

別紙 4

報告番号	※乙	第 4802号
------	----	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ボーマン・バーク型インヒビターの
結晶構造と機能の研究

氏 名 鈴木淳巨

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質のペプチド結合を加水分解し切断する酵素は、プロテアーゼと呼ばれ、食物の消化、ウイルス感染、血液凝固、受精、炎症などの様々な生命プロセスに深く関わっている。このプロテアーゼの作用を阻害し、抑制する働きをする物質が、プロテアーゼ・インヒビターである。生体中に存在するプロテアーゼ・インヒビターとしては、分子量数百程度の比較的低分子量のものと、分子量数千から数万に及ぶタンパク性のものがあるが、後者は、それ自身がタンパク質でありながらプロテアーゼによる加水分解を受けないという点でユニークであり、そのプロテアーゼ阻害機構に興味を持たれてきた。

ボーマン・バーク型インヒビター（以下BBIと略す）は、このようなタンパク性のインヒビターの1つであり、豆科植物の種子中に広く見いだされている。BBIの特徴は、比較的低分子量（分子量7,000~9,000）でありながら、分子中に2ヶ所のプロテアーゼ阻害部位をもち、それらがそれぞれ特異性の異なるプロテアーゼを阻害できることである。

本研究で、結晶構造解析のターゲットとし、分子構造と機能の関連について研究したBBIは、ピーナッツ種子より抽出されるA-IIと呼ばれるインヒビターである。A-IIは、分子量7,611、アミノ酸残基数70の蛋白質であり、他のBBI同様、分子内に2ヶ所のプロテアーゼ阻害部位を持つ。しかしながら、そのうち一方は、基質特異性がお互いに全く異なるトリプシンとキモトリプシンの両方に対して阻害活性を示すところに他のBBIに見られない大きな特徴がある。

A-IIのトリプシン又はキモトリプシンに対する阻害のメカニズムを解明するためには、A-IIとこれらのプロテアーゼが結合して複合体を作ったときに、両者の間にどのような相互作用が起こっているかを解明する必要がある。そこで、A-II単独、及び、A-IIとトリプシンまたはキモトリプシンの複合体のX線結晶構造解析を行った。しかしながら、



A-II-トリプシン複合体では、複合体の結晶が再現性良く得られず、解析は、複合体結晶の格子定数や空間群を明らかにするにとどまった。そこで、A-IIとトリプシンの相互作用は、A-IIとトリプシンそれぞれの分子構造から複合体の推定構造を構築することにより明らかにした。

X線結晶解析の手法としては、A-II単独の解析では重原子同型置換法を用い、A-II-キモトリプシン複合体については、キモトリプシンをモデル分子とする分子置換法を用いた。X線結晶解析の分解能をできるだけ上げるために、シンクロトロン放射光がX線源として用いられた。その結果、A-II単独の構造は、2.3Å分解能で明らかにされ、また、A-II-キモトリプシン複合体の構造は、3.0Åで明らかにされた。

A-IIの構造解析により、その分子構造について以下のことが明らかになった。A-II分子は、一つの方向に長く引き伸ばされたような立体構造をとっており、長く伸ばされた分子の両端に2つのプロテアーゼ阻害部位を持っている。2つの阻害部位はお互いに約40Å離れて存在しており、このように遠く引き離された配置が、A-II 1分子でプロテアーゼ2分子を同時に阻害することを可能としている。A-II分子の二次構造としては、4本鎖逆平行β-シートが1つあるのみである。このβシートは分子の背骨を形成しており、シート以外の部分はこのβ-シートにS-S結合により結び付けられている。A-II分子は、明らかに分子内疑似2回対称を持っており、2つのプロテアーゼ阻害部位もこの2回対称によって関係付けられる位置にある。プロテアーゼ阻害部位のアミノ酸配列は、A-IIの2つの阻害部位で異なるが、構造解析の結果、この部分の主鎖の立体構造は両者でほぼ一致しており、プロテアーゼに対する相互作用は、両者で基本的に差が無いであろうことが推定された。

一方、A-II-キモトリプシン複合体の解析から、次のことが明らかになった。複合体において、A-IIとキモトリプシンは、双方とも分子の表面の比較的狭い領域を使って相互作用しているに過ぎない。水素結合による相互作用に注目すると、A-IIは、プロテアーゼ阻害部位近傍の5つのアミノ酸残基を相互作用に使っているのみである。一方、キモトリプシン側でも、A-IIとの接触に使われているのは、触媒活性中心が形成されている分子表面の溝の中のほんの限られた領域に過ぎない。

