

氏 名	シーラム サイラジャ スリーデーヴィ Seeram, Sailaja Sreedevi
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 162 号
学位授与の日付	平成 10 年 3 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	<i>Streptomyces</i> Metalloproteinase Inhibitor (SMPI): Reactive Site, Inhibition Mechanism, Inhibition Spectrum, Three-dimensional Structure, and Reactive Site Loop
審 査 委 員	(主査) 教 授 小 田 耕 平 教 授 宗 川 吉 汪 教 授 原 三 郎 教 授 功 刀 滋

論 文 内 容 の 要 旨

プロテアーゼ活性を特異的に阻害するプロテアーゼインヒビターは、現在、エイズや高血圧などの有効な治療薬として使用されている。これらの治療薬の開発は、対応するプロテアーゼの立体構造、及び、反応メカニズムの解析成果を基盤に行われている。

プロテアーゼのうち、Zn金属を活性中心にもつメタルプロテアーゼはZn金属を中心とするその周辺の構造に基づき、GluzincinsとMetzincinsのグループに大別される。前者には緑膿菌感染の主因である*Pseudomonas aeruginosa*のエラスターゼや、高温細菌由来のサーモリシンなどが属す。一方、後者にはガン浸潤に関与するとされているマトリックスメタルプロテアーゼなどが属す。メタルプロテアーゼには、このように重要な酵素が多数散在しているにもかかわらず、これらの酵素の構造と機能に関する研究は十分と言えない。これらの酵素の構造と機能の研究には、真の基質に限りなく近いタンパク性インヒビターを対象とした解析が必須である。

このような背景のもと、本研究は1978年村尾、小田らにより放線菌から分離されたタンパク性メタルプロテアーゼインヒビター、SMPIを対象にその阻害機構を解析し、その成果に基づき、メタルプロテアーゼの反応機構を考察すること、さらには治療薬などの応用開発などを目的として計画、実施されたものである。本研究の特徴は、極めてユニークなSMPIを対象に、種々の生化学的・物理化学的技術を駆使して、SMPIの阻害反応部位の同定、阻害機構及び立体構造などを解析した点にある。

本論文は、緒論、6つの章から構成されている。

緒論では本研究の背景を論述した。

第1章では、SMPIの改変体の作成及び安定同位体標識化SMPIの作成を目的に、SMPIの大腸菌での高発現系の構築について検討を加え、SMPIをグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現する方法を確立した。

第2章では、阻害反応部位についてSMPI分子中のVal 65残基を種々のアミノ酸残基で置換した改変体(8種類)のサーモリシンに対する阻害活性、及び安定性に基づいて解析し、SMPIの阻害反応部位は第2番目のSS架橋近辺のCys 64 - Val 65であることを明らかにした。

第3章では、SMPIの反応阻害機構を明らかにする目的で、サーモリシンによってCys 64とVal 65間のペプチド結合が限定分解されたModified SMPIからNative SMPIへの再合成を検討し、この反応が対応酵素の触媒により行われることを示した。メタルプロテアーゼインヒビターに於いて阻害反応部位の再

合成が示されたのはこれが最初である。この結果に基づき、SMPIはセリンプロテアーゼインヒビターで提唱されている“スタンダードメカニズム”により阻害機能を示すことを明らかにした。

第4章では、安定な酵素・インヒビター複合体形成可能な酵素を目指してSMPIの阻害スペクトルを精査し、サーモリシン ($K_i = 10^{-10}\text{M}$) よりも *Streptomyces griseus* Metal Proteinase II (SGMP II, $K_i = 10^{-12}\text{M}$) や *Pseudomonas aeruginosa* のエラスターゼ ($K_i = 10^{-12}\text{M}$) がより適している事、また、SMPIはメタルプロテアーゼのうち、Gluzincinsグループの酵素に特異的であることを明らかにした。

第5章では、 ^{13}C と ^{15}N で二重標識したSMPIを使用しNMR法で解析したSMPIの立体構造が2つの β -シート、1つの小さな α -ヘリックスと本体より突出し、且つ、阻害反応部位を含むループより構成されることを示した。また、コンピューターシミュレーションにより先に同定した阻害反応部位が酵素のZn金属と無理なく配向することを明らかにした。

第6章では、阻害反応部位を含むループ構造についてタンパク工学的手法を用いて検討を加え、SMPIの構造維持及び阻害活性発現にはループ内に存在するS-S架橋が必須であること、また、SMPIとサーモリシンとの結合には、ループ内にある塩基性アミノ酸残基 (Arg60, Lys61) に起因する静電的な作用と、Arg66の疎水的な働きが重要であることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文はGluzincinsグループのメタルプロテアーゼを特異的に阻害する極めてユニークな特徴を有する微生物起源タンパク性プロテアーゼインヒビター、SMPIの構造と機能に関するものである。分子生物学的及びタンパク工学的研究法が駆使された新規性の高い、且つ、重要な結果を含む学術的に価値の高い論文である。これらの研究成果は、メタルプロテアーゼの反応機構を考える上で大きく貢献すると共に、また、一方では、メタルプロテアーゼの関わる病気の治療薬開発にも大きく貢献するものである。

本論文の内容の一部は、以下に示す審査制度のある国際的学術誌に公表されている。

1. Seeram, S. S., Hiraga, K., Saji, A., Tashiro, M., and Oda, K. (1997) Identification of Reactive Site of a Proteinaceous Metalloproteinase Inhibitor from *Streptomyces nigrescens* TK-23. *J. Biochem.* **121**, 1088-1095
2. Seeram, S. S., Hiraga, K., and Oda, K. (1997) Resynthesis of Reactive Site Peptide Bond and Temporary Inhibition of *Streptomyces* Metalloproteinase Inhibitor. *J. Biochem.* **122**, 788-794