

氏 名	伊 東 昌 章
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 154 号
学位授与の日付	平成 9 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科・専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	細菌の生産するペプスタチン非感受性カルボキシルプロテアーゼに 関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 小 田 耕 平 教 授 原 三 郎 教 授 功 刀 滋

論 文 内 容 の 要 旨

微生物プロテアーゼは、洗剤への添加による洗浄能力の向上、生理活性ペプチドの合成などに幅広く利用され、工業的に最も生産量が多い、重要な酵素である。これら微生物プロテアーゼをさらに有効利用するには、構造と機能相関の解析や触媒機構の解明が必須である。申請者は、プロテアーゼの中で触媒機構の解析が遅れているカルボキシルプロテアーゼ(CP)の構造と機能に的を絞りその解析を行った。対象とした酵素は、原核生物より最初に見い出され、且つ、特異的阻害剤ペプスタチンによって阻害されないユニークな 2 つの CP [*Pseudomonas* sp. 101 の生産する CP (PCP) と *Xanthomonas* sp. T-22 の生産する CP (XCP)] である。その結果、いままで不明であった CP の分類および進化について新たな考察をすることが可能となった。本研究の特徴は、これらユニークな CP を対象に、遺伝子工学的手法、反応速度論的手法、化学修飾法等を駆使し、それらの構造、基質特異性、および触媒残基を解析した点にある。

本論文は、緒論、4 つの章、および総括から構成されている。

第 1 章では、PCP と同じペプスタチン非感受性 CP である XCP の遺伝子クローニングを行い、全塩基配列を決定した。その結果、① XCP は、N 末端プロ領域、成熟型酵素、C 末端プロ領域の 3 つの領域から構成される前駆体として生合成される。② XCP が、C 末端プロ領域を有する最初の CP である。③ 既報の CP とは全く相同性を示さないが、PCP とは約 52 % と高い相同性が認められることなどを明らかにした。

第 2 章では、XCP の遺伝子工学的手法による触媒残基の同定等の解析を可能にするために、XCP 遺伝子の大腸菌での高発現系の構築を行った。更に、野生型組換え XCP の精製方法を確立し、組換え型 XCP の諸性質を検討した。また、C 末端プロ領域の機能解析の一環として、C 末端プロ領域欠損変異体を作製し、その発現および活性化について検討した。その結果、①野生型組換え XCP は、オーセンティック XCP と同一の酵素化学的性質を有すること、② XCP 前駆体の C 末端プロ領域は、成熟型 XCP へのプロセッシングには必須でなく、生成した成熟型 XCP にも何ら影響を与えないことなどを明らかにした。

第 3 章では、PCP と XCP の触媒特性を明らかにするために、各種新世代合成基質を用いて反応速度論的に解析した。その結果、① PCP と XCP の反応速度パラメーターは、基質の P5, P4, P3, P2 及び P2' の置換により影響を受け、PCP と XCP は、少なくとも 7 つのサブサイト (S5-S2') を有していると推察された。②両酵素は、一次構造上高い相同性を有しているにもかかわらず基質特異性に大きな違いのあることを明らかにした。③この相違は、両酵素のサブサイト S5, S3、及び S2 の構造の相違に起因すると推察された。

第4章では、化学修飾法によるペプスタチン非感受性CPの触媒残基同定を目指し、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCD)によるPCPの不活化機構を反応速度論的に解析した。その結果、①DCCDによるPCPの不活化には、触媒残基の2つの遊離のカルボキシル基が関与していると考えられる。②DCCDは、その1つと作用してPCPを不活化することなどを明らかにした。

総括では、本研究で得られた知見を要約した。

論文審査の結果の要旨

申請論文は、新規2種のCP (PCPとXCP)の構造と機能に関する分子生物学的および酵素化学的研究であり、新規性の高い、且つ、重要な結果を含む学術的に価値ある論文である。本研究により、PCPとXCPの特性およびこれらCPの分類上での位置付けがより明確となった。これらの研究成果は、CPの進化やCPの全体像を考える上で大きな貢献をするものと判断される。

本論文の内容の一部は、以下に示す2つの国際的学術誌に公表されている。

1. Cloning and expression of an isovaleryl pepstatin-insensitive carboxyl proteinase gene from *Xanthomonas* sp. T-22. K. Oda, M. Ito, K. Uchida, Y. Shibano, K. Fukuhara, and S. Takahashi, *J. Biochem.*, **120**, 564-572 (1996).
2. Substrate specificities of pepstatin-insensitive carboxyl proteinases from Gram-negative bacteria. M. Ito, B. M. Dunn, and K. Oda, *J. Biochem.*, **120**, 845-850 (1996).