

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06997

研究課題名(和文) 哺乳類ジペプチド分解酵素の基質特異性とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Substrate specificity and physiological function of mammalian dipeptidases

研究代表者

奥村 宣明 (Okumura, Nobuaki)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：20224173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では蛋白質の代謝回転や消化吸収に伴いジペプチドの生成と分解が起こっており、アミノ酸獲得のために必須の働きをしている。また、カルノシンなどのジペプチドは特定の臓器でアミノ酸から合成され、独自の生理機能を果たしている。われわれはジペプチド分解酵素のひとつとして金属ペプチダーゼCN2を見出し解析を行ってきた。本研究では、CN2の基質ジペプチドの*in vitro*での特異性を明らかにし、さらにこれがMn²⁺とZn²⁺の存在下で異なること、また培養細胞内での活性がZn²⁺存在下のものと一致することなどを明らかにした。これらの結果から、蛋白質分解の最終段階におけるCN2の役割が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dipeptides are produced and degraded in mammalian cells during protein turnover and digestion to obtain amino acids required for nutritional demands. In addition, some kinds of dipeptides such as carnosine are synthesized from amino acids in specific organs and play some specific roles as a bioactive molecule. We have previously found that a metallopeptidase CN2 hydrolyses several kinds of dipeptides including carnosine. In this study, we have determined the substrate specificity of CN2, and shown that CN2-Mn²⁺ and CN2-Zn²⁺ complexes have different substrate specificity. When substrate specificity in cultured cells was examined, it was more similar to that of the CN2-Zn²⁺ complex observed in *in vitro* enzyme assay. These results demonstrate the role of CN2 in the final step of protein and peptide breakdown.

研究分野：生化学

キーワード：ジペプチド カルノシン ヒスチジン アラニン 金属プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

生体内には多くのジペプチドが存在する。その一部はタンパク質の代謝回転や消化吸収の中間代謝物として生成と分解を繰り返し、生命を維持するのに必要なアミノ酸を獲得するために必須の働きをしている。また、カルノシンなど一部のジペプチドは特定の組織で特異的な合成酵素によってアミノ酸から合成され、高濃度で蓄積されて、カルボニル基による酸化を防ぐスカベンジャー機能、運動に伴って生じる乳酸を中和する pH 緩衝作用、交感神経活性化作用など、体内環境の恒常性維持に不可欠な生理的作用をおこなっている。

これらのジペプチドの機能にはジペプチドの生成と分解に関わる酵素が関与している。近年、ジペプチド分解酵素、カルノシン合成酵素、ジペプチド輸送体などが同定され、ジペプチドの機能解析が進んできた。私たちはこれまでに、カルノシンを分解できるジペプチダーゼとして金属ペプチダーゼである CN2 を同定し、立体構造、反応機構、並びに生理機能の解析を行ってきた。しかし、この酵素の *in vitro* での活性には Mn^{2+} が必要で、細胞内には活性化に十分な Mn^{2+} が存在するとは考えにくい。実際、細胞内で酵素活性を持つかどうかは証明はできてはいなかった。

われわれは最近、CN2 が Zn^{2+} 存在下でいくつかの特定のジペプチドを分解することを見出した。 Zn^{2+} は細胞内にも十分量存在すると考えられ、CN2 の結合も Mn^{2+} より強い。実際、細胞内で CN2 がジペプチダーゼ活性を有することを強く示唆するとともに、金属依存性の視点から基質特異性について改めて解析する必要性が明らかになった。そうすると、なぜ CN2 がそのペプチドを切る必要があるのか、そもそも、そのペプチドが生体内にどのくらい存在するのか、もし多量に存在するとすれば生体内でいかなる意義を持つのかなど、さまざまな疑問が生じた。そこで、ジペプチダーゼ CN2 の基質特異性を手がかりとして、生体内のジペプチドの代謝の全体像を明らかにし、またそれを通じてジペプチドの新たな機能を見出すこと目指して本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、まず哺乳類のジペプチダーゼである CN2 とその関連酵素に関して、その基質特異性の範囲を明らかにし、細胞や組織における役割を明確にする。その際、精製タンパク質のバッファー中での活性測定だけでなく、実際の細胞内でどのような金属と結合し、どのような基質と反応するかを調べる方法を確立して解析を行う。これらの実験を

