

審査の結果の要旨

氏名 劉 徳生

本論文は、独特のアミノ酸配列を有するカブトムシ由来タンパク質オリクチンによるセリンプロテアーゼ阻害機構の解明を目的としている。本論文は4章構成であり、第1章の緒言においてオリクチン、セリンプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ阻害剤に関する背景と研究目的、第2章ではオリクチンのキモトリプシンおよびズブチリシンに対する阻害機構の解析、第3章では M14R 変異体オリクチンのトリプシン阻害機構の解析について述べられ、第4章にて研究成果が総括されている。

第2章では、オリクチン-キモトリプシン複合体およびオリクチン-ズブチリシン複合体の X 線結晶構造解析から、オリクチンが異なる族に属するこの2種類のセリンプロテアーゼのいずれも阻害可能であることの構造基盤が解析されている。オリクチンは大腸菌にて異種発現、精製された後、市販のセリンプロテアーゼと混合され、ゲルろ過により複合体が単離され、結晶化に供された。オリクチン-キモトリプシン複合体について空間群 $P2_1$ の結晶が得られ分解能 1.8 \AA の X 線回折データが取得され、一方オリクチン-ズブチリシン複合体については空間群 $P2_12_12_1$ と $C222_1$ の2種類の結晶から分解能 1.9 \AA と 2.1 \AA の X 線回折データが取得され、いずれも分子置換法で結晶構造が決定された。オリクチン-キモトリプシン複合体結晶は非対称単位中に3組のオリクチン-キモトリプシン(1:1)複合体を、オリクチン-ズブチリシン複合体の2種類の結晶は非対称単位中に各1組のオリクチン-ズブチリシン複合体(1:1)複合体を含んでいた。結晶構造の比較から、オリクチンの阻害ループ(Pro9-Leu16)が疑似基質として機能し、キモトリプシンとズブチリシンの基質結合部位にそれぞれ適合するように立体配座を変えて強固に結合していることが示された。全複合体構造において、分子間相互作用界面は 700 \AA^2 以上、分子間水素結合数は8本以上であり、特に阻害ループ内の Met14 (基質の P1 残基に相当) とプロテアーゼの触媒残基 Ser との間に2本の水素結合が形成され、両残基の相対的な位置の固定に寄与していた。その結果、触媒残基 Ser 側鎖 $O\gamma$ と基質の Met14 の主鎖カルボニル基が形成する角 ($\angle(O\gamma \cdots C=O)$) がオリクチン-キモトリプシン複合体の場合 $94.7-94.9^\circ$ 、

オリクチン-ズブチリシン複合体の場合 $82.3-86.7^\circ$ と、求核攻撃を受けやすい Bürgi-Dunitz 角 ($\angle(\text{O}\cdots\text{C}=\text{O}) = 105 \pm 5^\circ$) から外れた角度に制限されていた。上記の結果に基づいて、Ser 側鎖 O_γ による Met14 カルボニル炭素への求核攻撃が抑制されてアシル-酵素中間体の形成に至らないというオリクチンによるセリンプロテアーゼの阻害機構が提唱されている。

第3章では、野生型オリクチンが阻害できないトリプシンを阻害可能な変異体の作製とこの変異体オリクチンとトリプシンの複合体の結晶構造解析から、オリクチン阻害ループ P1 残基（野生型では Met14、変異体では Arg14）の標的セリンプロテアーゼ識別における重要性が示されている。まず、トリプシンを阻害可能な変異体の作製が試みられ、阻害定数 $K_i = 3.4 \text{ nM}$ でトリプシンを阻害する M14R オリクチンが見いだされた。次に、M14R オリクチン-トリプシン複合体の結晶構造解析が行われ、空間群 $P4_12_12$ の結晶から分解能 2.1 \AA の X 線回折データが取得され、分子置換法で構造決定された。本複合体においても、M14R オリクチンの阻害ループがトリプシンの基質結合部位に疑似基質として強固に結合しており、第2章と同様の阻害機構が見られた。それに加え、Arg14 側鎖がトリプシンの S1 ポケット底部の Asp191 側鎖と塩橋を形成することで複合体を安定化していた。この結果から、阻害ループの P1 残基と標的酵素の S1 ポケットの相性の良さがオリクチンのセリンプロテアーゼ阻害活性に重要であると提唱されている。

第4章では、本研究の結果の総括と応用可能性が述べられている。オリクチンの阻害ループは、他のタンパク質性セリンプロテアーゼ阻害剤の阻害ループとアミノ酸配列相同性がないにもかかわらず、同様に疑似基質として標的酵素に強固に結合することが明らかになった。この結果から、セリンプロテアーゼ阻害ループのアミノ酸側鎖の種類が拡張され、今後の新規セリンプロテアーゼ阻害剤の分子設計等に寄与すると期待される。

セリンプロテアーゼは様々な生命活動に関わるだけでなく、食品・製薬・化学産業においても幅広く利用されているため、本研究の成果は学術上応用上寄与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認めた。