

氏 名	む 牟 田 祐 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1468 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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 食 品 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Comparative Studies on the Catalytic Mechanism of Human Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin) and a Bacterial Metalloproteinase, Thermolysin (ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ7, マトリライシンおよび細菌メ タロプロテイナーゼ, サーモライシンの触媒機構に関する比較研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 上 國 世 教 授 大 東 肇 教 授 安 達 修 二

論 文 内 容 の 要 旨

マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、細胞外マトリックスタンパク質を分解する亜鉛プロテイナーゼであり、一群のファミリーを形成している。MMP は組織破壊をとまなう炎症や癌の転移浸潤に関与することが示唆されており、触媒機構の解明や阻害剤の開発が期待されている。MMP-7 (マトリライシン, MLN) は、触媒ドメインのみからなる分子サイズが最小 (19kDa) の MMP であり、MMP の触媒機構を解明するうえでの基本モデルとなりえる。一方、細菌の亜鉛プロテイナーゼ、サーモライシン (TLN) は好熱性と好塩性を示し、人工甘味料アスパルテムの前駆体の工業的合成に利用されている。本研究は、MLN の触媒機構を解明するため、酵素化学的手法により MLN と TLN の触媒特性を比較検討したものである。その主な内容は以下のとおりである。

1. MLN および TLN 活性に対する塩の効果：静電的性質が異なる 3 種類の合成基質を用いて、MLN と TLN の塩による活性化を速度論的に比較検討した。両酵素の活性は NaCl 濃度の増大に対して指数関数的に増大した。荷電性基質の場合、塩による活性化は二相性を示し、酵素-基質間の静電的相互作用の関与が示唆された。塩による活性化は、MLN ではミカエリス定数 (K_m) の減少に、TLN では分子活性 (k_{cat}) の増大に起因していた。以上のことから、塩による活性化機構は酵素および基質の静電的性質に依存することが示された。

2. MLN および TLN 活性に対するアルコールの効果：両酵素の活性に対するアルコール (炭素数 1-5) の添加効果を速度論的に比較検討した。両酵素活性はアルコールにより阻害され、その阻害様式は拮抗型であると判断された。各アルコールの阻害物質定数 (K_i) と MLN および TLN の基質特異性とはよく対応し、アルコールは両酵素の基質認識に最も重要な疎水的サブサイト (S1' 部位) に結合すると考えられた。いずれのアルコールについても MLN に対する阻害活性は TLN に比べて10分の1以下であった。以上のことから、一連のアルコールを阻害剤とした速度論的解析は金属プロテイナーゼの基質認識機構の解明において有用であることが示唆された。

3. MLN 活性の pH 依存性の改変：MLN 活性は極めて広い至適 pH (pH5~10) をもつベル型の pH 依存性を示した。活性発現機構の詳細な知見をえるため、活性の pH 依存性に対する Tyr 残基のニトロ化とアミノ化の効果を検討した。MLN に 8 個存在する Tyr 残基はテトラニトロメタンにより最大 5 個までニトロ化され、塩基性側の pK_a (pK_2) が 0.7pH 単位上昇した。このことから、ニトロ化された Tyr は活性解離基ではないと考えられた。また、4~5 個の Tyr がニトロ化された MLN の活性は pH7 以下で 60% に低下し、pH6 付近に肩をもつ非ベル型の特徴的な pH 依存性を示した。一方、アミノ化により、 pK_2 のシフトは回復し、特徴的な pH 依存性はベル型に回復した。化学修飾を駆使することにより、酵素活性の pH 依存性を人為的に大きく改変できることが示された。

4. MLN の活性部位 Tyr-219 の役割：MLN の活性発現に対する Tyr 残基の役割を解明するため、活性中心近傍に存在する Tyr-219, Tyr-216, Tyr-193 を部位特異的変異導入により Phe に置換し、変異型 MLN (Y219F, Y216F,

Y193F)の活性を検討した。各変異型酵素は野生型酵素の50%以上の活性を保持し、そのpH依存性がベル型であったことから、これらのTyr残基は塩基性側の活性解離基としては除外された。しかし、Tyr-219の変異体(Y219F, Y219D, Y219A, Y219C, Y219S)では、酸性側、塩基性側ともに活性の至適pH域が野生型に比較して約1pH単位ずつ狭まった。以上のことから、Tyr-219は活性発現には直接関与しないものの、MLNの幅広い至適pHを特徴付けるうえで重要な役割を果たすと考えられた。

5. MLN活性に対するリグナンの効果：リグナンは植物界に広く存在するフェニルプロパノイド二量体である。matairesinolを基本構造とした9種のリグナン類はMLN活性を阻害し、その阻害様式は拮抗型であった。しかし、lactone環を含まないsecoisolariciresinolは阻害を全く示さなかったことから、MLN活性の阻害に対してdibenzylbutyrolactone骨格の重要性が示された。MMP活性に対するリグナン類の阻害効果と構造活性相関が明らかにされ、リグナンを基本骨格とするMMP阻害剤の開発の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)は、細胞外マトリックスタンパク質を分解する亜鉛プロテイナーゼであり、一群のファミリーを形成している。MMPは癌の転移や浸潤との深い関連性から、その触媒機構の解明や阻害剤の開発が期待されている。本研究は、分子サイズが最小のMMPであるマトリライシン(MLN)の触媒機構の解明を目的として、MLNの触媒特性を細菌由来の代表的な亜鉛プロテイナーゼであるサーモライシン(TLN)の触媒特性と比較検討したものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. 塩によるMLNおよびTLNの活性化機構を比較検討した。塩による活性化は、MLNではミカエリス定数(K_m)の減少に、一方、TLNでは分子活性(k_{cat})の増大に起因するものであり、その機構は両酵素で異なることが示された。
2. MLNおよびTLNの活性に対する炭素数1～5のアルコールの添加効果を比較検討した。アルコールは両酵素を拮抗的に阻害し、アルコールの阻害物質定数 K_i と両酵素の基質特異性との関係から、アルコールは疎水的なS1'部位に結合すると考えられた。金属プロテイナーゼの疎水的な基質結合部位の解析において、一連のアルコールを用いる速度論的解析の有用性が示唆された。
3. MLNの活性解離基に関する知見をえるため、活性のpH依存性に対するTyr残基のニトロ化とアミノ化の効果を検討した。MLNに存在する8個のTyr残基のうち、ニトロ化された5個は活性解離基ではないことが示された。また、これらのTyr残基のニトロ化により、酸性領域に肩をもつ非ベル型の特徴的なpH依存性が観測され、化学修飾により酵素活性のpH依存性を大きく改変できる可能性が示された。
4. 活性中心近傍に存在するTyr-219, Tyr-216, Tyr-193を部位特異的に改変し、MLNの活性発現に対するTyr残基の役割を検討した。Tyr-219, Tyr-216, Tyr-193は塩基性側の活性解離基として直接活性に関与しないが、Tyr-219はMLNの幅広い至適pHを特徴付ける重要な残基であることが示唆された。
5. 植物界に広く存在するリグナン類のMLN活性に対する阻害効果を検討した。MLN活性はdibenzylbutyrolactone構造をもつリグナンにより阻害されることが示され、阻害様式は拮抗型であった。今後、リグナンを基本骨格としたMMP阻害剤の開発の可能性が期待される。

以上のように、本論文はマトリライシンの触媒機構および阻害剤の探索と設計に関する多くの重要な知見をえたことに加え、本酵素が関与する癌の転移・浸潤の抑制に関して有用な洞察を加えたものであり、酵素化学、生命有機化学、および農産製造学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17年1月17日、論文なら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。