対してより速く回転しており、 pK_a 値が遊離のチロシンの値に近いのは Tyr 7 であるから、水溶液中においては Tyr 7 の方が Tyr 75 よりも自由な環境に存在すると考えられる。結晶状態では Tyr 75 の方が Tyr 7 よりも自由な環境に存在するとされているが、本論文に示された研究結果はそれと全く逆であるといえる。タンパク質分子の表面に存在してある

程度の運動性を持つ部分の溶液中での動的構造は、結晶中での静的構造から単純に類推することができず、本論文に述べられた研究結果は水溶液中の動的構造が結晶中での構造と異なっていることがあるということを示した点で極めて興味深い結論が得られたものといえる。

これらの成果は生物化学，とくに酵素化学の分野に極めて興味ある知見を加えただけでなく，広く生物物理化学の分野においても，タンパク質の溶液中での動的構造が結晶構造とは異なる点があることを証明したもので，これらの分野の進歩に大きな貢献をしたものと言える。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。