

平成21年 4月 30日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19770088  
 研究課題名（和文） アミノペプチダーゼ N の反応機構と基質認識機構の解明  
 研究課題名（英文） Study for the reaction and substrate-recognition mechanisms of aminopeptidase N  
 研究代表者  
 中嶋 義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：80372770

研究成果の概要：アミノペプチダーゼ N (APN) は様々な種によく保存されているペプチダーゼである。タンパク質分解の最終段階を担う重要な酵素である。APN は広い基質特異性を持つ。すなわち、基質の N 末端が酸性アミノ酸を除く 17 種類のアミノ酸を認識し、加水分解できるユニークな特徴を持つ。本研究では大腸菌由来酵素をターゲットとして、酵素による反応や基質認識のメカニズムについて酵素活性と X 線結晶構造解析を用いて研究をおこなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

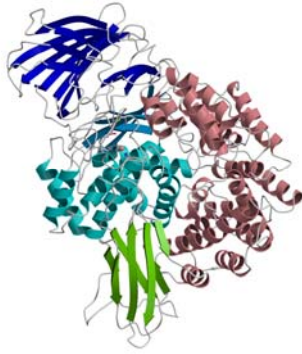
キーワード：X 線結晶解析、酵素反応、基質認識

## 1. 研究開始当初の背景

アミノペプチダーゼ N (EC: 3.4.11.2; APN) はペプチダーゼファミリー M1 に属し、幅広い基質特異性を示す亜鉛含有ペプチダーゼである。ヒト白血病の分類を容易にする骨髓細胞のマーカーとして同定された。本酵素は微生物から高等動物まで様々な生物種に広く分布している。

哺乳類においての主な役割は、腸刷子縁膜上での食物中のタンパク質の分解であるが、多くの組織での発現が報告されている。アンギオテンシン III やブラジキニンのような血管作用性ペプチドの不活性化や生成、また脳

においてエンケファリンやノチセプチンといった神経ペプチドのプロセッシング、またサイトカインや免疫活性ペプチドのプロセッシングにも関与している。ペプチダーゼ活性と別に APN は骨髓細胞に発現する CD13 抗原と同定されており、ヒト、ネコ科、イヌ科、ブタなどでコロナウィルスのレセプターとして働く。このコロナウィルスには、風邪の原因ウイルスである HCoV-229E や HCoV-OC43 が知られている。またカイコにおいては、*Bacillus thuringiensis* の Cry1Ac toxin のレセプターとして知られる。哺乳類由来 APN は糖タンパク質であり、N 末端を膜

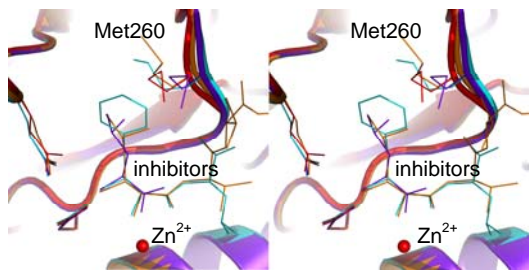


大腸菌 APN の結晶構造

にアンカーリングした II 型の膜結合酵素である。一方、微生物由来 APN は細胞質酵素であり、大腸菌においてペプチド分解を担う最も主要な酵素として知られる。

ヒト APN と大腸菌 APN は一次構造に 13.6% の相同性を持つ。両酵素とも幅広い基質に対して活性を示すが、N 末端アミノ酸残基の好みに違いが見られる。合成基質を用いた速度論的研究からヒト APN は、N 末端が Ala、Met、Lys である基質を順に好む。大腸菌 APN では Arg-β-ナフチルアミド(-βNA)、Lys-βNA、Ala-βNA を順に好み、酸性残基を除いた基質に活性を示した。また Ala-βNA に比べてその活性は低いものの Pro-βNA に対して活性を示すことを明らかにした。

一般に、Pro はその特異的なコンホメーションからプロテアーゼの作用を受けにくく、Pro を含むペプチドの分解には Pro 特異性ペプチダーゼが必要である。我々は、大腸菌 APN がどのように Pro 残基を含む多様な残基を認識し、加水分解するのか、その反応機構および基質認識機構の解明を目指して X 線結晶学的研究を行ってきた。その結果、リガンドフリー型および阻害剤であるベスタチン複合体型の結晶化に成功し、それぞれ 1.50 Å、1.60 Å 分解能で結晶構造を明らかにした<sup>3,4</sup>。さらに阻害剤アマスタチン、産物阻害剤である L-ロイシンとの複合体構造を 1.65 Å、1.55 Å 分解能で明らかにした。大腸菌 APN は N 末端 β-ドメイン(青)、触媒ドメイン(シアン)、ミドル β-ドメイン(緑)、C 末端 α-ドメイン(ピンク)の 4 つのドメインで構成されていた。活性部位は触媒ドメイン上のクレバスに形成されてい



活性部位構造の重ね合わせ(ステレオ図)

る。このクレバスの一端を N 末端 β-ドメイン、もう一端と上部を C 末端 α-ドメインが覆うことによって、タンパク質内部に非常に大きな空間が形成されていた。すなわち、APN の活性部位はタンパク質内部に存在する。C 末端 α-ドメインは、その中心に直径約 8 Å の穴を有する。ここがタンパク質内部の空間の出入り口であり、基質はここを通過して活性部位へ運ばれると考えられる。

