



| | |
|--------------|---|
| Title | リジン特異的セリンプロテアーゼの基質特異性の発現機構 |
| Author(s) | 林, 聖一 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39913 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 林 聖 一 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 2 3 3 5 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 8 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | リジン特異的セリンプロテアーゼの基質特異性の発現機構 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 崎山 文夫 (副査) 教 授 谷澤 克行 教 授 長谷 純宏 |

論 文 内 容 の 要 旨

Achromobacter プロテアーゼ I (API) は、リジル結合を特異的に加水分解する哺乳類型セリンプロテアーゼである。API は一次構造が明らかな唯一のリジン特異的セリンプロテアーゼで、その厳密な基質特異性の仕組みの解明は、他のアミノ酸残基に特異性を改変した酵素変異体の創製への手がかりを与えることが期待される。本研究は、この酵素の厳密なリジン特異性の機構について重要な知見を得ることを目的とした。

トリプシンとの一次構造の比較から、リジン基質の側鎖と結合する負電荷の候補として、Glu190 と Asp225 が示唆され、まず、それらの残基に変異を導入した。Glu190 の負電荷を除いた変異体 [E190Q] と [E190L] は野生型酵素と同じ活性を保持した。一方、Asp225 の負電荷を除いた変異体は酵素としての活性を失った。負電荷を保持する変異体 [D225E] はリジン特異性をもつ活性な酵素であるが、酵素活性は $1/400$ に低下しており、その主因は K_m の増大 (140 倍) であった。これらの結果から、Asp225 は最も効果的な負電荷としてこの酵素の基質特異性に必須であると結論した。

つぎに、基質特異性を決定するアミノ酸残基が 225 位に存在すると仮定し、この残基に変異を導入し、基質特異性の変化の有無を調べた。この際、プロ酵素が自己消化的に活性化されることを考慮して、 -1 位と $+1$ 位の連結部を自己消化を受ける構造に変えた二重変異体について調べたが、予想に反して、これらの変異体の成熟体は得られず、基質特異性が 225 位残基の特性に限定されない可能性が示唆された。

API および API-TLCK 複合体の X 線結晶解析によると、API の S1-ポケット内部の Asp225 の側鎖カルボキシル基は近傍のアミノ酸残基との間で水素結合のネットワークを作っている。このネットワークでは Asp225 の OD2 と特定の水分子 W420 がそれぞれ Thr189 OG1, Ser214 OG, Trp182 NE1 と Asp225 OD1, Thr189 CO, Ser214 CO, Ser214 OG との水素結合に関与する。API-TLCK 複合体では、W420 の位置をリジン部分の側鎖のアミノ基が占める。以上の知見から、API の基質特異性と高い酵素活性には Asp225 以外に Thr189, Ser214, Trp182 との水素結合の関与が推定された。

Thr189 と Ser214 の側鎖の水酸基を除いた変異体 [T189V], [S214A] および [T189V, S214A] の酵素活性は、野生型に比べそれぞれ $1/4$, $1/3$, $1/46$ に低下した。この活性低下は K_m の増大によるが、各変異体の CD スペクトルや蛍光スペクトルには変化がなく、これらのアミノ酸置換による高次構造への影響は殆どないと思われる。また、TLCK と DFP に対する挙動も K_m のみの増大を支持した。したがって、API の基質結合力の低下は S1-ポケッ

トの水素結合のネットワークの部分的な破壊と微小な局所的な構造変化によると考えられる。一方, [W182F] の酵素活性は野生型酵素とほぼ同じであり, Asp225 (OD 2) と Trp182 (NE 1) との間の水素結合は基質結合には直接関与しない。

API の狭いリジン特異性と高い活性の発現には, Asp225 と基質リジンとの静電相互作用が必要であるが十分ではなく, S1-ポケット内の Thr189 や Ser214 が形成する水素結合による基質結合力の増強が必要であると結論された。

論文審査の結果の要旨

本研究は, リジン特異的セリンプロテアーゼの基質特異性の構造基盤の解明を目的として行われ, 本酵素のリジン特異性には活性部位の S1 ポケットに存在する Asp225 と基質のリジン側鎖との静電相互作用が必須であること, 高い酵素活性の発現には, この酸性基を中心とする水素結合ネットワークが関与すること, S1 ポケットはリジン側鎖の結合に最も適した構造を有することが明らかになった。これらの知見は, 本酵素の厳格な基質特異性の機構を理解する上で重要であり, 博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。