

所 属 (主指導教官)	生体高分子構造学講座 (箱嶋敏雄 教授)		
氏 名	岸 忠明	提 出	平成 13 年 1 月 9 日
題 目	Structural and Biochemical Studies of Neuropsin, a Serine Protease Expressed in the Limbic System of Mouse Brain, and Its Specific Inhibitor (マウス脳内プロテアーゼneuropsinとその特異的インヒビターの構造学的、生化学的研究)		
<p>要旨</p> <p>Extracellular serine protease neuropsin is expressed in the forebrain limbic area of adult brain and is implicated in synaptic plasticity. In the present study, (1) I characterized a crystal structure of neuropsin and (2) I identified a possible endogenous inhibitor specific for neuropsin <i>in vivo</i>.</p> <p>First, recombinant neuropsin was produced using a baculovirus expression system and was purified. Two crystal forms were obtained by a hanging-drop vapor-diffusion method with polyethylene glycol (PEG). Crystal form I belongs to triclinic space group <i>P1</i> with unit cell dimensions <math>a = 97.16 \text{ \AA}</math>, <math>b = 97.12 \text{ \AA}</math>, <math>c = 46.75 \text{ \AA}</math> and <math>\alpha = 99.17^\circ</math>, <math>\beta = 99.77^\circ</math>, <math>\gamma = 117.35^\circ</math>. There were six molecules in the crystallographic asymmetric unit. Crystal form II also belongs to triclinic space group <i>P1</i> but has unit cell dimensions <math>a = 38.40 \text{ \AA}</math>, <math>b = 55.16 \text{ \AA}</math>, <math>c = 65.37 \text{ \AA}</math> and <math>\alpha = 95.38^\circ</math>, <math>\beta = 89.98^\circ</math>, <math>\gamma = 110.46^\circ</math>. Intensity data to <math>3.1 \text{ \AA}</math> resolution for form I and to <math>2.1 \text{ \AA}</math> for form II were collected. The <math>2.1\text{-\AA}</math> crystal structure of neuropsin provides the three-dimensional view of one of the serine proteases highly expressed in the nervous system, and reveals a serine protease fold that exhibits chimeric features between trypsin and nerve growth factor (NGF)-<math>\gamma</math>, a member of the kallikrein family. Neuropsin possesses an <i>N</i>-glycosylated "kallikrein loop" but forms six disulfide bonds corresponding to those of trypsin. The ordered kallikrein loop projects proline toward the active site to restrict smaller residues or proline at the P2 position of substrates. The loop F, which participates in forming the S3/S4 sites, is similar to trypsin rather than NGF-<math>\gamma</math>. The unique conformations of the loops G and H form an S1 pocket specific for both arginine and lysine. These characteristic loop structures forming the substrate-binding site suggest the novel substrate specificity.</p>			

Second, a neuropsin inhibitor was detected as an SDS-stable complex with recombinant neuropsin in extracts of the hippocampus and cerebral cortex in adult mouse. After the purification (a  $3.3 \times 10^2$ -fold purification and a yield of 1.5%), peptide sequences were determined by amino acid sequencing and mass spectrometry, revealing that endogenous serine proteinase inhibitor 3 (SPI3) contributed to the formation of the SDS-stable complex with recombinant neuropsin. Addition of the recombinant SPI3, prepared with a *Pichia pastoris* expression system, to recombinant neuropsin resulted in an SDS-stable complex and the complex formation followed bimolecular kinetics with an association rate constant ( $k_{\text{ass}}$ ) of  $3.4 \pm 0.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and a dissociation constant ( $K_i$ ) of 0.8 nM, showing that SPI3 was a slow, tight binding inhibitor of neuropsin. Furthermore, *in situ* hybridization histochemistry showed that SPI3 mRNA was expressed in the limbic system, with the most intense hybridization signals in pyramidal neurons in the CA1-3 subfields of the hippocampus, as was neuropsin mRNA. The finding indicates that SPI3 may inactivate neuropsin to control the activity level of neuropsin in adult brain.

These structural and biochemical studies of neuropsin and its specific inhibitor provide the clues to elucidate the mechanism of memory formation and to drug-design in treatment of pathological conditions such as epilepsy.

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 岸 忠明

平成13年1月9日に提出された論文は、マウス脳内プロテアーゼ neuropsin のX線結晶解析の方法を用いた三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明、ならびに、その特異的インヒビターとしての serine proteinase inhibitor 3 (SPI3) の単離とその生化学的研究からなる。

三次元構造決定では、試料の十分な精製、良質な結晶の調製、高分解能の観測強度データの収集、分子置換法による位相決定、精度の高い三次元構造の精密化がなされており、技術的信頼性は高い。蛋白質のX線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質の発現や精製などの生化学実験から、X線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの方法について十分な実力を有するものと判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した生化学的データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。これらは、neuropsin の活性部位ならびに基質結合部位の同定、糖付加された特異的なカレクレイン様ループの同定、ならびに基質特異性の検討である。

その特異的インヒビターの探索では、蛋白質精製などの生化学的手法に加えて、遺伝子クローニング、発現、酵素学的解析、ならびに組織学的解析が行われており、それらの方法について十分な実力を有するものと判断した。

SPI3 の neuropsin に対するインヒビターとしての活性は in vitro の系で明確に示されており、脳内での発現分布も neuropsin のインヒビターとして働くに十分な示唆を与えている。

また、論文全般におりて、記述も水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は脳の可塑性に関与するプロテアーゼ関連蛋白質の構造生物学に貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。