

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390031
 研究課題名（和文） 多機能性プロテアーゼ、オキシトシナーゼサブファミリーの作用メカニズム研究
 研究課題名（英文）Mechanisms of Enzymatic Action of the Oxytocinase Subfamily of Aminopeptidases
 研究代表者
 辻本 雅文（TSUJIMOTO MASAFUMI）
 独立行政法人理化学研究所・辻本細胞生化学研究室・主任研究員
 研究者番号：00281668

研究成果の概要：本研究において私たちは妊娠の維持、記憶の維持、血圧調節、ガン細胞の増殖制御、抗原ペプチドのプロセッシングなどその生理的/病理的重要性が明らかとなってきたオキシトシナーゼサブファミリーを含む M1 アミノペプチダーゼ酵素の反応を点変異体を用いて解析し、M1 酵素の基質特異性を決定している残基を同定することに成功した。これらの成果は M1 酵素の反応機構および基質結合部位の構造を解明し、M1 酵素を標的する医薬品を開発するうえで重要な知見を与えると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,300,000	0	7,300,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	2,400,000	17,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生化学

キーワード：アミノペプチダーゼ、基質特異性、一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

(1)近年オキシトシナーゼサブファミリーを含む M1 アミノペプチダーゼ酵素の生理的/病理的機能解析に関する研究が進展し、妊娠の維持、記憶の維持、血圧調節、ガン細胞の増殖制御、抗原ペプチドのプロセッシングなどの興味深い活性が報告されるようになり、これら酵素が創薬の標的となりうることを示された。しかし M1 アミノペプチダーゼ酵素は一般に分子量が大きく、結晶解析など構造生物学的に構造を決定することは困難であった。

(2)M1 アミノペプチダーゼ酵素は酵素活性を発揮するために活性中心に存在する亜鉛を必要とする。これまでに亜鉛が関与し、各酵

素に共通する N-末端アミノ酸の遊離反応に関してはその反応機構が検討されていた。しかし各酵素が示す基質特異性の違いを担うアミノ酸残基についての検討はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

(1)本研究で私たちは血圧調節に重要ですでに創薬研究の標的蛋白質として注目されているアミノペプチダーゼ A (APA)、小胞体において抗原ペプチドの最終プロセッシング酵素として機能し、ウイルスやがん細胞に対する免疫の成立およびその異常のため自己免疫疾患の発症に関与すると考えられている脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP)、胎盤特異的に発現し、胎盤の形成

に關与する可能性が考えられているリーベリン/アミノペプチダーゼ Q(APQ)を取り上げ、各酵素に特徴的な基質特異性を決定しているアミノ酸残基の同定を試みた。

(2) A-LAP はその一塩基多型解析から本態性高血圧症の危険因子とされている。そこで本酵素の各種変異体を作製し、酵素活性と病態との関連を検討することとした。

(3)妊娠高血圧症においては低分化化合物を投与すると胎盤を通じて胎児へ到達し、その發育に悪影響を与える可能性が危惧される。そこで本研究において医学部産婦人科の臨床研究グループとの共同研究として、血圧調節作用を有する APA の組換え蛋白質を調製し、これを投与することで APA のバイオ医薬としての開発の可能性について検討することにした。

3. 研究の方法

(1)私たちはこれまでに M1 アミノペプチダーゼ酵素の大量生産・精製系を確立してきた。本研究ではこれらを活用し、各酵素の野生型および部位特異的変異体の精製標品を調製し、その酵素活性を詳細に測定することでその酵素学的性状を詳細に比較検討した。変異体の作製はすでに確立されている通常の方法に依った。