を通じて、CN2 とその関連酵素の生理的意義を明らかにし、生体内ジペプチド分解システムの全体像における個々の酵素の役割を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) CN2 および関連タンパク質の調製
CN2 タンパク質は、マウス CN2 をコードする cDNA を pGEX-6P3 ベクターにクローニングし、大腸菌に発現させて、グルタチオンカラム、および Q-Sepharose HP カラムを用いて精製した(文献 2)。CN2 の点突然変異体は Quickchange 法により作成し、上記と同様にして精製標品を得た。

(2) CN2、CN1 の培養細胞における発現
CN2 の cDNA を pCMV3-Tag1 ベクターにサブクローニングし、得られたベクターを HEK293T 細胞に Lipofectamin 2000 を用いてトランスフェクションし、2 日間培養のち実験に用いた(文献 1)。

(3) ジペプチダーゼの活性測定
His の定量法を用いる方法
精製した CN2 を Mn^{2+} または Zn^{2+} の存在下で基質 (Xaa-His) とインキュベートし、生成した His を *o*-フタルアルデヒドとアルカリ溶液中で反応させることにより定量した(文献 2)。

② *o*-フタルアルデヒドを用いる方法
精製した CN2 を Mn^{2+} または Zn^{2+} の存在下で基質とインキュベートし、*o*-フタルアルデヒドと反応させたのち、逆相 HPLC でアミノ酸およびジペプチドの定量を行った(文献 1)。

培養細胞を用いる方法
CN2 を発現させた HEK293T 細胞を用いし、その培地をアミノ酸を含まない MEM 溶液に交換し、この培地に基質ペプチドを加えて 60 分間インキュベーションした。その後、培地中のアミノ酸とペプチドを の方法で定量した(文献 1)。

(4) 質量分析
CN2 は精製標品を 20 pmol/ml の 100mM 重炭酸アンモニウム溶液となるように調整した。質量分析装置は、ESI-TOF MS 装置 (AccuTOF, 日本電子製) を高 m/z イオンの解析に最適化して用いた。サンプルはナノフローイオン源を用いてイオン化し、上記の質量分析装置に導入した(文献 2)。

4. 研究成果

(1) CN2 の非共有結合複合体の質量分析による検出と解析
CN2 は M20 ファミリーに属する金属ペプチダーゼであり、水溶液中でダイマーとして存在すると考えられる(図 1)。われわれは、水溶液中でのホモダイマーや金属との複合体

など、CN2 の非共有結合性の複合体全体の質量を質量分析によって測定することを試み、これを CN2 の水溶液中での状態を知る方法の一つとして種々の解析に利用してきた。

われわれは、CN2 の反応機構の解析を目的として、質量分析法を用いてダイマー交換反応をモニターする方法を開発した。これを利用して、CN2 の酵素反応がダイマー間の相互作用を必要とすることを証明し、これにより、CN2 がダイマー形成を必要とするユニークな反応機構をしていることが明らかになった(文献 2)。

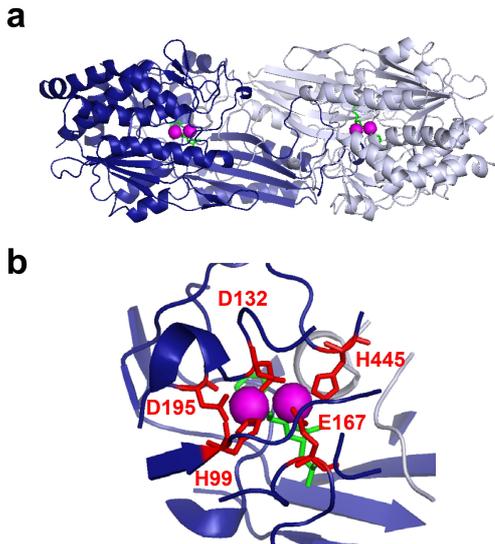


図1 マウス CN2 の立体構造。(a) ホモダイマーの全体像。(b) 活性中心および結合した Mn²⁺ (マゼンタ) と基質アナログ (緑) (文献 1)。

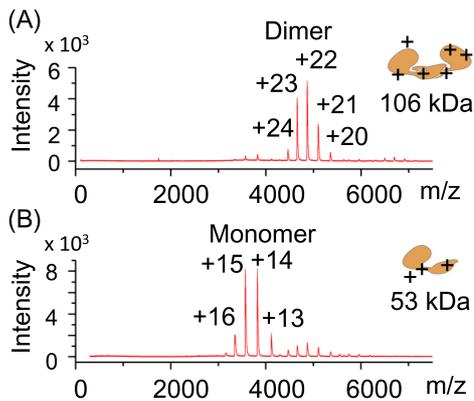


図2 水溶液中の CN2 のモノマーとダイマーの質量分析法による検出(文献 2)

