

## 論文の内容の要旨

論文題目 魚類白子に含まれる新規システインプロテアーゼ  
“ミルトパイン”の酵素学的研究

氏名 川 端 兆 宏

本論文は、魚類白子中の特殊なタンパク質（サルミン、クルペイン）を効率よく分解する新規システインプロテアーゼ“ミルトパイン”の発見とその酵素学的研究の結果をまとめたもので、序章に続く以下3章から成る。

第1章は、シロサケ(*Oncorhynchus keta*)白子のミルトパインについて論述している。水抽出画分から精製した同酵素は SDS 電気泳動で 22.3 Kd の分子質量を示し、等電点は 3.9、Z-Arg-Arg-MCA 分解の至適 pH は 6.0、至適温度は 40 °C であった。チオール還元試薬で強く活性化され、同合成基質分解の  $K_m$  値は 16.3  $\mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}}$  値は 20.3  $\text{s}^{-1}$  であった。また、タンパク質基質として構成アミノ酸の 70% 以上が Lys, Arg であるサルミンなどをも効率よく分解するものの、カゼインは分解しないという特異性を示した。しかし、既知のカテプシン B とは諸面で明らかに異なっていた。しかも、N 末端アミノ酸配列(LPSFLYAEMVGYNIL …)に類例がないことから、サケミルトパインは新規の、しかもシステイン型のプロテアーゼであると結論した。

第2章は、シロサケと同様に日本国内にて多く流通・消費されるマダラ(*Gadus macrocephalus*)の白子からも同様の酵素を見だし、タラミルトパインと命名して諸種の解析を行った結果を論述したものである。精製標品は SDS 電気泳動で 72 Kd を示し、等電点は 5.2、至適 pH 6.0 であった。やはりチオール還元試薬で活性化され、しかも E-64 などでも阻害されることから、システインプロテ

ーゼに帰属し得た。Z-Arg-Arg-MCA 分解の  $K_m$  値は  $11.5 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}}$  値は  $19.0 \text{ s}^{-1}$  であることから、速度論的にもサケミルトパインに類似していた。しかし、分子質量（上記）が異なる他、N 末端アミノ酸配列(<EVPVEVVRXYVTSAPEK... )も全く異なり、しかも N 末端がピロリドンカルボキシル化しているなどの特徴を有し、サケミルトパインとは別の新規システインプロテアーゼであると結論した。

第 3 章では、上記した 2 つの酵素に対する阻害剤の作用機構の解析から両者の構造上の共通性を推論している。すなわち、サケミルトパインおよびタラミルトパインは、システインプロテアーゼに共通の阻害剤である E-64, N-エチルマレイミド、ヨード酢酸、*p*-クロロマーキュリベンゾエートによって阻害されたが、興味深いことに、金属キレート試薬である *o*-フェナンスロリンによっても完全に阻害された。しかし、他のキレート試薬 EDTA および EGTA によっては全く阻害されなかった。ということは *o*-フェナンスロリンによる完全阻害は金属との配位によるものではないことを示唆する。そこで Dixon プロットによる速度論的解析を行った。その結果、両酵素に対する本キレート剤の阻害は非拮抗的であり、 $K_i$  値はサケミルトパインで  $1.0 \mu\text{M}$ 、タラミルトパインで  $0.2 \mu\text{M}$  であった。このような効率的な阻害は *o*-フェナンスロリンの特異的立体構造(Hyper Chem™ プログラムでの計算によれば疎水性平面構造)に起因すると考え、類似構造をもつフェナンスレンキノン、フェナンスレン、アクリジン、フェナジンによる阻害の可否をしらべたところ、フェナンスレンキノンに強い阻害活性がみられ、 $K_i$  値は前者の酵素で  $0.01 \mu\text{M}$ 、後者で  $0.5 \mu\text{M}$  であった。このことから、両酵素は予期せぬ物質によって阻害されることが見いだされた。

以上の結果、2 つのプロテアーゼの構造・活性相関上の新規性を示唆すると同時に、その応用に向け、より有効な分子設計に新たな途を拓く基礎になると期待されるのである。