

Title	Function and Structure of Achromobacter β -Lytic Protease with Potent Bacteriolytic Activity
Author(s)	李, 紹良
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43069
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	李 紹 良
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 15018 号
学位授与年月日	平成 11 年 12 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Function and Structure of <i>Achromobacter</i> β -Lytic Protease with Potent Bacteriolytic Activity (高活性溶菌酵素 <i>Achromobacter</i> β -lytic protease の機能と構造)
論文審査委員	(主査) 教授 関口 清俊 (副査) 教授 長谷 純宏 教授 谷澤 克行 助教授 乗岡 茂巳

論文内容の要旨

Achromobacter lyticus 由来溶菌酵素 Achropeptidase は卵白リゾチームより強い溶菌活性と広い溶菌スペクトラムを有する。この酵素は、グラム陽性菌のみならず、一部のグラム陰性菌をも溶解し、蛋白質も分解する。これらの特性は、Achropeptidase がリゾチームとは異なる溶菌機構を持つことを示唆している。そこで、私は、この Achropeptidase の特異な溶菌機構を解明するために、Achropeptidase から 2 種類の溶菌性プロテアーゼ、 α -lytic protease (alp) と β -lytic protease (blp)、を分離精製して、性質を同定した。さらに blp の一次構造を決定して、類似酵素との比較を行い、酵素活性に関与しているアミノ酸残基を化学修飾法を用いて同定した。

溶菌性プロテアーゼ blp はアルカリ性領域に溶菌活性とプロテアーゼ活性を示した。blp は *Micrococcus luteus* と *Staphylococcus aureus* に対して alp 及びリゾチームより強い溶菌活性を示し、クロロホルム処理した大腸菌にも作用した。blp は主に細胞壁ペプチドグリカン中の D-Ala-X 結合を切断し、Gly-Gly 結合をも分解した。以上の結果から、blp が Achropeptidase 溶菌活性の主成分であり、Achropeptidase の強い溶菌活性に貢献していると結論した。また、Achropeptidase の広い溶菌スペクトラムはグラム陽性及び陰性菌ペプチドグリカンに普遍的に存在する D-Ala-X 結合を blp が分解するためと考えられる。

blp は活性に必須な亜鉛を 1 個含有し、ペプチド基質の Gly-X 結合を特異的に切断したが、D-Ala-X 結合切断には作用しなかった。また、溶菌活性の至適 pH と塩濃度依存性はペプチダーゼ活性のものとは異なった。よって、ペプチド及びペプチドグリカンと blp との結合には各々異なるアミノ酸残基が関与していること、ペプチドグリカンにおける D-Ala-X 結合切断活性は S1 subsite 以外の相互作用によることが考えられる。高塩濃度が blp と基質ペプチドグリカンとの結合を阻害することは結合分析によって判明し、静電相互作用が基質結合に関与していることが明らかになった。Lys61 の ϵ アミノ基が TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) に修飾されると、blp と基質ペプチドグリカンとの結合が弱められた。また、CD スペクトルから、高塩濃度と TNBS 修飾は blp の二次構造に影響を与えないことが分かった。一方、Trp43 と Trp51 が NBS (*N*-bromosuccinimide) に酸化されると、溶菌活性及びペプチダーゼ活性が喪失し、二次構造も大きく変化した。以上の結果は、Trp43 と Trp51 が Lys61 と共に blp の基質結合部位を構

成する上で、活性なコンホメーションを維持するという非常に重要な役割を担っていることを示唆している。

blp は菌体内で374個のアミノ酸残基の前駆体として合成され、最終的に179個のアミノ酸残基の成熟体として細胞外へ分泌される。発現ベクターを用いた大腸菌の系でもこの前駆体は生合成されるが、溶菌活性が強いため、活性のある成熟体 blp の発現産物が得られなかった。blp は黄色ブドウ球菌に特異的な溶菌酵素 *P. aeruginosa* LasA とアミノ酸配列において約50%の相同性を示すが、Lys61 と Trp43 は LasA には保存されていない。このことから、両残基が blp の強い溶菌活性と広い溶菌スペクトラムに貢献していると考えられる。また、両酵素間に保存されている STG-PHXHXSL 配列が carbonic anhydrase の亜鉛結合部位のアミノ酸配列と類似していることは、この配列内の二つの His が亜鉛のリガンドであることを示唆している。

現在同定されている溶菌性プロテアーゼは、種類が少なく（二種類、*P. aeruginosa* LasA と *S. simulans* lysostaphin）、しかも黄色ブドウ球菌にしか作用しない。また、blp が *P. aeruginosa* LasA と共に亜鉛酵素の新しいサブファミリーを形成していることは既に提唱されている。本研究で得られた知見は、このサブファミリーに属する酵素の作用機構に関する理解を深めただけでなく、blp が新規の抗菌剤或いはペプチドグリカンの断片化酵素として広く利用される可能性があることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

申請者は、グラム陰性菌の一つである *Achromobacter lyticus* が産生する強力な溶菌酵素 (*Achromobacter* β -lytic protease) を分離精製し、これが広い溶菌スペクトラムをもつ亜鉛プロテアーゼであることを明らかにした。また、溶菌酵素によるペプチドグリカンの分解産物の構造を詳細に解析し、この酵素がペプチドグリカンのペプチド架橋部に普遍的に存在する D-Ala-X 結合を選択的に切断することを明らかにした。これらの結果は、エンドプロテアーゼ型の溶菌酵素の作用機構とその溶菌スペクトラムの分子的基盤を解明する上で極めて重要な発見であり、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。