単独で解析されたA-IIの構造と、キモトリプシンと複合体を作った状態で解析されたA-IIの構造を比較すると、両者に大きな違いの無いことが明らかになった。また、トリプシンと複合体を作った状態で解析された他のBBIの構造とインヒビター単独で解析されたA-IIの構造を比較してみても、両者にほとんど差の無いことが明らかになった。これらのことから、BBIの立体構造は、BBIがプロテアーゼと結合する前後で、ほとんど変化しないことが明かとなった。

一方、A-II-キモトリプシン複合体では、キモトリプシン側の構造もBBIと結合する前後でほとんど変化していなかった。このことは、BBIの阻害部位が、プロテアーゼの構造を乱すことなく、その酵素触媒中心にピッタリはまり込めるような形状をとってい

ることを示唆している。

プロテアーゼと相互作用していないA-II単独での構造解析から、A-IIの阻害部位付近は、熱振動による構造のゆらぎが、分子の中で相対的に大きい領域であることが明らかにされた。しかしながら、A-II-キモトリプシン複合体の結晶解析の結果、キモトリプシンとの相互作用は、この阻害部位の構造のゆらぎを小さくすることが明らかになった。なお、他のBBIのトリプシン複合体の結晶解析でも、阻害部位の構造のゆらぎは小さくなっていることが示されている。これらのことから、プロテアーゼとの相互作用によって、BBIの阻害部位の構造は、安定化されると考えられる。言い換えれば、プロテアーゼと結合する前は揺らぎ易く、結合後は揺らぎ難くなるこのような阻害部位の構造こそが、BBIのプロテアーゼ阻害メカニズムの本質と言える。

A-IIとキモトリプシンの相互作用を細かく検討すると、プロテアーゼの活性中心周辺の分子表面にある極性基（水酸基、カルボニル基やアミノ基）のほぼ全てと水素結合できるような幾何学的配置に、A-IIは自分の極性基を置いていることが明らかになった。このため、A-IIとプロテアーゼ間には、限られた相互作用領域において、多数の水素結合が効率よく形成されている。水素結合から見る限り、A-IIは、キモトリプシンの触媒部位という鍵穴にぴったり合う鍵に例えることができる。

A-II単独での構造解析により明らかにされたプロテアーゼ阻害部位の構造は、トリプシンの活性中心とぴったり合うことが、A-IIとトリプシン両分子をコンピューター・グラフィックス上でドッキングさせることにより示された。そこで、A-IIの2つのトリプシン阻害部位のそれぞれをトリプシンと結合させることによって形成される、A-II-トリプシン複合体の仮想分子モデルを構築してみた。その結果、A-IIとトリプシン間の水素結合による相互作用は、2つの阻害部位でほぼ同一で、且つ、A-IIとキモトリプシン間に見られたものと同じであることが示された。一方、A-IIとトリプシン間の疎水性相互作用に注目すると、2つの阻害部位の間で、その大きさに明かな違いがあることが、推定された。A-IIとトリプシンとの結合定数は、この2つの阻害部位間で約20倍違うが、この違いは、疎水性相互作用の差に起因するもの推測される。

キモトリプシンとの相互作用において、多くのプロテアーゼ・インヒビターでは、キモトリプシンの疎水性の基質認識ポケットにインヒビター側の1つの疎水性側鎖が入り込み、その結果生ずる疎水性相互作用が、インヒビターとキモトリプシン間の結合を強めているのが普通である。しかしながら、A-IIとキモトリプシンの複合体では、この疎水性ポケットに親水性のアルギニン側鎖が入り込んでおり、あまり有効な疎水的相互作用は行われていない。そのかわり、A-IIとキモトリプシンの間には、基質認識ポケットで行えなかった疎水性相互作用を補うような、広範囲にわたる疎水性相互作用が基質認識ポケットの外側で見られた。

インヒビターとプロテアーゼ間の相互作用としては、従来、両者の水素結合のみが注目され、疎水性相互作用に注目が集まることはなかった。しかしながら、A-IIとキモ

トリプシンの複合体の解析、及び、A-IIとトリプシンの複合体のモデル構造の組み立てを通して、インヒビターとプロテアーゼ間の疎水性相互作用の重要性が示された。そこで、BBI以外のプロテアーゼ・インヒビターについても、インヒビターとプロテアーゼ間の疎水性相互を、プロテイン・データ・バンクに登録されているインヒビター-プロテアーゼ複合体の構造を基に検討してみた。その結果、トリプシンを阻害するインヒビターでは、疎水性相互作用の大きさと、インヒビター-トリプシン間の結合定数の大きさとの間に明かな相関のあることを見出した。