(2) CN2 の各種 2 価金属イオンとの親和性の質量分析法による解析

CN2 は X 線結晶解析の過程で Mn²⁺ 結合型としても Zn²⁺ 結合型としても存在できることが判明したが、立体構造上は両者に顕著な差異はなかった。一方、ジペプチド分解活性はこれまで Mn²⁺ 結合型のみがアクティブであるとされてきた。しかし、各金属と CN2 との親和

性など、詳しいことはわかっていなかった。

そこで、CN2 と金属イオンのアフィニティーを調べるため、水溶液中での CN2 と金属の複合体全体の質量を質量分析装置で測定することを試みた。その結果、CN2 と金属イオンとの結合がこの方法で検出できることが分かった(図 3、文献 2)。これを用いて、CN2 と各種の 2 価金属イオンとの結合の親和性を解析したところ、Zn²⁺ が Mn²⁺ よりも強いアフィニティーで結合すること、ほかに Ni²⁺、Co²⁺、Fe²⁺ も結合すること、一方、Mg²⁺ などは結合しないことなどが明らかになった(図 4)。

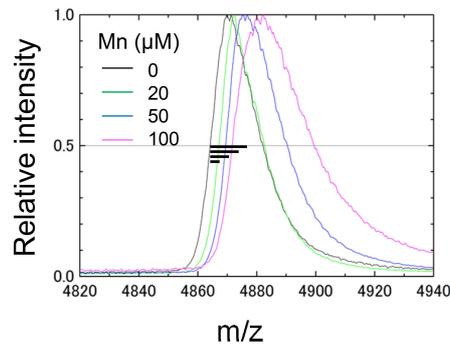


図3 CN2 と Mn²⁺ との複合体の質量分析法による検出(文献 1)

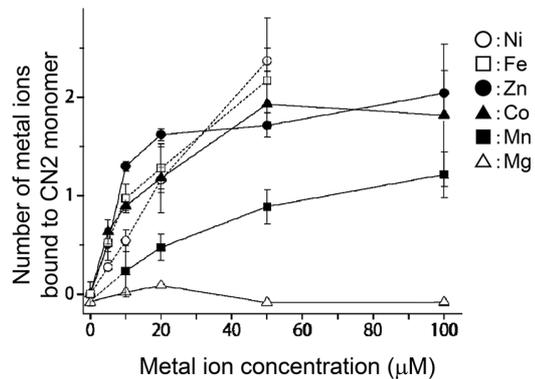


図4 質量分析による CN2 と各種金属イオンとの親和性の解析(文献 1)

(3) CN2 の in vitro での基質特異性の金属イオンによる相違の解析

CN2 はもともとカルノシン (-Ala-His) を基質にして見出されたが、CN2 によるカルノシンの分解には Mn²⁺ が必要で、Zn²⁺ 存在下ではカルノシンは分解できなかった。しかし、CN2 がカルノシンを分解するのに必要な Mn²⁺ の濃度は 100 μM 程度であり、細胞内濃度よりかなり高いと考えられた。したがって、CN2 の実際の生体内の活性についてはさらに検討する必要があると考えられた。

そこで、Zn²⁺ 存在下で CN2 が何らかの活性を持つ可能性について、種々の基質を用いて検討した。その結果、20 種類の Xaa-His の中では、Leu-His と Met-His が分解されることが判明した。この二種類のジペプチドは Zn²⁺、Mn²⁺ のどちらの存在下でも分解されたが、そ

の一方で、カルノシンを含む数種のペプチドは Mn^{2+} 存在下でのみ分解された(図5)。これらの結果から、CN2- Zn^{2+} 複合体はジペプチダーゼ活性を持つアクティブなフォームであり、CN2- Mn^{2+} 複合体とは異なる基質特異性をもつことが明らかになった。

