

Title	セラチアプロテアーゼのX線回折法による構造研究
Author(s)	勝矢, 良雄
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36391">https://hdl.handle.net/11094/36391</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	かつ	や	よし	お
	勝	矢	良	雄
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8550	号	
学位授与の日付	平成元年	3月	24日	
学位授与の要件	理学研究科高分子学専攻 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のX線回折法による構造研究			
論文審査委員	(主査) 教授	勝部 幸輝		
	(副査) 教授	寺本 明夫	教授	高木 俊夫
	助教授	松浦 良樹	教授	小高 忠男

論文内容の要旨

セラチアプロテアーゼは酵素活性部位に亜鉛を有する分子量50,632のエンド型金属プロテアーゼである。この酵素の機能を立体構造の立場から理解するために、X線回折法による構造研究を結晶および溶液の両状態において行なった。

結晶化は透析法および蒸気拡散法によって試み3種類の結晶を得た。このうちX線回折実験に最も適したものは polyethyleneglycol 共存下で硫酸アンモニウムによる透析法によって結晶化したものであった。この結晶に対して重原子誘導体結晶の調製を試みて、硝酸サマリウム誘導体と塩化ジスプロシウム誘導体を得ることができた。結晶の単位格子の一軸が  $151.0\text{\AA}$  と長いため、四軸型回折計により高分解能の回折強度データを精度よく収集することは困難であった。そこで、最近開発されつつある振動写真によるデータ収集法を検討し、独自の振動写真によるデータ収集システムをつくり、この方法と四軸型回折計による方法を併用することにより  $2.5\text{\AA}$  分解能までの回折強度データを収集した。しかし、上記の二種の誘導体とも、その重金属の位相決定への寄与が小さく、振動写真法と四軸型回折計法の長所を組み合わせた場合でも  $3.0\text{\AA}$  分解能の解析が限界であった。

通常と同型置換法によって得られた  $6.0\text{\AA}$  分解能の電子密度図から、分子がほぼ同じ大きさの二つのドメインからなることを明らかにした。 $3.0\text{\AA}$  分解能の電子密度図の S/N は低くその解釈が困難であったので、電子密度図の改良を試みた。従来の solvent flattening 法は有効でなかったため、新しい solvent flattening 法を開発し適用した。その結果、一つのドメインは4本の $\alpha$ -ヘリックスを含む構造であり他方のドメインは2枚の $\beta$ -シートと1本の $\alpha$ -ヘリックスを含む構造であることが明らかになった。亜鉛イオンはドメインの間に位置することがわかった。セラチアプロテアーゼとサーモリシン

の間には活性残基を除き、一次構造上の類似性が乏しいにもかかわらず、両者の活性部位をとりまく構造は互に類似していることが判明した。これは convergence evolution によるものと考えられる。

次にX線小角散乱実験によって、溶液中の native 酵素と亜鉛イオンを取り除いた apo 酵素の構造を検討したところ、apo 酵素においてはドメイン間の溝が広がることがわかった。このことは分子中の亜鉛イオンが酵素活性のみならず酵素分子の立体構造保持の上でも重要な役割を果たしている事を示唆している。

## 論文の審査結果の要旨

セラチア菌が産生する含亜鉛プロテアーゼは、生理学や薬理学の立場から立体構造の解析が望まれていた。

勝矢良雄君は、先ず、透析温度を不連続的に変化させるという独創的な手法によって、その結晶化に成功した。しかし、得られた結晶の格子定数の一つが  $150 \text{ \AA}$  と長く、通常の自動四軸型回折計では  $3 \text{ \AA}$  以下の高分解能の回折データ収集が困難であったため、振動写真法の新しい一貫システムを開発することによって  $2.5 \text{ \AA}$  分解能のデータ収集を行なった。

自動四軸回折計で得た  $3 \text{ \AA}$  分解能までの回折強度データを用い、異常分散効果と組合せた単一同型置換法によって得られた電子密度分布は、 $S/N$ が悪く、その解釈が困難であった。そこで、溶媒領域の電子密度を平坦化するという新しい方法を考案して電子密度分布の  $S/N$ の改良を図るとともに、振動写真法で得た  $2.5 \text{ \AA}$  分解能までのデータを用いて高分解能の電子密度分布を求めため、位相の拡張をも図った。その結果、本酵素の基本的な立体構造を知るに足る十分な電子密度分布を得た。得られた構造は、二つのドメインからなり、これらのドメインは一本の  $\alpha$ ヘリックスと亜鉛イオンで結ばれている。本酵素の立体構造は、類似機能を有するサーモリシンの立体構造と、活性部位である亜鉛イオン付近の構造を除いては全く異なるものであり、これら二つの酵素は進化的にみて機能収斂の関係にあるとした。

亜鉛イオンを除去したアポ酵素について、X線溶液散乱法によって検討した結果、アポ酵素においては、各ドメイン内構造は亜鉛イオンをもつ酵素のそれと同じであるが、ドメイン間の接触距離が広がることを認めた。以上の結果から、亜鉛イオンは触媒反応に直接関与するのみならず、ドメイン間の構造を一定に支え、基質との複合体形成に対して重要な役割を果たしていると結論した。

このように、勝矢良雄君の研究は、X線結晶解析法に対する新しい方法論の開発、また、その適用によって得られたセラチア・プロテアーゼの構造に関する知見は、蛋白質結晶学の発展に大きく貢献したと言える。したがって、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。