(2)APA による血圧調節の研究は、組み換え型酵素を正常または高血圧症モデルラットへ尾静脈から投与し、以後の血圧の変化をモニターした。

4. 研究成果

(1)APA はカルシウム存在下でアンジオテンシン II など N-末端に酸性アミノ酸を有するペプチドに特異性を示すユニークな酵素である。各 M1 酵素の一次構造を比較し、他の酵素間では保存されており、APA でのみ異なる残基を検索した結果 Asp-221 を同定した。本残基を Asn, Gln に変えたところ APA に特徴的はカルシウム感受性および酸性アミノ酸に対する特異性が失われていた。分子モデリングの結果、本残基は亜鉛を含む

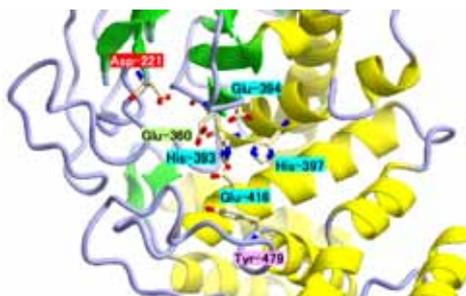


図 1 : APA 活性中心の分子モデル

活性中心の近傍に存在することが示されたことから、本残基はカルシウムとの結合を介して基質ペプチドの N-末端アミノ酸側鎖と相互作用することで特異性を発現するものと考えられた (図 1)。

(2)APA の Asp-221 に相当する A-LAP の Gln-181 の機能について検討した。その結果本残基を Asp に変換するとその基質特異性が中性アミノ酸から塩基性アミノ酸へと変化することが示された。したがって A-LAP の Gln-181 は基質ペプチドの N-末端アミノ酸側鎖を相互作用することで、本酵素の中性アミノ酸特異性を決定しているものと考えられた (図 2)。A-LAP と同じオキシトシナーゼサブファミリーに属し、小胞体において抗原ペプチドのプロセッシングに關与する白血球由来アルギニンアミノペプチダーゼ(L-RAP)は塩基性アミノ酸に特異的であり、かつ相当する残基が Asp である。したがってこの結果はともに小胞体アミノペプチダーゼである A-LAP と L-RAP の基質特異性の相違が進化の過程での 1 アミノ酸の変化に由来すると考えられ興味深い。

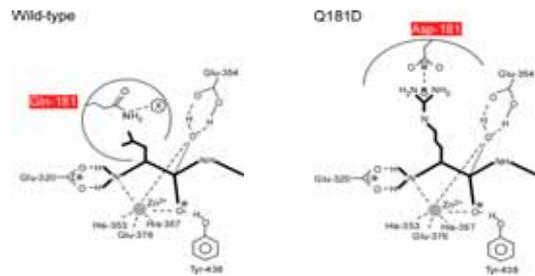


図 2 : A-LAP の基質認識機構

(3)A-LAP には 3 3 種の遺伝子多型が存在し、そのうち Lys528Arg 変異体は本態性高血圧症と連関している (Yamamoto, N, *et al. Hum Mutat.* 19, 251, 2002)。そこで各種 A-LAP 多型酵素を比較したところ Lys528Arg 変異体のみその酵素活性が著しく低下していた。A-LAP は血圧上昇ホルモンであるアンジオテンシン II を不活性化し、血圧降下ホルモンであるブラジキニンの生成を増加させることから、本研究結果は酵素活性の低下が実際に高血圧症の発症の原因となりうる可能性をさらに高めると考えられる。

(4)胎盤特異的に発現しているリーベリン/APQはM1 酵素に共通する基質認識モチーフである GAMEN 配列が HAMEN に変化しているため酵素活性の存在が当初疑問視されていた。そこで私たちはリーベリン/APQの酵素学的性状解析を初めて行ない、そのアミノペプチダーゼ活性を確認した。さらに HAMEN への変換の意義について検討するため GAMEN 配列を有

する変異体と比較したところ、基質特異性が大きく異なることを見出した。このことは進化の過程でGAMENからHAMENへ変化することでリーベリン/APQの基質ポケットの構造が変化したことを示唆している(図3)。