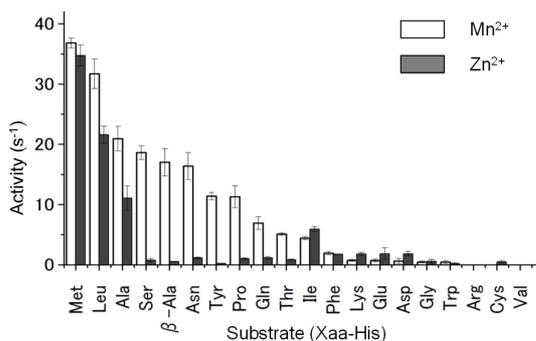


図5. CN2の Mn^{2+} および Zn^{2+} 存在下での基質特異性(文献1)

(4) 細胞内におけるCN2の基質特異性の解析と、CN1との比較解析

CN2は Mn^{2+} 型と Zn^{2+} 型で基質特異性に違いがあることが分かったが、実際の細胞内でどちらの方として存在するか明らかにする必要がある。そこで、HEK293T細胞にCN2、および同じファミリーに属するジペプチダーゼであるCN1を一過性に発現させ、この培養細胞の培地にジペプチドを加えて一定時間後に培地を回収し、そこに含まれるアミノ酸をプレラベル法で分析した。その結果、培地にLeu-His, Met-Hisを加えた場合はアミノ酸に分解されるが、カルノシンを加えた場合には分解されなかった(図6)。一方、CN1はLeu-HisとMet-Hisを分解せず、カルノシンを分解した(図6)。さらに、各種の基質について検討したところ、CN2のHEK293T細胞内における基質特異性が、 Zn^{2+} 型CN2よりも Mn^{2+} 型CN2と近いことが明らかになった。これらのことから、CN2はHEK293T細胞内では Mn^{2+} 型として機能している可能性が示唆された。

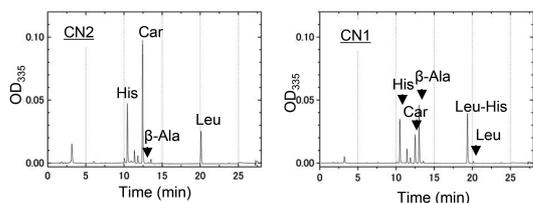


図6. CN2、CN1を発現させたHEK293T細胞の培地にCarnosineとLeu-Hisを加えた時のペプチドの分解(文献1)

(5) 結論

CN2はこれまで Mn^{2+} のみで活性化されると考えられてきたが、CN2と各種金属の親和性の比較した結果、親和性は Zn^{2+} が最も高く、 Mn^{2+} は比較的弱いことがわかった。さらに、種々のジペプチドを基質として活性を再検討した結果、 Zn^{2+} 結合型はLeu-His、Met-Hisなどを分解するアクティブな酵

素であることが判明した。さらにこれらの基質はCN2を発現させた培養細胞においても分解された。これらの結果から、CN2の生理的条件下の基質特異性の範囲が明らかとなった。組織染色の結果などと考え合わせると、CN2は小腸や腎臓において、上皮細胞が吸収したジペプチドを、ある幅の広い基質特異性をもって分解し、タンパク質分解の最終段階の反応を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

(1) Okumura N, Takao T. The zinc form of carnosine dipeptidase 2 (CN2) has dipeptidase activity but its substrate specificity is different from that of the manganese form. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有り, 16, 2017 484-490. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.100.

(2) Okumura N, Tamura J, Takao T. Evidence for an essential role of intradimer interaction in catalytic function of carnosine dipeptidase II using electrospray-ionization mass spectrometry. *Protein Science*, 査読有り, 25, 2016, 511-522. DOI: 10.1002/pro.2842.

[学会発表](計2件)

奥村宣明、カルノシンジペプチダーゼ2(CN2)に結合する金属イオンと基質特異性の解析、生命科学系合同年次大会、2017年、神戸

②奥村宣明、質量分析法による蛋白質の同定と定量、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年、大阪

[図書](計1件)

Okumura N, 他、RSC Publishing, *Food and Nutritional Components in Focus - Imidazole dipeptides*, 2015, 602 (pp.257-276)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/metabolism/taisha.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 宣明 (OKUMURA Nobuaki)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 20224173

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし