



Title	高活性セリンプロテアーゼの芳香環スタッキングの役割
Author(s)	白木, 賢太郎
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41605">https://hdl.handle.net/11094/41605</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">大阪大学の博士論文について</a>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	白 木 賢 太 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 0 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	高活性セリンプロテアーゼの芳香環スタッキングの役割
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 関 口 清 俊  (副査) 教 授 後 藤 祐 児    教 授 谷 澤 克 行    助 教 授 乗 岡 茂 巳

## 論 文 内 容 の 要 旨

*Achromobacter* protease I (API) はキモトリプシン型セリンプロテアーゼに属す。APIは基質ペプチド鎖の種類によらず、厳密にかつ効率よくリジル結合のみを切断することから、一次構造解析のツールとして広く使用されている酵素である。APIは、1) 厳密なリジン特異性、2) 高活性、3) アルカリ側へシフトした至適 pH 領域、4) 高濃度変性剤への耐性、といった特徴のある酵素であり、酵素活性の発現機構を明らかにする研究対象として最適な酵素である。

APIの立体構造として興味深いのは、活性部位近傍に存在する His 210-Trp 169 による新規な芳香環スタッキングである。サブサイト S1 にヒスチジン (His 210) を持つのは API だけである。His 210 は Trp 169 とスタッキングしており、catalytic triad の Asp 113 と  $3.4\text{\AA}$  の距離にあるため、酵素活性に影響を与えていると考えた。本研究は、タンパク質工学的な手法を用いることで、APIの酵素としての特徴と芳香環スタッキングとの関連を明らかにすることを目的とした。

第1章では、APIの高触媒活性の分子機構としてスタッキングが果たす役割を論述した。1) His 210 によるペプチド鎖の種類に依存しない活性、2) Trp 169 による高触媒能、3) His 210-Trp 169 スタッキングによる効果的に機能するサブサイト、の3点が明らかになった。これらは全てトリプシンには見られず API にのみ見られる酵素学的な特徴であり、高触媒活性の分子基盤としてスタッキングが機能していることが明らかになった。

第2章では、APIのアルカリ側にシフトした活性の至適 pH 領域がスタッキングによって制御されていることを論述した。1) 野生型 API の活性の pH 依存性は二つの解離基が独立に解離して活性が生じる理論式に一致したが、H 210S や H 210A は一般的な His 57 の解離にのみ依存する一段階の理論式に一致した。2) catalytic triad の His 57N  $\delta 1$  プロトン NMR の測定から、pH 変化に伴って His 57N  $\delta 1$  プロトンは3種の環境を有した。以上の2点から、His 210 の解離が catalytic triad のプロトン化状態に影響を与え、その結果、至適 pH をアルカリにシフトさせていると考えられた。また、Trp 169 変異体の至適 pH 域を測定したところ、169 位の非極性アミノ酸のサイズが大きくなるほど至適 pH 域がアルカリにシフトしたことから、Trp 169 は局所誘電率を低下させることで Asp 113-His 210 の静電相互作用を強め、APIの活性がアルカリ側にシフトしていると考えられた。新規静電ネットワークの形成および溶媒からの隔離効果、というスタッキングの二つの役割によって、APIの至適 pH は約1.8 pH 単位アルカリにシフトしていることが明らかになった。

APIの活性部位近傍に見られた新規な芳香環スタッキングは極めて巧妙な分子機構として働き、APIの酵素活性の発現機構を特徴付けていることが明らかになった。本研究において得られた知見が酵素一般に応用可能であるか、また他の酵素の活性部位近傍に同じ機能を果たしている芳香環スタッキングが存在するのかといった応用が、今後の研究課題として考えられるだろう。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、高活性セリンプロテアーゼである *Achromobacter* Protease I (API) の持つ酵素学的な特徴と立体構造との関連を明らかにしたものである。具体的には、活性部位近傍に位置するヒスチジンおよびトリプトファン残基のスタッキング構造がAPIの示す高活性およびアルカリ側にシフトした至適 pH という二つの重要な特性を規定する因子であることを蛋白質工学的手法と構造生物学的手法を用いて解明することに成功している。本研究は、プロテアーゼの活性発現の分子機構の理解に大きく貢献するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。