

氏名	小林 秀丈
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第3394号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Aeromonas sobria</i> のセリンプロテアーゼの構造と機能に関する研究
論文審査委員	教授 岡本敬の介 教授 土屋 友房 教授 三好 伸一

学位論文内容の要旨

Aeromonas は自然環境中に広く生息している通性嫌気性グラム陰性桿菌であるが、ヒトに感染する菌種がいくつか分離されている。その病原因子に関してこれまで様々な報告がなされている。中でも、細菌性プロテアーゼは多様な病原効果を導く因子である事が明らかとなってきた。

そこで、今回申請者は *Aeromonas* の産生するセリンプロテアーゼ (*Aeromonas sobria* Serine Protease; ASP) について(1)大量精製法を確立する、(2) ASP の基質特異性を明らかにする、(3) ASP の機能と構造の関係を明らかにする、事を目指して研究を進めた。

asp 遺伝子を導入した *A. sobria* T94 の培養上清から ASP を精製した。その結果、2 L の培養上清から 24.1 mg の ASP を精製する事ができ、比活性が 54.1 倍に上昇した精製標品を得た。この様に ASP の大量精製法を確立し、精製した ASP を以下の実験に使用した。

ASP のペプチド基質に対する切断活性を調べた。その結果 ASP は Arg-Xaa-Lys-Lys/ 及び Arg-Xaa-Lys-Arg/ 等の塩基性アミノ酸残基が二個続いた部位を認識して切断する事を明らかにした。この性質は哺乳動物が産生している furin の性質と類似している点もあるが、furin の基質は切断しなかった事から、まったく同一ではない事がわかった。ASP と furin の構造の比較により、ASP に特徴的な構造が見かっており、この両者における構造の違いが基質選択性の違いの原因ではないかと推察している。

ASP の構造解析の結果より C 末端領域に kexin ファミリーで特徴的な P ドメイン様の構造を有している事がわかった。この領域が欠損した ASP の精製及び変異遺伝子の解析結果により、この領域は ASP の酵素活性には影響を与えないが、折りたたみ等の成熟化過程に影響を与える事がわかった。この研究が ASP の産生機構から病原性発現までの全貌を明らかにするための足がかりとなるばかりでなく、他の kexin ファミリーの機能解明にも役立つ、医学的に貢献できるものと考えている。

論文審査結果の要旨

本学位論文の研究は、ヒトに対して病原性を示す *Aeromonas sobria* が産生するセリンプロテアーゼ(ASP)に関し、その構造と機能との関係を明らかにすることを目指した基礎研究である。申請者はその目的を達成するため、(1)ASPの大量精製法の確立、(2)ASPの基質特異性の解析、(3)ASPの結晶構造の解析、(4)ASPのC末端領域の役割、の4つの視点から細部にわたる研究を遂行した。

その結果、ASPは哺乳類において生理的に重要な役割を果たす kexin ファミリーに属するセリンプロテアーゼ、*furin* と基質特異性や高次構造の両面で類似する一面を持ったセリンプロテアーゼであることを初めて明らかにした。原核生物由来のASPが哺乳類に保有する *furin* と類似した一面を持つことは、生物学的にも興味ある知見であり、生体内で機能するセリンプロテアーゼの進化を考える上でも重要な知見をもたらしたと考える。さらに、申請者はASPのC末端領域の機能についても解析し、C末端領域が *in vivo* におけるASPの成熟化に不可欠な役割を担っていることを明らかにした。

以上の研究成果は、単に *Aeromonas* 感染症におけるASPの病原的意義に一石を投じるのみならず、*furin* のような高等生物で機能するセリンプロテアーゼの分子メカニズムを解明するためのモデルとしても応用できる可能性を示唆しており、医学的に重要な礎を築いたと考える。これらの理由、並びに学位論文発表会における内容等を総合評価した結果、申請者は最終試験の合格基準に達していると判断する。