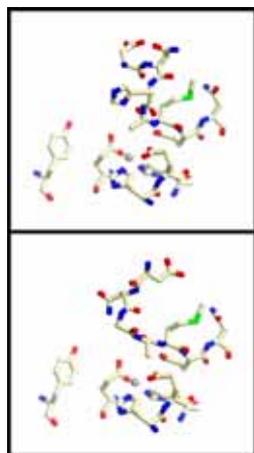


図3: HAMEN(上)/GAMEN(下)配列を有するリーベリン/APQの活性中心の構造モデル

HAMEN配列は霊長類のみが有していることから、他の哺乳類とは異なる霊長類独特の胎盤機能の進化にリーベリン/APQのHAMEN配列の変化が寄与している可能性を考えさせる。

(5)妊婦に低分子のクスリを用いることは、胎児-胎盤系を通じて、胎児の成長等に影響を与える可能性がある。したがって胎児-胎盤系を通過しないクスリの開発には意味があると考えられる。妊娠に伴う病態として妊娠中毒症/妊娠高血圧症があるが、私たちは本研究においてAPAが胎盤を通過しない血圧降下薬となる可能性を検討した。その結果、組み換え型APAを投与した高血圧症ラットにおいて顕著な血圧の低下が観察された。このことはAPAのバイオ医薬として(特に産婦人科領域で)の開発の可能性を示している

本研究を通して私たちはM1アミノペプチダーゼの基質特異性(すなわち各酵素の個性)を決定する重要な残基の同定に成功した。またアミノペプチダーゼと病態との関連やバイオ医薬としての開発の可能性を示した。これらの成果はアミノペプチダーゼの基質認識機構、基質ポケットの構造に関する基礎的な知見を提供するものであるとともに、酵素を標的としたクスリの開発に資するものと考えている。

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10件)

Goto, Y., Tanji, H., Hattori, A. and Tsujimoto, M. (2008) Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic reticulum aminopeptidase-1; *Biochem. J.*, 416, 109-116, 査読有

Ishii, M., Hattori, A., Numaguchi, Y., Tsujimoto, M., Ishiura, S., Kobayashi, H., Murohara, T., Wright, J.W. and Mizutani, S. (2008) The effect of recombinant aminopeptidase A on hypertension in spontaneously hypertensive rats: its effect in comparison with candesartan; *Horm Metab Res.* 40, 887-891, 査読有

Tsujimoto, M., Goto, Y., Maruyama, M. and Hattori, A. (2008) Biochemical and enzymatic properties of M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure; *Heart Fail. Rev.* 13, 285-291, 査読有

Mizutani, S., Ishii, M., Hattori, A., Nomura, S., Numaguchi, Y., Tsujimoto, M., Kobayashi, H., Murohara, T. and Wright, J.S. (2007) New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension; *Heart Fail. Rev.* 13, 273-284, 査読有

Goto, Y., Hattori, A., Mizutani, S. and Tsujimoto, M. (2007) Aspartic acid-221 is critical in the calcium-induced modulation of the enzymatic activity of human aminopeptidase A; *J. Biol. Chem.* 282, 37074-37081, 査読有

Maruyama, M., Hattori, A., Goto, Y., Ueda, M., Maeda, M., Fujiwara, H. and Tsujimoto, M. (2007)

Laeverin/aminopeptidase Q, a novel bestatin sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of aminopeptidases; *J. Biol. Chem.* 282, 20088-20096, 査読有

Mizutani, S., Shibata, K., Kikkawa, F., Hattori, A., Tsujimoto, M., Ishii, M. and Kobayashi, H. (2007) Essential role of placental leucine aminopeptidase in gynecologic malignancy; *Expert Opin. Ther. Targets*, 11, 453-461, 査読有

Goto, Y., Hattori, A., Ishii, Y., Mizutani, S. and Tsujimoto, M. (2006) Enzymatic properties of human aminopeptidase A; regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV; *J. Biol. Chem.* 281, 23503-23513, 査読有

