OUKA
Osaka University Knowledge Archive

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	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38076
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 12 】

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 10421 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 *Streptomyces erythraeus* 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 *Achromobactor* 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

ポリメラーゼチェイ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な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。