

Title	相同タンパク質間の組合せ変換を利用したプロテアーゼ前駆体の活性化制御機構
Author(s)	森本, さゆり
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45968">https://hdl.handle.net/11094/45968</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	もりもと さゆり 森 本 さゆり
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19064 号
学位授与年月日	平成 16 年 11 月 16 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	相同タンパク質間の組合せ変換を利用したプロテアーゼ前駆体の活性化 制御機構
論文審査委員	(主査) 教授 若林 克三  (副査) 教授 柳田 敏雄    教授 村上富士夫    講師 田村 厚夫

### 論文内容の要旨

タンパク質分解酵素のほとんどは成熟酵素部位の N 末端側にプロ領域を持った不活性前駆体として生合成される。最も活性化機構の研究が進んでいる枯草菌セリンプロテアーゼであるサチライシンは、プロ領域、成熟酵素領域共に単独では全くフォールドすることができず、両者が存在して初めてフォールドし、自己プロセッシングによりプロテアーゼとプロ領域とに切断される。切断されたプロ領域は酵素部位のインヒビターとして働くが、その後自己分解され活性型サチライシンが生成される。このようにプロ領域はサチライシンの適切な立体構造形成助成、およびインヒビター機能に必要な安定性をもつと同時に、後に起こる自己分解が迅速に行われるために不安定な構造をもつといった、一見相反する安定性の均衡を保つことが重要となる。しかしどの部位が各々の機能に関与しているのかについては詳細にはわかっていない。

そこで本研究では、プロ領域の安定性とサチライシンの活性化機構との相関を調べることを目的として、同じセリンプロテアーゼファミリーのインヒビターである POIA1 との組み合わせ置換を行った。各々を 2 次構造単位で 5 つのフラグメントに分割し、組み合わせた 32 種類の変異体を作製した。簡易スクリーニングや重要フラグメントの細分化を行い、プロ領域の様々な機能に重要な部位を迅速に特定したところ、サチライシンと直接結合しないプロ領域内部の疎水相互作用が結合表面の形を左右し、機能に大きく影響を及ぼすことがわかった。また高効率サチライシン産生を左右するプロセッシング効率は、プロ領域の阻害活性と相関していることが新たにわかり、プロセッシング直前の遷移構造に注目した生成過程モデルを提唱した。これらの結果はプロセグメント部位に変異を施し、産業上有用なサチライシンの高効率生産や、新たな機能や活性を持つプロテアーゼの作製といったプロ配列工学としての利用が期待できる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、生命活動の根幹となる機能に深く関与しているタンパク質分解酵素が、前駆体から活性型になる過程において効率よく生成されるために、付加されたアミノ酸配列(プロ配列)が、どのような安定性の戦略で活性化を制御するのかを明らかにしたものである。

タンパク質分解酵素のほとんどは、成熟酵素部位の N 末端側にプロ領域を持った不活性前駆体として生合成され、細胞自身が生成時において、自己攻撃を受けないよう防御機構として備わっているものである。最も活性化機構の研究が進んでいる枯草菌セリンプロテアーゼのサチライシンにおいては、立体構造形成介助、適切なプロセッシングおよびインヒビター機能、迅速な自己分解などの様々な働きを担っているが、どの部位が各々の機能に関与しているか、そして安定性との相関については殆ど知見がない。

そこで本論文では、コンビナトリアル手法の一つである「Building-block approach」と呼ばれる方法を用い、プロ領域と類似の立体構造を持つが、安定性の全く異なるタンパク質 POIA1 との間で、構造セグメントの組合せ変換を行った。そして検出された重要部位をさらにブロック化して組み合わせて調べる「マルチセクション法」を新たに開発し、迅速に必須部位をアミノ酸数残基レベルで特定することを可能にした。その結果、サチライシンと直接結合しないプロ領域内部の疎水相互作用が機能に大きく影響を及ぼしていること、そして高効率サチライシン産生を左右するプロセッシング効率は、プロ領域の阻害活性と相関していることが新たにわかり、プロセッシング直前の遷移構造に注目した生成過程モデルを提唱した。

以上のように、本論文はプロ領域の制御機構を明らかにしただけではなく、洗剤や皮革加工などの産業上有用なサチライシンについて、高効率生産や、新たな機能や特異性を付加するためのプロ配列工学としての利用に大きく寄与するものであり、博士（理学）の学位論文として、十分に価値のあるものと認定した。