Goto, Y., Hattori, A., Ishii, Y. and Tsujimoto, M. (2006) Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1; FEBS Lett. 580, 1833-1838, 査読有
服部 明, 辻本雅文, M1 アミノペプチダーゼファミリーの新たな生理機能; (2006) 日本血栓止血学会誌, 17, 20-28, 査読有

[学会発表](計 15 件)

辻本雅文, 小胞体アミノペプチダーゼの酵素活性と機能制御機構, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009 年 3 月
後藤芳邦, 丹治弘江, 服部 明, 辻本雅文, 小胞体アミノペプチダーゼの基質認識機構, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月
有坂尚美, 丸山正人, 服部 明, 辻本雅文, 点変異導入によるヒト laeverin の His379 残基の機能解明, 第 31 回日本分子生物学会年会 / 第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 2008 年 12 月
後藤芳邦, 丹治弘江, 服部 明, 辻本雅文, ヒト脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼの Glu-181 残基は基質特異性に重要である, 第 31 回日本分子生物学会年会 / 第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 2008 年 12 月
辻本雅文, 膜結合型 M1 アミノペプチダーゼの酵素活性とその制御, 第 13 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 吹田, 2008 年 8 月
後藤芳邦, 服部 明, 辻本雅文, カルシウムイオンによるアミノペプチダーゼ-A 活性制御機構の解明, 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月
後藤芳邦, 服部 明, 辻本雅文, ヒトアミノペプチダーゼ A の Asp221 残基はカルシウムによる活性制御に必須である, 第 30 回日本分子生物学会年会 / 第 80 回日本生化学会大会 (BMB2007), 横浜, 2007 年 12 月
Goto, Y., Hattori, A. Mizutani, S. and Tsujimoto, M., Asp-221 plays an essential role in the calcium-dependent regulatory mechanism of human aminopeptidase A, 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece, 2007 年 10 月
Maruyama, M., Hattori, A, Goto, Y. Ueda, M. Maeda, M. Fujiwara, H. and Tsujimoto, M.

Laeverin/aminopeptidase Q: a novel bestatin sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of aminopeptidases, 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Patras, Greece, 2007 年 10 月

丸山正人, 服部 明, 後藤芳邦, 藤原 浩, 辻本雅文, 新規アミノペプチダーゼ Laeverin の酵素学的性状の解析, 第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 吹田, 2007 年 8 月

後藤芳邦, 服部 明, 辻本雅文, アミノペプチダーゼ A の Asp-221 残基はカルシウムとの相互作用に必須である, 第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 吹田, 2007 年 8 月

後藤芳邦, 服部 明, 辻本雅文, アミノペプチダーゼ A の酵素活性は Ca^{2+} と AngII によって制御される, 第 50 回日本薬学会関東支部大会, 新潟, 2006 年 10 月

丸山正人, 服部 明, 辻本雅文, 神経細胞における胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼの細胞膜移行誘導メカニズムの解明, 第 11 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 仙台, 2006 年 8 月

Goto, Y., Hattori, M., Ishii, Y., Mizutani, S. and Tsujimoto, M., Characterization of recombinant human aminopeptidase A expressed in a baculovirus system, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006 年 6 月

Hattori, A. and Tsujimoto, M., Identification of SDF2-L1 as a binding protein to A-LAP/ERAP1 in the ER, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本 雅文 (TSUJIMOTO MASAFUMI)
独立行政法人理化学研究所・辻本細胞生化学研究室・主任研究員
研究者番号: 00281668

(2) 研究分担者

服部 明 (HATTORI AKIRA)
独立行政法人理化学研究所・辻本細胞生化学研究室

学研究室・客員研究員

研究者番号：50300893

丸山 正人(MARUYAMA MASATO)

独立行政法人理化学研究所・辻本細胞生

学研究室・協力研究員

研究者番号：00399445

後藤 芳邦(GOTO YOSHIKUNI)

独立行政法人理化学研究所・辻本細胞生

学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：90455345