

Title	The Charge-Relay System in Enzyme Catalysis : Construction and Function of Active Site Residues in Carboxypeptidase Y( Abstract_要旨 )
Author(s)	Jung, Gimán
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1999-03-23
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/181885">http://hdl.handle.net/2433/181885</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

氏名	鄭基晩
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1034号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	The Charge-Relay System in Enzyme Catalysis: Construction and Function of Active Site Residues in Carboxypeptidase Y (酵素触媒における電荷リレー系: カルボキシペプチダーゼ Y の活性中心残基の構成と機能)
	(主査)
論文調査委員	教授 林 力丸 教授 佐藤文彦 教授 江崎信芳

### 論 文 内 容 の 要 旨

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のカルボキシペプチダーゼYは、活性に重要なセリン残基Ser146をもち、また、その近傍に触媒作用に何らかの役割をもつと考えられるシステイン残基Cys341を有している。本研究では、本酵素の活性中心としての電荷リレー系の証明とその重要性を明らかにし、また、Cys341の構造と機能に果たす役割を解明している。本論文は3章より構成されており、その主な内容は以下のとおりである

第1章では本酵素の構造と機能に関する近年の研究動向を述べ、その問題点を指摘している。

第2章の第1節では本酵素の電荷リレー系をSer146とともに構成するはずのヒスチジン残基を部位特異的修飾剤で修飾した後、過ギ酸酸化によってカルボキシメチル誘導体に導き、これをトリプシンとサーモリシンで分解しペプチド混合物を得、この中からカルボキシメチルヒスチジンを含むペプチドを精製した上、その配列をアミノ酸分析とペプチドシーケンスより決定することでHis397を同定している。これにより本酵素の電荷リレー系の存在を証明している。

第2章の第2節ではこのHis397を部位特異的変異法によってAla397に置換した変異体H397Aを作製し、本酵素の電荷リレー系の重要性を解析している。そのため、野生型酵素とH397Aのジペプチド基質に対する速度論的パラメータを比較し、H397Aは野生型酵素に比べてKm値はほとんど変わらず、 $k_{cat}$ 値のみが $1 \times 10^8$ 倍以下に低下することを明らかにした。このH397Aの残存活性はトリプシンやズブチリシンの電荷リレー系ヒスチジンのアラニン変異体よりもさらに低い活性であることから、本酵素の電荷リレー系は唯一の活性中心であることを立証している。

第3章ではCys341を置換した6つの変異体酵素 (C341G, C341S, C341V, C341F, C341D, C341H) を作製し、その内、C341DとC341Hを除く4つの変異体酵素の構造安定性或常圧および高圧力下での活性を野生型酵素と比較している。その結果、変異体酵素の熱安定性は野生型酵素のそれに比べて3~12°Cも低く、Cys341は本酵素の構造安定化に重要であることを明らかにした。また、常圧と高圧下でペプチド基質 (Fua-Phe-PheとFua-Ala-Phe) に対する加水分解活性を調べ、常圧での実験からCys341が基質結合反応ではなく、触媒反応に大きく影響していることを明らかにし、さらに、高圧力下での実験から、加水分解反応時の体積変化である反応体積 ( $\Delta V$ ) と活性化体積 ( $\Delta V^\ddagger$ ) を求め、次のような結果を得ている。すなわち、 $\Delta V$ と $\Delta V^\ddagger$ はそれぞれ基質結合反応とその後の遷移中間体の形成時の体積変化を表すものであるが、野生型酵素と多くの変異体酵素のこれらの値はほぼ同程度の正の値を示すのに対し、C341Vが基質Fua-Phe-Pheを分解する際には $\Delta V^\ddagger$ だけが大きな負の値であることを明らかにした。これは遷移中間体の形成反応が体積減少反応であることを示している。また、変異体の341位のアミノ酸側鎖の配向をコンピュータシミュレーションにより予測した結果、Cys341とVal341の側鎖はS1ポケットの内側を向いているのに対して、Ser341とPhe341の側鎖はポケットの外側を向いていることを示した。

これらの結果を矛盾なく説明するには、Cys341の側鎖はFua-Phe-Pheを加水分解する際の遷移状態においてはS<sub>1</sub>ポケッ

トの内側から外側に向きを変えると推論した。

以上の結果から、本酵素の活性中心近傍のシステイン残基は、遷移中間体の基質結合ポケットのサイズを調節することによって触媒反応を助けると結論している。また、圧力因子の利用はタンパク質の構成アミノ酸残基の動的な姿を「体積」の観点から調べる有効な手段であることを提唱している。

## 論文審査の結果の要旨

エキソ型プロテアーゼであるカルボキシペプチダーゼYは、その活性中心としてセリン、ヒスチジン、アスパラギン酸からなる電荷リレー系をもつとされるが、その重要性が実証されておらず、疑問視する報告もある。また、本酵素は触媒反応に影響を及ぼす遊離のシステイン残基を電荷リレー系近傍の基質結合部位にもっており、その役割も注目されている。本論文は、カルボキシペプチダーゼYの電荷リレー系の存在と活性中心としての重要性、そして、その近傍のシステイン残基の酵素活性に及ぼす役割を解明した研究であり、評価される点は次のとおりである。

1. 既に同定されているSer146とともに電荷リレー系を構成するHis397を部位特異的の化学修飾法とペプチドマッピング法により同定し、本酵素における電荷リレー系の存在を科学的方法により証明した。

2. His397を部位特異的の変異法によりアラニンに置換した変異体は活性を完全に失うことを明らかにし、本酵素において電荷リレー系は唯一の活性中心であることを証明した。

3. 電荷リレー系の近傍に存在する遊離のCys341の役割を証明するため、Cys341の部位特異的変異体に対する高圧力下での活性を測定し、活性による体積変化を調べることにより、加水分解時の遷移状態においてCys341は基質結合ポケットの内部から外側へ向きを変え、ポケットを大きくすることで遷移状態での電荷リレー系の働きを助けていることを明らかにした。

4. 変異体酵素に圧力をパーターバントとして適用し、反応体積と活性化体積の変化を測定することで、タンパク質の構成アミノ酸残基の動的な姿を「体積」の観点から捉えることが可能であることを示し、タンパク質の動的な構造変化を解析する上で、圧力は有効な手段であることを提唱した。

以上のように、本論文は、カルボキシペプチダーゼYの触媒機能に関する重要な知見を与えるものであり、酵素・タンパク質化学、構造生物学およびタンパク質工学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年1月19日、論文並びにそれに関連する分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分にあるものを認めた。