



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（生体情報）
報告番号	甲第1545号
学位記番号	第14号
氏名	三浦 陽子
授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	オオクチバスペプシンの構造と機能および分子進化に関する研究
論文審査担当者	主査： 森山 昭彦 副査： 櫻井 宣彦， 杉谷 光司， 成田 裕一

学位論文内容要旨 (1/2)

氏名	三浦 陽子	提出年月日	平成28年 1月 15日
主論文名	オオクチバスペプシンの構造と機能および分子進化に関する研究		
<p>ペプシンは胃におけるタンパク質の分解酵素である。ペプシンは不活性前駆体のペプシノゲンとして胃の主細胞から分泌され、塩酸と反応して自己触媒的にペプシンへと変換する。ペプシンはAタイプとCタイプに大別され、個体の成長や動物種の食性に適応したサブタイプが存在する。例えば、乳幼児期にみられるYタイプはミルクタンパクをよく分解し、肉食の哺乳類にみられるBタイプはコラーゲンをよく分解する。近年魚類のペプシンに関する研究も進められつつあるが、肉食の魚類ではBタイプに属するペプシンは知られていない。典型的な肉食魚類はBタイプとは異なる特性のペプシンを持つことで、肉食食性に適応したと考えられた。オオクチバス(別名:ブラックバス、<i>Micropterus salmoides</i>)は、食物連鎖の頂点に位置するほどの強い肉食食性を示す。本研究ではオオクチバスの胃よりペプシノゲン(LBPgn)を精製し、その性質を明らかにし、食性や環境にどのように適応してきたのかを考察した。</p> <p>オオクチバスの胃粘膜より、6成分のLBPgn(LBPgn 1-1、1-2、2-1、2-2、2-3、3)を精製した。酵素学的諸性質およびアミノ酸配列から、LBPgn 1、2はAタイプ、LBPgn 3はCタイプであると分類された。このように多くのアイソザイムを有するペプシンは、他の魚類では従来知られていない。多数のアイソザイムの存在は、酵素のタンパク量の合成速度を増加させる他、酵素の基質特異性を広げることも意味する。これに加え、主用成分であるLBPn 1-1、2-2は現在報告されている中で最も高い活性を有した。さらに、LBPn 1-1、2-2の触媒効率(k_{cat}/K_m)は魚類のペプシンの中で最も高い値を示した。このようなバスペプシンの高い活性を構造と基質特異性および、触媒効率の面から検討した。</p> <p>胃粘膜からmRNAを抽出し、cDNAクローニングを行って塩基配列を決定し、LBPgnのアミノ酸配列を推定した。LBPgn 1、2は290から294残基に連続した配列が欠損しているという特徴が得られた。加えて、280残基から300残基にかけては配列の置換も多数みられた。この280残基から300残基はペプシンが基質を認識するうえで重要なS'1基質認識部位を構成している。</p>			

(システム自然科学研究科)

学 位 論 文 内 容 要 旨 (2 / 2)

