

氏 名	たにぐち　まい 谷 口 麻 衣
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3 9 7 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 17 年 7 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 材料科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on a Serine Protease Inhibitor Marinostatin produced by <i>Alteromonas</i> sp. (海洋細菌 <i>Alteromonas</i> sp. が生産するプロテアーゼインヒビターマリノスタチンに関する研究) (主査)
審 査 委 員	教授 浦川 宏 教授 原田繁春 教授 田嶋邦彦 助教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

マリノスタチン(MST)は、海洋細菌 *Alteromonas* sp.が生産するプロテアーゼインヒビターである。MST は、最小アミノ酸残基数 12 でズブチリシンを強く阻害するほか、キモトリプシンやエラスターーゼも阻害し、現在、発見されているタンパク性プロテアーゼインヒビターの中で最小のものである。MST には、他のタンパク質性プロテアーゼインヒビターの立体構造を維持するため普遍的に存在するジスルフィド結合は含まれていない。これまでの研究により、アルカリ条件下で MST が阻害活性を失うことおよびアルカリ処理により分子量が 36 (水分子 2 個分) 増大することから、分子内に 2 個のエステル結合が存在し、立体構造を保持していると考えられた。本研究では、NMR 法を用いて MST のエステル結合の位置および立体構造を解明する。さらに、エステル結合をジスルフィド結合に変換した MST アナログと比較することによって、MST のエステル結合の役割および阻害機構を検討し、プロテアーゼインヒビターとしての構築原理を明らかにすることを目的とした。

MST の NMR シグナルを解析した結果、アスパラギン酸の側鎖カルボキシル基とスレオニンおよびセリンの側鎖水酸基との間で 2 個のエステル結合が形成されており、その位置は $\text{Thr}^3-\text{Asp}^9$, $\text{Ser}^8-\text{Asp}^{11}$ であった。マリノスタチンはエステル結合により Ser^8 および Asp^9 を共有する 2 つのリングから構成されており、その立体構造はコンパクトにまとまっている。また、 Pro^7 はシス型をとっている事が特徴として挙げられる。高次構造決定と水素重水素交換の実験から、酵素の活性部位と結合する MST の阻害反応部位 ($\text{Met}^4-\text{Arg}^5$) のペプチド主鎖の NH プロトンが、 $\text{Thr}^3-\text{Asp}^9$ 間に存在するエステル結合のカルボニル基と水素結合していることも明らかにした。

MST の阻害機構を解明するために、エステル結合に関与しているアミノ酸をシステイン残基に変換した各種 MST アナログを化学的に合成した。短時間のズブチリシンとのインキュベーションの場合、MST-2SS および 1SS(C³-C⁹)のズブチリシンに対する阻害定数 K_i は $3.4 \times 10^{-9} \text{ M}$ と $6.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ であり、MST の阻害定数 $1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ とほぼ同じ値を示した。これらのことから、エステル結合 ($\text{Thr}^3-\text{Asp}^9$, $\text{Ser}^8-\text{Asp}^{11}$) をジスルフィド結合に変換しても、酵素との結合様式はほとんど変化しないことが示唆された。また、ズブチリシンに対する阻害には、Cys³-Cys⁹ ジスル

フィド結合によって形成される阻害反応部位を含む7残基からなるリング構造が必要であることが明らかになった。

しかし、MST アナログの P_1' 部位である Arg⁵の主鎖 NH プロトンの水素・重水素交換の速度は MST に比べて非常に早く、反応部位の揺らぎは大きくなっていることが示唆された。これは、エステル結合をジスルフィド結合に変換することにより、MST の反応部位 (Met⁴–Arg⁵) のペプチド主鎖 NH プロトンと Thr³–Asp⁹ エステル結合のカルボニル基との間の水素結合が消失し、阻害反応部位のゆらぎを抑制できなくなったためと考えられる。

