

Title	Structure and Function of Streptomyces erythraeus Trypsin-Molecular Cloning and Site-Directed Mutagenesis of the Structural Gene
Author(s)	長束, 優子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38076
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	長 束 優 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 4 2 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 9 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科 有機化学専攻
学 位 論 文 名	Structure and Function of <i>Streptomyces erythraeus</i> Trypsin-Molecular Cloning and Site-Directed Mutagenesis of the Structural Gene (放線菌トリプシンの構造と機能 —構造遺伝子のクローン化と特異的構造改変)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 崎山 文夫 (副査) 教 授 福井 俊郎 教 授 長谷 純宏

論 文 内 容 の 要 旨

Streptomyces erythraeus が産生するトリプシン (SET) は分泌性のセリンプロテアーゼで、アルギニンとリジンの C 末端側でペプチド結合を加水分解する触媒活性を持っている。本酵素の構造と機能発現機構について解明することを目的として、まず遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を決定して SET の前駆体の構造を明らかにした。次にリジル結合のみに特異的に作用する *Achromobacter* プロテアーゼ I (API) の基質特異性決定基を部位特異的変異法を用いて SET に導入し、得られた変異体の構造と性質を解析することにより、両プロテアーゼの基質特異性の違いの構造基盤について考察するとともに、SET の基質特異性変換を試みた。

1. SET 遺伝子のクローニングと発現

ポリメラーゼチェーンリアクション法により増幅した SET 遺伝子の一部をプローブとして *S. erythraeus* ゲノム DNA から SET 遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定した。SET 遺伝子は既知の一次構造の N 末端に 42 残基、C 末端に 3 残基の延長配列を持つ 272 アミノ酸残基をコードしていた。SET 遺伝子を *Streptomyces lividans* TK 24 株を宿主として発現させたところ、培地中の遺伝子産物は N 末端に 12 残基の延長部分を持った不活性体 (プロ SET) であり、プロ SET はキモトリプシン限定分解により活性化成熟体に変換された。組換え体 SET は C 末端 Ser 1 残基の付加の他は *S. erythraeus* 由来の酵素と同一の構造を持っており、触媒特性と基質特異性についても差異のないことが確かめられた。これらの結果により、SET は N 末端に 42 残基のプレプロペプチドを持った前駆体として細胞内で合成され、細胞からの分泌過程で 30 残基のプレペプチドを失ってプロ SET に変換され、さらにキモトリプシン様プロテアーゼの作用を受けて成熟体へ変換されることが示された。

2. SET への API の基質特異性決定基の導入

SET の基質結合部位の S_1 ポケットの底部には Asp189 が存在しており、その負電荷とアルギニン及びリジン側鎖との静電的相互作用が SET の特異性を決定していると考えられる。一方、API の場合には Asp189 に対応する位置は Val で置換され、代わりにポケットの側壁に存在する Asp225 の側鎖がポケットの内部に突出してポケットの深さが約 2Å 浅くなっており、そのためにアルギニン側鎖は結合できないと考えられた。そこで API のリジン残基認

識のメカニズムがSET中でも機能し得るかどうかが調べるために、SET 遺伝子への部位特異的変異導入により Gly 226を Asp に、Asp189を Asn 又は Val に置換した変異型酵素を作成し、リジン及びアルギニン基質に対する作用を調べたところ、触媒活性は野生型酵素と比べて著しく低下していたもののリジン対アルギニンの選択性は上昇しており、新たに導入された Asp226がリジン残基に対する特異的決定基として機能し得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、放線菌トリプシンの構造と機能の関連性の解明を目的として行われたもので、クローン化した構造遺伝子およびその産物の分析により、本酵素のプレプロ体の構造を決定し活性化機構を解明した。さらに部位特異的に変異した酵素を作製し、基質特異性の発現には基質結合ポケット特定基が重要であることを明らかにした。これらは、トリプシン型酵素の機能発現機構の理解を深める重要な成果であり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。