



Title	STUDIES ON STRUCTURE AND FUNCTION OF ZINC PROTEASES
Author(s)	栗栖, 源嗣
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40218">https://hdl.handle.net/11094/40218</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

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	栗栖源嗣
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第13104号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用精密化学専攻
学位論文名	STUDIES ON STRUCTURE AND FUNCTION OF ZINC PROTEASES (亜鉛プロテアーゼの構造と機能に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 甲斐 泰 教授 馬場 章夫 教授 園田 昇 教授 黒澤 英夫 教授 村井 真二 教授 小松 満男 教授 宮田 幹二 教授 坂田 祥光 教授 田川 精一

### 論文内容の要旨

本論文は、蛋白質X線構造解析法を用いて亜鉛プロテアーゼの構造と機能の相関を原子レベルで解明することを目的として行われたものであり、緒言と本論4章および総括で構成されている。

緒言では、本論文の背景、目的ならびに研究成果の概要について述べている。

第1章では、これまでに発見された亜鉛プロテアーゼのうち最も小型の放線菌 *Streptomyces caespitosus* 由来亜鉛プロテアーゼ (ScNP) の精製、および酵素化学的特性を決定している。さらに、蛋白質分子の熱安定性を評価するため温度を変えてCDスペクトルを測定し、ScNPの融解温度が67.1度であることを明らかにしている。また、マンガン、カドミウム、コバルトの各金属イオンに置換した金属置換体酵素を調製し天然型酵素の活性と比較したところ、マンガン置換体酵素が天然型に比べて約20%高い活性を示すを見出している。

第2章では、ScNPの結晶構造を1.6Å分解能、結晶学的信頼度因子16%の精度で決定し、ScNPがアスパラギン酸を亜鉛原子の配位子にもつ新しい分類に属する亜鉛プロテアーゼであることを解明している。また、カルシウムイオンが構造安定性に寄与していることから、カルシウムイオンの存在下では最適温度が上昇することと分子構造との相関を明らかにしている。

第3章では、これまでに構造解析されている亜鉛プロテアーゼとScNPの立体構造を比較し、ScNPの分子量が小さい理由および活性中心の構造比較から予想される反応機構について検討を行っている。

第4章では、より詳細な反応機構を構造化学的に解明するため新規な結晶学的手法の開発と適用を試みている。新しい構造解析法である時間分割構造解析実験を行うために緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* が産出する亜鉛プロテアーゼ (PaAP) の結晶化を行っている。PaAPを用いた時間分割実験では、pHの低い不活性な状態で基質とともに結晶化し、pHの高い反応開始溶液を流し始めて3分後にデータを収集しているが、この時間を短くすることで反応中間体の構造を捕える可能性があることを示している。次に、亜鉛プロテアーゼの反応機構を考察する上で重要な水素原子の位置を決定するため、超精密構造解析法の開発を行っている。その結果、ScNPの超精密構造解析が亜鉛プロテアーゼの水素原子の位置を決定した最初の例となっている。

以上のように、本研究では酵素化学的に新規なScNPおよびPaAPを対象とし、酵素化学的および結晶学的な方法により構造と機能との相関の解明を行っている。

総括では、本研究で得られた成果をまとめ、その意義を述べている。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、亜鉛プロテアーゼの立体構造を種々の蛋白質結晶構造解析法により高分解能で決定し構造と機能の相関関係について解明することを目的とした研究をまとめたものである。その主な成果は次の通りである。

- (1) 2種の亜鉛プロテアーゼ (ScNP および PaAP) について再現性よく結晶を得る方法を確立している。さらに、ScNP に関しては酵素化学的な特性を決定している。
- (2) ScNP に関しては重原子多重同型置換法により  $1.6\text{\AA}$  分解能という高分解能での構造解析に成功している。その結果 ScNP の活性中心の構造が、他の亜鉛プロテアーゼに見い出されていない新規な構造であることを明らかにしている。
- (3) 亜鉛プロテアーゼによる加水分解反応の機構をモデル化合物による研究をふまえて類推し、結晶構造解析により明らかになった構造との相関を解明している。
- (4) これまでの蛋白質結晶構造解析では蛋白質分子中の水素原子の位置を特定することは困難であったが、ScNP 結晶について波長の短いX線を線源に用いることにより、 $1.0\text{\AA}$  分解能という超高分解能でデータ収集を行っている。 $1.0\text{\AA}$  分解能での精密化の結果、亜鉛プロテアーゼ中の水素原子の位置を電子密度として世界で初めて確認することに成功している。
- (5) PaAP の結晶を使い、シンクロトロン放射光を用いて時間分割結晶構造解析に取り組み実験方法を確立し、ミリ秒のオーダーで亜鉛プロテアーゼの構造解析が可能であることを示している。

以上のように、本論文は蛋白質結晶構造解析法により亜鉛プロテアーゼの構造解析を行い、立体構造と機能の相関を解明し、さらに新規な蛋白質結晶解析法である時間分割結晶解析および超精密構造解析の解析法を確立している。これらの成果は生物無機化学および生物物理学の分野だけでなく、広く蛋白質工学の分野に対して貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。