次に、インヒビターとしての存続時間、すなわち阻害活性の持続時間を調べるために、酵素とインヒビターを 1:3 のモル比で混合後、阻害活性の経時変化を測定した。MST とインキュベートした場合、1 時間インキュベート後でもズブチリシンの酵素活性はほぼ 0 % であり、完全に MST によって阻害されていた。それに対し、MST アナログとインキュベートした場合、ズブチリシンの酵素活性は 10 分で約 60 % にまで回復した。MST アナログと酵素の反応混合物を分離したところ、阻害反応部位 Met⁴–Arg⁵ 結合が切断された修飾インヒビターを得た。以上より、ジスルフィド結合を持つ MST アナログは、酵素との結合能は高いが、素早く切断されるテンポラリーインヒビターであることが示された。

以上の結果より、MST のエステル結合の役割は、ペプチド鎖を架橋することにより固い構造をつくるだけでなく、反応部位ペプチド主鎖と水素結合することによって、反応部位の揺らぎを直接抑えることである。これが、MST のような短いペプチドがプロテアーゼと安定な複合体を形成し、酵素活性を抑制することを可能にしている理由であり、プロテアーゼインヒビターとしての作用原理である。

また、阻害反応部位 P_1 のアミノ酸 (Met⁴) を Lys、Arg、Leu、Tyr、Ala に変換することによる阻害特異性の変換を試みた結果、それぞれトリプシン、キモトリプシンおよびエラスターを阻害できるようになった。このことから、MST アナログの阻害特異性を変換することが可能である事が示された。MST は低分子であり、化学合成法によりプロテアーゼに合わせて阻害特異性を変換できる事から、プロテアーゼが関与する病気の治療薬として応用できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、海洋細菌 *Alteromonas* sp. が生産するセリンプロテアーゼインヒビター・マリノスタチン(MST)に関して、1) *Alteromonas* sp の培養条件の検討および MST の精製、2) NMR 法を用いた MST のエステル結合の位置および立体構造の決定、3) MST のエステル結合の役割および阻害機構の解明、4) MST の阻害特異性の変化、で構成されている。

MST は、これまでに発見されているタンパク性プロテアーゼインヒビターの中で最小のものである。また、2 個の分子内エステル結合を有する極めて特異な構造を有しており、プロテアーゼに対する阻害機構の解明は高い学術的意義を持つ。申請者は、MST を精製し、NMR 法を用いて MST のエステル結合の位置および立体構造を決定した。次に、エステル結合をジスルフィド結合に変換した MST アナログを合成し、MST と比較することによって、MST のエステル結合の役割および阻害機構を解明した。さらに、阻害特異性の変換が可能であること明らかにした。

分子内にエステル結合を持つタンパク質はこれまでに発見されておらず、エステル結合を持つタンパク質の構造と機能を明らかにした始めての研究である。MST は低分子であり、化学合成法

によりプロテアーゼに合わせて阻害特異性を変換できる事から、プロテアーゼが関与する病気の治療薬としての応用ができ、今後の発展が期待できるものである。

申請者は、論理的で緻密な実験を行っており、高く評価できる。また、本論文は MST のプロテアーゼインヒビターとしての構築原理を明らかにし、かつ治療薬として MST をデザインすることを可能にする学術的および工学的価値の高い論文ある。また、充分な新規性と独創性が認められる事から学位授与に値すると判定した。

上記内容の一部は下記の論文で公表されている。

[1] Kanaori K, Kamei K, Taniguchi M, Koyama T, Yasui T, Takano R, Imada C, Tajima K, Hara S.

Solution structure of marinostatin, a natural ester-linked protein protease inhibitor.

Biochemistry. 2005 Feb 22;44(7):2462-8.

[2] Taniguchi M, Kamei K, Kanaori K, Koyama T, Yasui T, Takano R, Harada S, Tajima K, Imada C, Hara S.

Relationship between temporary inhibition and structure of disulfide-linkage analogs of marinostatin, a natural ester-linked protein protease inhibitor

Journal of Peptide Research (in press)