

## 学位論文の要旨

氏名	外川内 亜美
学位論文題目	メロン由来タンパク質分解酵素ククミシンおよびククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造解析

本論文は、X線結晶構造解析法によりメロン由来タンパク質分解酵素であるククミシンとそのプロペプチド複合体の結晶構造を決定し、ククミシンのもつ高い熱安定性と広い基質特異性の重要な根拠を構造的特徴から導き出した。また、ククミシンプロペプチドによるククミシン活性の阻害機構についても本論文の中で明らかにした。

第1章では、これまでの研究をもとに、ククミシンを始めとするセリン型プロテアーゼの反応機構とククミシンの機能や特徴について述べた。ククミシンはCM-Sepharose陽イオン交換クロマトグラフィーで高純度かつ高効率に精製することができた。ククミシンはpH 2-11の広範囲、70°Cまで安定だった。ククミシンの基質特異性は、P1位にMet, Leu, Glu, Asn, Thrを好み、Gly, Ile, Proは切断せず、Asp, Glu, Arg, Lysなどの電荷をもつアミノ酸は好まないという結果が得られた。ククミシンのP1位の基質特異性は広く、P2位には非極性のアミノ酸やプロリンを好んだ。

第2章では、メロン果実から精製したククミシンを結晶化し、結晶構造解析およびククミシン分子の安定性の評価を行った。ククミシンの結晶構造は多波長異常分散法により位相決定し、分解能2.75 Åで精密化した。ククミシンは触媒ドメイン、触媒ドメインの途中に挿入されたPAドメイン、Fn-IIIドメインの3つで構成されていた。触媒ドメインの構造は7本のβストランドからなる並行なβシートに隣接する9本のαヘリックスで典型的なサブチリシンファミリーのα/β構造をとっていた。ククミシンの熱安定性は示差走査蛍光定量法で測定した結果、融解温度T<sub>m</sub>は81.0°Cであった。多くの耐熱性酵素において、熱安定性の共通因子のひとつは金属イオンであるが、ククミシンの結晶構造においてカルシウム結合部位は観察されなかった。さらに、ククミシンの酵素活性にはカルシウムイオンを必要としない。ククミシンは相同な構造であるトマト由来SBT3や細菌由来のサブチリシンBPN'よりも高かった。ククミシンはカルシウム結合ループにおいてカルシウムイオンではなく、リジンの側鎖の正電荷で安定化していた。サブチリシンBPN'にはジスルフィド結合は存在しないが、ククミシンは4つ存在しており安定性に寄与していた。さらに、芳香族

アミノ酸と電荷アミノ酸とプロリンの割合が、サブチリシンBPN'よりククミシンが高かったこともククミシンの安定性に寄与していると考えられた。

第3章では、プロペプチドとククミシンの複合体を結晶化し、結晶構造解析を行った。結晶構造からククミシンのサブサイト周辺の構造を詳細に調査し、基質特異性について考察した。野生型プロペプチドは無細胞発現系で発現させ精製した。ククミシン-プロペプチド複合体のX線結晶構造は、第2章で得たククミシンの結晶構造の座標を用いた分子置換法で分解能1.95 Åで精密化した。ククミシン-プロペプチド複合体の構造は植物セリン型プロテアーゼとしては初の報告である。ククミシン-プロペプチド複合体においてプロペプチドは4本のストランドからなる逆平行のβシートと2本のヘリックスのα-β サンドイッチ構造ドメインとC末端のストランドで構成されていた。プロペプチドのC末端はククミシンの活性サイトに基質のように結合していた。ククミシンのサブサイトが本構造から明らかになった。サブサイト1は広く深いポケットであり、主に極性非電荷のアミノ酸が分布していたことから、極性非電荷のアミノ酸を好み、電荷をもつアミノ酸は好まない傾向にある。また、オキシアニオンホールペアのAsn307がS1ポケットの入口を狭くしており、β炭素から枝分かれしているアミノ酸も好まない。

第4章では、プロペプチド-ククミシンの複合体の結晶構造を基に、プロペプチドによる阻害機構およびククミシン前駆体の活性化機構について考察した。プロペプチドのC末端はククミシンの活性サイトに結合していた。さらに、プロペプチドのβ-シートはククミシン表面の2本の平行なヘリックスと疎水性相互作用と27本の水素結合を介して結合していた。ククミシンはC末端を欠損させたプロペプチドやC末端のヘプタペプチドでは阻害されなかった。これらの結果はククミシンの阻害にはプロペプチド全体が必ず必要であることを示唆している。また、プロペプチドのC末端がS1ポケットに結合していたことから、ククミシン前駆体の構造を予想することができた。ククミシン前駆体においてプロペプチドのC末端とククミシンのN末端の間が分子内自己分解で切断され、プロペプチドは他のククミシンを含む他のプロテアーゼで分解され、ククミシンが活性化すると考えられた。

第5章では、これまで得たすべてのデータを総括し、ククミシンの構造機能相関について考察した。

## Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation: Crystal Structure Analysis of Melon Fruits Protease  
Cucumisin and Cucumisin-Propeptide Complex

Name: **Sotokawauchi Ami**

In this thesis, the crystal structure of melon fruits protease cucumisin and its propeptide complex was determined by X-ray crystallography. The important evidence of high thermal stability and wide substrate specificity of cucumisin was led from structural characteristic. The inhibition mechanism of cucumisin activity by propeptide were also elucidated in this study.