氏 名	三浦 陽子	提出年月日	平成 28 年 1 月 15 日
主論文名	オオクチバスペプシンの構造と機能および分子進化に関する研究		
<p>ペプシンは S'3 から S4 まで 7 か所の基質アミノ酸残基認識部位 (Subsite: S) が存在する。S1、S'1 サイトはペプチド (Peptide: P) の P1、P'1 のアミノ酸残基を認識し、その間を加水分解する。基質認識部位のアミノ酸残基は動物種の間で保存性が高い。しかし、LBPgn 1、2 の一次構造上、280 残基から 300 残基にかけて欠損や Gly への置換がみられており、Porcine Pn A とは異なる基質特異性を示す可能性が考えられた。そこで、ペプシン基質 (KPAEFFRL) とその一連の合成基質を用いてバスペプシンの基質特異性を検討した。LBPn 1-1、2-2 はブタペプシン A (Porcine Pn A) と同様に P'1 サイトが疎水性のアミノ酸残基を好んで分解した。これに加え、LBPn 1-1、2-2 は Porcine Pn A がほとんど認識しない Arg、Lys 等の塩基性のアミノ酸残基を認識し、分解した。LBPn 2-2 に P'1 Arg 合成基質 (KPARFFRL) を結合させた複合体をモデリングしたところ、S'1 サイトの外側を構成するアミノ酸残基が LBPn 2-2 では欠損や Gly へ置換していた。そのため、LBPn 2-2 は Arg、Lys 等の塩基性のアミノ酸残基を認識することが可能となり、広い基質認識を行うようになったことが示唆された。</p> <p>LBPn 1-1、2-2 の活性は 37°C まで安定であったが、50°C では急速に失活した。これは、Porcine Pn A が 60°C でも安定であったことと対照的であった。さらに、LBPn 1-1、2-2 は 20°C の反応で至適温度時の 40% 程度の活性を示したが、Porcine Pn A では 10% 以下の活性であった。このことから、オオクチバスペプシンは生息温度である水温に適応していると考えられる。また、LBPn 2-2 は、Porcine Pn A よりペプシン基質に対して k_{cat}/K_m 値が高かった。これは LBPn 2-2 が非常に高い k_{cat} 値を示していたことに起因する。さらに、アレニウスプロットから LBPn 2-2 は活性化ギブスエネルギーが Porcine Pn A より低いことが明らかとなった。このことから、LBPn 2-2 の高い k_{cat} 値は、酵素と基質の複合体が遷移状態となったときの安定化に大きく関係している可能性が示された。LBPn 2-2 が高い触媒能を有するに至った背景として、非同義置換および同義置換の比を計算したところ、LBPgn 2、Snakehead Pgn の共通祖先が加速進化を受けたことが示唆されたことも、この考えを支持していると考えられる。</p> <p>このように、オオクチバスは進化の過程でペプシノゲンのアイソザイムを増やし、Pgn の合成能を高めたと共に、ペプシンの基質特異性を広げ、触媒能を高めた結果、高いタンパク質分解活性を獲得したと考えられる。</p>			

博士論文審査結果の要旨及び最終試験結果の要旨

論文提出日	平成 28 年 1 月 15 日
学位試験日	平成 28 年 2 月 22 日

受付番号	1	論文提出者	三浦 陽子	
博 士 論 文 審 査 結 果				
学 位 審 査 委 員	主 査	森山 昭彦	副 査	櫻井 宣彦、杉谷 光司、成田 裕一
主論文題目	オオクチバスペプシンの構造と機能および分子進化に関する研究			
論文審査結果の要旨				
<p>陸生動物ペプシンには、食性に適応した性質のアイソザイムが知られている。本論文では、淡水生態系の頂点に位置するオオクチバスの強力な捕食、消化能力に着目し、胃液に含まれるペプシンの諸性質について検討している。1) オオクチバスペプシンの主要成分は比活性が高く、肉食に適した性質を持つ事を明らかにした。2) 活性の強さの要因を、ブタペプシンと比較して、構造的並びに反応速度論的に検討した。すなわち、基質認識部位近傍のループ構造の短縮と側鎖の小さいグリシンへの置換により、基質特異性が低く、基質親和性が弱くなっている事、<i>k</i>_{cat}値が大きく、触媒反応効率が高いため、結果として強い活性(大きい<i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_m値)を示す事を明らかにした。3) cDNA配列を決定し、他の魚類ペプシンとその配列を比較する事により、このようなバスペプシンの特性が加速進化によりもたらされた可能性を指摘した。このような知見は、酵素タンパク質の構造と機能と分子進化を一体として考える上で、貴重な知見を提供していると言える。</p>				
最 終 試 験 結 果				
最 終 試 験 担 当 者	主 査	森山 昭彦	副 査	櫻井 宣彦、杉谷 光司、成田 裕一
最終試験結果の要旨				
<p>審査委員会は、申請者の公聴会における研究発表と質疑応答、および学位審査会における応答から、専門領域や周辺学問領域についての学識と研究能力を持つものと判断する。進化に対する理論的背景、酵素反応速度論と酵素タンパク質の構造との関係など、個々の学識については今後さらなる研鑽を積むことが期待されるが、多岐にわたる諮問に対して概ね対応でき、様々な実験手法を駆使してペプシンの機能解析を試み、多くの新事実を明らかとした点は高く評価される。また、これらの結果を2報の英語論文として発表していることも評価に値する。これらを総合し、審査委員会は申請者が博士の学位(生体情報)に値すると判断する。</p>				