

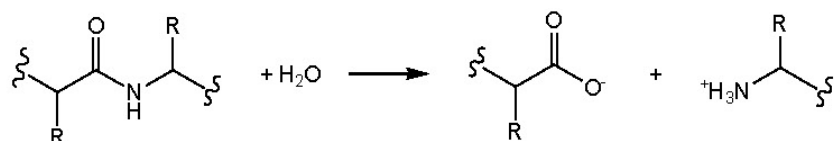
# Preparatory Problems IChO 2012

## Theoretical Problems

### 問題21 スブチリシンの基質特異性

アミノ酸の構造と三文字表記については、問題20の図を参照しなさい。

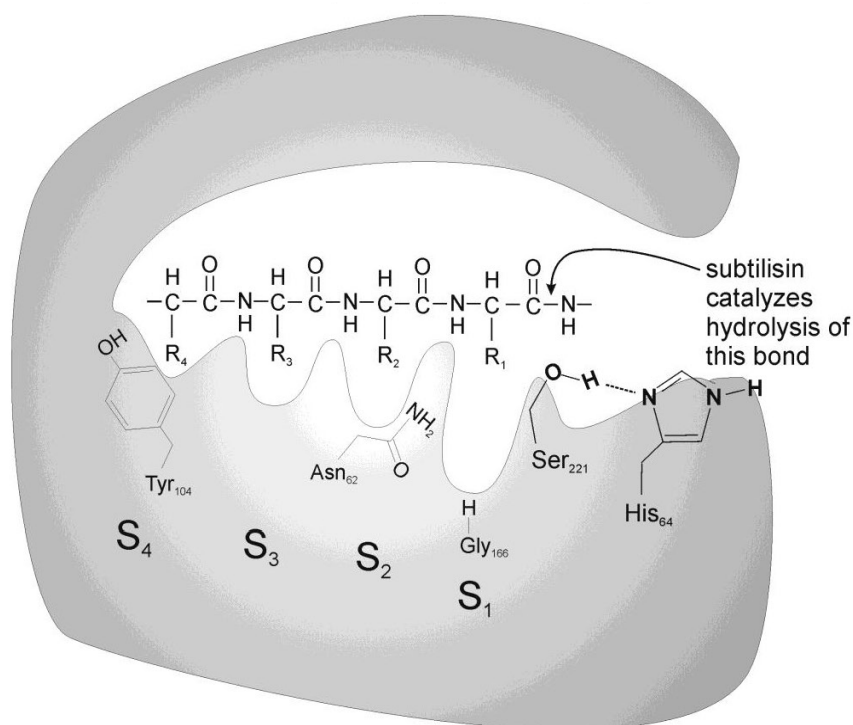
スブチリシンは細菌である *Bacillus amyloliquefaciens* によって産生されるセリンプロテアーゼの一種であり、基質となるたんぱく質のペプチド結合の加水分解を触媒する。



より一般的には、セリンプロテアーゼはアミドまたはエステルのようなドナー分子 (RCO-L) から、水や求核剤 (Nuc) の様なアクセプター分子へのアシル基の転移を触媒する。



下の図はスブチリシン (灰色の部分) の活性部位に結合した基質ペプチドの模式図である。セリン221とヒスチジン64は、ペプチド結合の加水分解を触媒するのに必須のアミノ酸残基である。



スブチリシンは大きな基質結合部位を持ち、そこに加水分解を受けるペプチド結合から見てN末端側の四残基が結合する。これらの四残基の側鎖は、それぞれ酵素の四つのサブサイトS1-S4に結合する。サブサイトに突き出しているスブチリシンのアミノ酸残基は上の図に示している。即ちサブサイト S1 ではグリシン166、サブサイトS2ではアスパラギン62、サブサイトS4ではチロシン104である。スブチリシンのこれらの残基の化学的、構造的な特徴から、どのようなペプチドが基質として結合し、加水分解されるのかが決定される。

Ala-Ala-Pro-Phe 配列にパラ-ニトロアニリンが結合した Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide はスブチリシンにより速やかに加水分解を受ける。これは基質の四つのアミノ酸残基が結合サブサイトとよく適合するためだ (Ala-Ala-Pro-Phe のそれぞれの側鎖がサブサイトのS4からS1にそれぞれ結合する)。部位特異的突然変異誘発法によってスブチリシンの結合部位のアミノ酸残基を変えることが可能であり、その結果、酵素の基質特異性を変えることが可能である。一つ目の実験として、グリシン166をイソロイシンに変えた変異体 (Gly166Ile 変異体) を作製し、この変異型酵素の触媒活性を以下のペプチドを基質として評価した。

- I Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide
- II Ala-Ala-Pro-Ala-*p*-nitroanilide
- III Ala-Ala-Pro-Glu-*p*-nitroanilide
- IV Ala-Ala-Pro-Tyr-*p*-nitroanilide

a) どのペプチド (I ~ IV) が変異型酵素 (Gly166Ile) によって最も速く加水分解を受けると考えられるか? (即ち最も大きな $k_{cat}/K_m$ を示すペプチドはどれか)

二つ目の実験では、サブサイト S1, S2, S4 のアミノ酸残基をアスパラギン酸に変更した。作製した変異体は以下の通りである。

- 変異体 1: グリシン166をアスパラギン酸に変異
- 変異体 2: グリシン166とアスパラギン62の二ヶ所をそれぞれアスパラギン酸に変異
- 変異体 3: グリシン166、アスパラギン62とチロシン104の三ヶ所をそれぞれアスパラギン酸に変異

変異型酵素の触媒活性は以下のパラ-ニトロアニリド-ペプチドを基質として評価した。

- I Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide
- V Ala-Ala-Lys-Phe-*p*-nitroanilide

VI	Arg-Ala-Lys-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
VII	Arg-Gly-Lys-Glu- <i>p</i> -nitroanilide
VIII	Ala-Ala-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
IX	Ala-Gly-Glu-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
X	Phe-Gly-Lys-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
XI	Leu-Gly-Phe-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
XII	Ala-Ala-Lys-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
XIII	Arg-Gly-Ala-Arg- <i>p</i> -nitroanilide
XIV	Arg-Gly-Lys-Phe- <i>p</i> -nitroanilide

b) どの基質がそれぞれの変異型酵素によって最も速く加水分解を受けたと考えられるか？