

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 澤 野 頼 子

本論文は、パイナップル由来のタンパク質性システインプロテアーゼインヒビターであるプロメラインインヒビター (BI) の阻害メカニズムと構造との相関についての解析を行った結果について述べている。BIについて、遺伝子解析から生化学的解析、構造生物学的解析まで広範にわたる研究を行い、新規な成熟化機構と阻害機構を持つことを明らかにした。本論文は4章からなる。

第1章においては、まずプロテアーゼインヒビター全般の概説を行い、その分類と生理学的意義について説明した。次に、これまでに明らかにされてきたBIに関する生化学的、構造生物学的知見を説明した。すなわち、パイナップルからいずれもヘテロな2本鎖（軽鎖：10または11残基、重鎖：40または41残基）からなる7種のBIアイソフォーム (BI- I ~IV, VI~VII) が単離されており、そのアミノ酸配列、ジスルフィド結合の位置やアイソフォームVIの核磁気共鳴 (NMR) 法によって決定された立体構造は、典型的なセリンプロテアーゼインヒビターであるダイズ由来ポーマンバーク型インヒビターのものと同様性が高いことを示した。また、機能的には、共存するプロメライン (システインプロテアーゼ) を特に阻害することに加えて、セリンプロテアーゼに対する阻害能も呈することを示した。以上のことから、BIは全く新しいタイプのプロテアーゼインヒビターであることを示唆した。

第2章では、パイナップルからBI遺伝子をクローン化し、その構造解析を行った結果、それぞれ軽鎖、重鎖の順で3アイソフォーム (BI-VII, III, およびVI) 配列が1つのオープンリーディングフレームにコードされていることを見出した。また、その推定アミノ酸配列には、推定シグナルペプチド配列、各アイソフォームの軽鎖と重鎖の間には5残基の、各アイソフォーム間には19残基のプロペプチド配列、C末端に推定液胞輸送シグナル配列が含まれていた。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果、BI遺伝子は染色体上に1コピーのみ存在していることが示され、また、アミノ/カルボキシペプチダーゼの作用を考えると、この1つのBI前駆体遺伝子から全ての7アイソフォーム分子が生成されることが示唆された。

第3章では、軽鎖と重鎖の間のプロペプチド配列を含むプロ型BI-VIタンパク質の大腸菌における活性発現を行い、阻害機構におけるプロ配列の役割とその成熟化機構を明らかにした。活性型で発現されたプロ型BI-VIは、天然型のものと同様のプロメライン阻害活性を示し、円二色性 (CD) スペクトル解析の結果からも、天然型のものと同様なフォールディングをとっていることが示された。一方、プロペプチド配列を含まない系は大腸菌の不溶性画分に不活性型で生産され、リフォールディングによっても活性が回復しなかったことより、このプロ配列は、BIの正しいフォールディングを助ける役割を持つことが示された。また、プロ型BI-VIのプロメラインによる限定分解を行った結果、パイナップルにおい

て、プロメラインによって軽鎖C末端とプロ配列N末端の間のペプチド結合が切断された後、徐々にプロ配列がプロセシングされていき、さらに、プロ配列と重鎖N末端の間のペプチド結合がアミノペプチダーゼ様プロテアーゼに切断されることにより、2本鎖BIに変換されるという新規な成熟化機構が示された。また、セリンプロテアーゼであるトリプシンあるいはキモトリプシンによる限定分解では、それぞれ軽鎖とプロ配列の間あるいは軽鎖C末端部のペプチド結合の切断が観察された。以上の結果から、軽鎖と重鎖間のプロ配列が軽鎖C末端部とともに阻害活性ループを形成し、これが標的プロテアーゼの活性ポケットに入り込み、基質のごとく切断されることによって、阻害活性が発現されるという新規なプロテアーゼ阻害モデルが示された。

第4章においては、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識プロ型BI-VIのNMRによる立体構造解析を試みた結果、主鎖の帰属を完了し、ここから予測されたプロ型BI-VIの二次構造は、天然型の立体構造から得られた結果とほぼ一致し、両者は同様なフォールディングをとることが支持された。この結果を用いて、標的プロテアーゼとの相互作用部位を解析することを可能とした。

以上、BIの遺伝子解析、生化学的解析を行った結果、プロ配列を介した新規なプロテアーゼ阻害モデルが提唱でき、その成熟化機構が明らかとなった。また、構造生物学的解析から、プロテアーゼとの詳細な相互作用機構解明に必要なデータが得られた。ここから得られた知見は、プロテアーゼ-プロテアーゼインヒビターの相関の研究に重要な情報を与えるばかりでなく、プロテアーゼが関与する様々な疾病に関与する効果的な阻害剤の開発など応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと判断した。