

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 430号	氏名	外川内 亜美
審査委員	主査	有馬 一成	
	副査	内海 俊樹	伊東 祐二
		濱田 季之	

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
(Crystal Structure Analysis of Melon Fruits Protease Cucumisin and Cucumisin-Propeptide Complex)

審査要旨

提出された学位論文および論文目録等をもとに学位論文審査を実施した。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およびククミシン- 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。本論文は全文5章より構成されている。

第1章は序章であり、これまでの研究で明らかにされているプロテアーゼとしてのククミシンの機能や特徴について述べた。ククミシンはpH 2-11の広範囲で活性を示し、70°Cまで安定である。ククミシンの基質特異性は、P₁位にMet, Leu, Glu, Asn, Thrを好み、電荷を有するアミノ酸は好まないという結果が得られている。

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。ククミシンは触媒(CA)ドメイン、触媒ドメインの途中に挿入されたタンパク質結合性(PA)ドメイン、フィブロネクチン-III様(Fn-III)ドメインの3つで構成されていた。カルシウム結合サイトに相当するループの安定化とジスルフィド結合および芳香族アミノ酸の含有量が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。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、有電荷のアミノ酸は好まない傾向にあると考えられた。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ことも説明できた。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となった。

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もとに、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。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、ククミシンに結合したククミシン前駆体の構造やククミシン分子の活性化の過程を予想することができた。

第5章では、得られ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。

以上、本論文は植物セリンプロテアーゼである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を行い、ククミシンの構造と機能の相関を明らかにしたものである。本研究は、いまだに不明な点が多いプロテアーゼの機能発現と構造相関を解明する上で、今後の研究の一助となると思われる。

よって、審査委員会は博士(理学)の学位論文として合格と判定した。