In Chapter 1, it was described about reaction mechanism of serine type protease including cucumisin and function and characteristic of cucumisin based on a past study. Cucumisin was purified with CM-Sephadex cation exchange chromatography by high purity and high efficiency. Cucumisin was highly stable in a wide pH range of 2 to 11, and until 70°C. Cucumisin preferred Met, Leu, Asn, Gln, and, Thr at the P1 position. Cucumisin tended to avoid charged amino acids (Asp, Glu, Lys, and Arg) and did not cleave Gly, Ile, or Pro at the P1 position. Proline and non-polar amino acids at the P2 position were preferentially cleaved.

In Chapter 2, it was described that cucumisin purified from melon fruit was crystallized, analyzed crystal structure, and evaluated for stability of cucumisin molecule. The crystal structure of cucumisin was determined by the multi-wavelength anomalous dispersion method and refined at 2.75 Å resolution. Cucumisin was composed of three domains: the subtilisin-like catalytic domain, the protease-associated (PA) domain as insertion of the catalytic domain, and the C-terminal fibronectin (Fn)-III-like domain. The catalytic domain adopts an  $\alpha/\beta$ -fold typical of subtilisin family, consisting of a highly twisted seven-stranded parallel  $\beta$ -sheet, flanked by nine  $\alpha$ -helices. The thermostability of cucumisin was measured by differential scanning fluorimetry. The melting point of cucumisin was  $T_m=81$  °C. Although metal ions are one of the common factors for thermostability in many thermozymes, no calcium binding site was found in the crystal structure of cucumisin. In addition, the enzymatic activity of cucumisin does not require calcium ions. The melting point of cucumisin was a higher melting point than its structural homologue, tomato SBT3 and bacterial subtilisin BPN'. Cucumisin was stabilized in the positive charge of the side chain of the lysine not a calcium ion in a calcium-binding loop. There was not the disulfide bond in subtilisin BPN', but cucumisin four existed and contributed to stability. Furthermore, it was thought that it contributed to stability that cucumisin was higher in a ratio of aromatic amino acid, charged amino acid, and proline than subtilisin BPN'.

In Chapter 3, it was described that cucumisin-propeptide complex was crystallized, and crystal

structure was analyzed. The structure around subsites of cucumisin was investigated in detail, and the substrate specificity was discussed. The wild-type propeptide was expressed in a cell-free expression system and purified. The crystal structure of cucumisin-propeptide complex was determined by the molecular replacement method using the coordinates of cucumisin and refined at 1.95 Å resolution. This is the first detailed report on the complex of the propeptide and plant subtilisin-like protease. In this complex, the propeptide was composed of a domain of the  $\alpha$ - $\beta$  sandwich motif with four-stranded antiparallel  $\beta$ -sheets, two helices, and a strand of the C-terminal region. The C-terminus of the propeptide bound to the cleft of the active site as peptide substrates. The subsite of cucumisin was revealed in this structure. Cucumisin tends to prefer the polar residues and not to prefer the charged residues in the peptide substrates because the S1 pocket of cucumisin is deeper than that of other subtilisins and is composed of polar and non-charged residues. In addition, cucumisin tends not to prefer  $\beta$ -branched residues because Asn307 residue, which is a partner of the oxyanion hole, narrows the entrance of the S1 pocket.

In Chapter 4, it was described that inhibition mechanism by propeptide and activation mechanism of cucumisin precursor based on crystal structure of the cucumisin-propeptide complex. The C-terminus of propeptide bound to the cleft of active site. Furthermore, the  $\beta$ -sheets of propeptide bound to two parallel surface helices of cucumisin through hydrophobic interaction and 27 hydrogen bonds. Cucumisin was not inhibited by the C-terminal deletion propeptide or C-terminal hepta-peptide. These results suggest that the whole propeptide was absolutely needed for cucumisin inhibition. Because the C-terminus of propeptide bound to the S1 pocket, the structure of the cucumisin precursor was predicted. In the cucumisin precursor, it was thought that the peptide bond is cleaved by intramolecular autolysis, and then cucumisin is activated by the digestion of the propeptide by other proteases, including other cucumisin.

In Chapter 5, all data were summarized and it was discussed about structure-function relationship of cucumisin.