The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | セラチア・プロテアーゼ，N－末端部278残基，C－末端ペプチドの構造，および亜鉛結合部位と活性部位残基を含む各種C－末端ペプチドのアミノ酸配列 |
| Author(s) | 李，仁淑 |
| Citation | 大阪大学，1985，博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34603 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

| | |
|---|---|
| 氏名・（本籍） | 李（い） 仁（いん） 淑（すく） |
| 学位の種類 | 理　学　博　士 |
| 学位記番号 | 第　6768　号 |
| 学位授与の日付 | 昭和60年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科　生物化学専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **セラチア・プロテアーゼ，N—末端部278残基，C—末端ペプチドの構造，および亜鉛結合部位と活性部位残基を含む各種C—末端ペプチドのアミノ酸配列** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授　松原　央<br>（副査）<br>教授　倉橋　潔　教授　池中　徳治 |

## 論文内容の要旨

セラチア・プロテアーゼは分子量が約46,000の亜鉛を必要とする金属酵素である。分子中には1分子のメチオニンを含んでいる。このプロテアーゼの構造と機能を明らかにするために，一次構造の解析を行った。

亜鉛を除いたアポ，プロテアーゼをブロムシアンで切断し，SDS-PAGE によって分子量を測定した。N—末端半分とC—末端半分の分子の質量はそれぞれ25KDaと26.4 KDaであった。もとのプロテアーゼをブロムシアンで切断し，分離精製したN—末端半分をトリプシン，スタフィロコッカスV8のプロテアーゼおよびキモトリプシンで消化し，アミノ酸配列の決定に用いた。また，もとのプロテアーゼをトリプシンおよびV8プロテアーゼで消化し，得られた小ペプチドを用い，一次構造の決定を行った。このようにして決定したN—末端278残基の一次構造は次の通りである。

Ala–Ala–Thr–Thr–Gly–Tyr–Asp–Ala–Val–Asp–Asp–Leu–Leu–His–Tyr–His–Glu–Arg–Gly–Asp–Gly–Ile–Gln–Ile–Gly–Asp–Lys–Asp–Ser–Phe–Ser–Asn–Glu–Gln–Ala–Gly–Leu–Phe–Ile–Thr–Arg–Glu–Asn–Gln–Thr–Trp–Asp–Gly–Tyr–Lys–Val–Phe–Gly–Gln–Pro–Val–Lys–Leu–Thr–Phe–Ser–Phe–Pro–Asp–Tyr–Lys–Phe–Ser–Ser–Thr–Asn–Val–Ala–Gly–Asp–Thr–Gly–Leu–Ser–Lys–Phe–Ser–Ala–Glu–Gln–Gln–Gln–Gln–Ala–Lys–Leu–Ser–Leu–Gln–Ser–Trp–Ala–Asp–Val–Ala–Asn–Ile–Thr–Phe–Thr–Glu–Val–Ala–Ala–Gly–Gln–Lys–Ala–Asn–Ile–Thr–Phe–Gly–Asn–Tyr–Ser–Gln–Asp–Arg–Pro–Gly–His–Tyr–Asp–Tyr–Gly–Thr–Gln–Ala–Tyr–Ala–Phe–Leu–Pro–Asn–Thr–Ile–Trp–Gln–Gly–Gln–Asp–Leu–Gly–Gly–Gln–Thr–Trp–Tyr–Asn–Val–Asn–Gln–Ser–Asn–Val–Lys–His–Pro–Ala–Thr–Glu–Asp–Tyr–Gly–Arg–Gln–Thr–Phe–Thr–His–Glu–Ile–Gly–His–Ala–Leu–

Gly–Leu–Ser–His–Pro–Gly–Asp–Tyr–Asn–Ala–Gly–Glu–Gly–Asn–Pro–Thr–Tyr–Arg–Asp–Val–Thr–Tyr–Ala–Glu–Asp–Thr–Arg–Gln–Phe–Ser–Leu–Met–Ser–Tyr–Trp–Ser–Glu–Thr–Asn–Thr–Gly–Gly–Asp–Asn–Gly–Gly–His–Tyr–Ala–Ala–Ala–Pro–Leu–Leu–Asp–Asp–Ile–Ala–Ala–Ile–Gln–His–Leu – Tyr – Gly–Ala–Asn–Leu–Ser–Thr–Arg–Thr–Gly–Asp–Thr–Val–Tyr–Gly–Phe–Asn–Ser–Asn–Thr–Gly–Arg–Asp–Phe–Leu–Ser–Thr–Thr–Ser–Asn–Ser–Gln–Lys.

もとのプロテアーゼをトリプシン消化して得られたペプチド中にC—末端由来のものと考えられる1つのペプチドがあった。このペプチドはブロムシアンで切断して得られたC—末端半分のC—末端構造と一致したので，C—末端ペプチドと判断しそのアミノ酸配列を決めた。そのペプチドの構造はIle–Val–Gly–Gln–Val–Asp–Val–Ala–Thr–Asp–Phe–Ile–Valであった。このプロテアーゼは同じく金属酵素であるサーモリシンとやや類似した基質特異性をもっている。そこでこのプロテアーゼとサーモリシンの類似性を検討する目的で2つの酵素の構造を比較した。その結果，N—末端側に亜鉛を結合すると考えられるHis—176とHis–180およびC—末端側のペプチド断片にもう1つの亜鉛結合部位と考えられるGlu残基がみつかり，かつまた活性部位と考えられるHis残基を発見した。本研究ではこれらの構造の比較も論じた。

## 論文の審査結果の要旨

カイコの腸管に生息するセラチア菌は菌体外プロテアーゼを生産する。このものは亜鉛を必要とする分子量約46,000の蛋白質で，その基質特異性は中性金属アミノペプチダーゼのそれとやや類似しており亜鉛をもつという共通点を示している。またこのものは医療用にも広く用いられており，機能的にも興味のあるもので，構造を知ることは重要である。李さんは従来の報告に成るS含有アミノ酸の欠如という成績を再検討したところ，メチオニンを1残基含むことを発見し，これに注目してBrCN分解を行ったところ，幸にも46,000の分子（これも従来は60,000と報告されていた）の丁度真中から2つに切断することに成功し，先ず，そのN－末端側半分の構造決定を，次いでC—末端側半分の構造決定を行い，さらに全分子の各酵素分解にて生じた各種ペプチドの構造決定を行い，241残基目に位置するメチオニンから，さらにC—末端側へ構造を延長させN—末端より278残基までの配列を完成した。さらにC—末端側のペプチドを単離し，C—末端構造12残基を決定した。さらに4つのC—末端側ペプチドを単離し総数216残基のC—末端側アミノ酸を回収しえた。これは殆んどの元のアミノ酸組成に相当するので，僅かなのものを含めてあとはこれら4つのペプチドをつなぐのみとなった。この段階でメタロアミノペプチダーゼと比較したところ，亜鉛に結合するアミノ酸残基His–176，His–180およびもう1つのGlu（C—末端側ペプチドの中）が対応する残基であることを発見した。さらに活性部位と考えられているHisの位置も推定することに成功した。これらの残基の周辺構造は$\alpha$—ヘリックスまたは$\beta$構造を示しているが，メタロアミノペプチダーゼのそれと共通しており，恐らくこの2つの酵素は同じような機構で活性を示すものと推定できる。これらの結果は現在立体構造の解析が進行しつつある中で，それに対して有用な知見を提供するばかりでなく，各種生物機能と構造との関係を知る上で大きく貢献するものと

考えられる。従ってこの論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。