

氏 名 (国 籍)	張 振 中 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2542 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	<i>Aeromonas caviae</i> および <i>Vibrio proteolyticus</i> のアミノペプチダーゼ前駆体の活性型への転換
主 査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副 査	筑波大学教授 工学博士 田 中 秀 夫
副 査	筑波大学教授 農学博士 松 尾 勝
副 査	筑波大学教授 理学博士 藤 村 達 人
副 査	食品総合研究所室長 農学博士 林 清

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

*Aeromonas caviae* のアミノペプチダーゼ (apAC) と *Vibrio proteolyticus* のアミノペプチダーゼ (apVP) は共にプレプロ構造を持つが、それらの持つプロペプチドの機能については不明な点が多い。本研究では、まず大腸菌において apAC を発現させ、各種組換え体の性質を解析した。続いて、アミノペプチダーゼプロ体 (pro-apAC) の各種基質に対する酵素活性および熱・pH 安定性を測定した。apVP について、N および C 末端プロペプチドの機能を解析し、さらに、pro-apVP を成熟体に変換する酵素 PA プロテアーゼ (pro-aminopeptidase processing protease) を単離し、大腸菌において発現させた。

1. *Aeromonas caviae* T-64 のプロアミノペプチダーゼの N 末端プロペプチドが有する酵素活性阻害および分子内シャペロン様の機能を解明した結果、apAC は、シグナルペプチド、N 末端プロペプチド、成熟領域からなる前駆体タンパク質として生合成され、これらのうち、N 末端プロペプチドの機能を調べるため、各種発現プラスミドを構築し、それら大腸菌において発現させ、得られた酵素の性質を解析した。
  - 1) pro-apAC に PA プロテアーゼを作用させると、N 末端プロペプチドが切断されるが、その際、活性が上昇し、天然の成熟 apAC とほぼ等しくなった。その結果から、pro-apAC の N 末端プロペプチドは成熟領域活性を阻害していることが明らかになった。
  - 2) N 末端プロペプチドを欠失させた pro-apAC 遺伝子大腸菌において発現させると、封入体として生産され、アミノペプチダーゼ活性は示さなかった。また、pro-apAC および apAC の *in vitro* リフォールディングを行ったところ、pro-apAC の N 末端プロペプチドは、成熟領域が正しく折りたたまれるのを補助するシャペロン様の機能を有していた。
2. *Aeromonas caviae* T-64 のプロアミノペプチダーゼ (pro-apAC) の性質は
  - 1) pro-apAC および天然成熟 apAC の温度、pH、阻害剤の影響について調べたところ、pro-apAC の N 末端プロペプチドは、成熟領域構造の安定性を高め、また、活性部位を保護する機能がかった。
  - 2) 各種基質に対する pro-apAC の活性を測定したところ、pro-apAC は apAC の 2.1 ～ 84% の活性を有しており、また、基質組成の違いによって、プロペプチドの活性阻害の強さが異なっていた。
3. *Vibrio proteolyticus* のプロアミノペプチダーゼの N と C 末端プロペプチドの apVP は、シグナルペプチド、N 末

端プロペプチド、成熟領域、C末端プロペプチドからなる前駆体タンパク質として生合成される。それらのうち、NとC末端プロペプチドの機能を調べるため、各種発現プラスミドを構築し、それらが大腸菌において発現させ、得られた酵素の性質を解析した。

- 1) N末端プロペプチドは活性を持った可溶性酵素を発現するのに必要であるが、C末端プロペプチドは必要ではなかった。
  - 2) 酵素のフォールディングにおけるNおよびC末端プロペプチドの作用を調べたところ、C末端プロペプチドは大腸菌における酵素の正しいフォールディングを補助する作用があるが、C末端プロペプチドはその作用がなかった。
  - 3) pro-apVP, C末端プロペプチドの欠失体, PAプロテアーゼで処理したpro-apVP, PAプロテアーゼで処理したC末端プロペプチドの欠失体, 天然成熟apVPについて、Leu-pNA（ロイシンパラニトロアニリド）を基質として活性を比較したところ、N末端プロペプチドは成熟アミノペプチダーゼ領域の酵素活性を阻害しているが、C末端プロペプチドにはその作用がなかった。
4. *Aeromonas caviae* T-64のPAプロテアーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌での発現をおこなった。
- 1) 遺伝子のクローニングの結果、PAプロテアーゼは前駆体タンパク質として生合成された。
  - 2) 塩基配列により推定されるPAプロテアーゼのアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、PAプロテアーゼは細菌金属プロテアーゼとアミノ酸配列の相同性が高かった。
  - 3) PAプロテアーゼは前駆体タンパク質として生合成されたのち、N末端プロペプチドおよびC末端プロペプチドは自己触媒的に切断されることが明らかになった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

大腸菌において*Aeromonas caviae*のアミノペプチダーゼ(apAC)を発現させ、各種組換え体の性質を解析した結果、PAプロテアーゼは細菌金属プロテアーゼとアミノ酸配列の相同性が高かった。次いで、アミノペプチダーゼプロ体(Pro-apAC)について各種基質に対する酵素活性や熱・pH安定性を調べた結果、Pro-apACのN末端ペプチドは成熟領域構造の安定性を高め、また活性部位を保護する機能があることがわかった。一方、*Vibrio proteolyticus*のアミノペプチダーゼについてはNとCの両末端プロペプチドの機能を解析した結果、N末端プロペプチドは活性を持った可溶性酵素を発現するのに必要であるがC末端プロペプチドは必要ではなかった。

プロテアーゼは自己分解がはげしく、研究材料としては取り扱いにくい酵素であるが、申請者は遺伝子工学的方法を駆使し、*Aeromonas*と*Vibrio*のアミノペプチダーゼ前駆体の活性型への変換を明らかにした。

上述の研究はアミノペプチダーゼの生合成機構、自己触媒的に切断され活性化されることおよび同酵素の機能を明らかにした点で酵素化学の発展に寄与し、また食品化学への応用も期待され、高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。