## 2. 研究の目的

2 つのアプローチから APN の基質認識機構の解明を目指す。1 つは、ヒト APN の立体構造の解明である。ヒト APN の発現系を確立し、合成基質を用いた反応速度論的な解析と立体構造解析を行う。

もう 1 つは大腸菌由来 APN についての研究である。我々は、大腸菌由来 APN の結晶構造を初めて決定し、本酵素の幅広い基質特異性が Met260 残基のコンホメーション変化に由来すると推定した。特に、大腸菌酵素の Pro に対する反応性は、この残基の影響であると考えられる。これを証明するため、Met260 に変異を導入した酵素遺伝子を用いて LA-PCR 法あるいは Megaprimer-PCR 法を用いて作製する。まず哺乳類酵素にみられる Met260Ala 変異体酵素を作製する。すでに確立している大腸菌の系を用いて変異体酵素を発見、精製する。精製酵素の速度論的パラメータは、アミノ酸-βNA 基質を用いた測定から算出し、野生型酵素と比較検討を行う。また Ala 以外では、Tyr、Phe、Trp のようなバルキーな残基の導入や Leu、Ile、Val といった分岐鎖アミノ酸への変異の影響を検討する。

大腸菌酵素は、N 末端が Arg、Lys である基質に対して高い活性を示す。これは Met260 の働きとともに、活性部位 S1 ポケット上部の Asn373 と Gln821 が基質の側鎖アミノ基と水素結合できるためであると推定した。これら 2 残基に変異を導入し、速度論的パラメータを算出し、Arg、Lys に対する活性の変化を検討する。

生成物である L-Leu との複合体構造決定に成功し、そのカルボキシル基酸素の一方が亜鉛と他方が Tyr381 と相互作用することを明らかにした。反応中間体あるいは反応中間体類似物の構造決定は、反応機構の解明に重要であると考えられる。反応中間体モデルとなる基質類似物との構造解析を目指す。また、活性部位に存在する Tyr381 は、開裂するペプチド結合の基質カルボニル基と水素結合を形成し、四面体中間体の負電荷を共役により安定化する触媒活性に重要な残基と考えられる。この Tyr381 を Phe に置換し、反応中間体類似物との複合体結晶を作製、立体構造の解明を目指す。

Thompsonらは、*Saccharomyces cerevisiae* Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase(LTA4H)の研究から、ファミリーM1によく保存されたTyr244が触媒活性に重要であり、大きなコンホメーション変化を通じてこれに関与すると提唱している。しかしながら、ヒトLTA4Hと大腸菌APNの立体構造から相当する残基は活性部位近くに存在するが、活性中心である亜鉛イオンから7-8Åと非常に遠い。一方、ヒトLTA4HのTyr200はAsn317と水1分子を介して、亜鉛に配位するGlu318と水素結合ネットワークを形成している。大腸菌APNでは、Asn317に相当するLys319の側鎖アミノ基がこの水分子の位置にあり、亜鉛に配位したGlu320との水素結合が形成されている。しかしながらTyr224の相当残基であるTyr185との水素結合は存在しない。このTyr185あるいはLys319の役割は興味深い。これら変異体について、速度論と立体構造から反応機構への寄与について検討する。

### 3. 研究の方法

#### ①ヒトAPNの大量発現系の構築

ヒトAPN遺伝子の配列情報を元にクローニングした。クローニングした遺伝子をpPICZプラスミド、pPICZαプラスミドに組み込み発現ベクターを構築し、酵母*Pichia pastoris*を用いて大量発現系の構築を行った。

#### ②大腸菌由来の変異型APN遺伝子の作製

LA-PCR法を用いた部位特異的変異導入によって変異型遺伝子を作製した。M260A、Y318F、K319N、Y185F変異型遺伝子の作製に成功し、野生型酵素の発現系で用いたpUC19プラスミドに組み込み発現ベクターを構築した。これらを用いてAPN欠損株である大腸菌KT83株を形質転換し、大量発現系の構築を行った。

#### ③活性測定

野生型酵素とM260A変異型酵素についてアミノ酸-βNA基質を用いた活性測定を行った。酵素活性は、単位時間あたりのβNA算出量をFast Garnet GBCとのカップリングによって生じる550nmの吸収から算出した。CysとGlnを除く18種類のアミノ酸-βNAについて活性測定を行い、これらの速度論的パラメータを算出した。

#### ④結晶化とX線回折データ収集

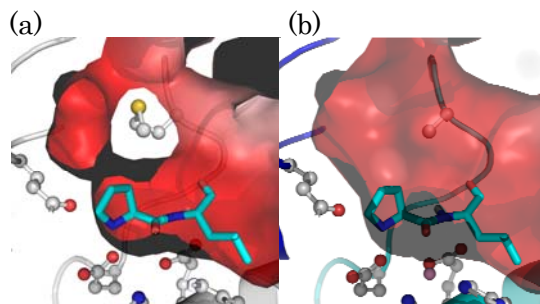
結晶化は硫酸アンモニウムを沈殿剤として用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。M260A変異型酵素の結晶化は野生型酵素と同条件で成功し、この結晶を阻害剤やアミノ酸を含む沈殿剤溶液へソーキングすることで複合体結晶を作製した。結晶のX線回折データ測定は、Photon Factoryのシンクロトロン放射光を用いて行い、M260A変異型酵素、M260A-Arg複合体、M260A-Lys複合体の結晶

構造を明らかにした。

### 4. 研究成果

酵母を用いたヒトAPNの大量発現系の構築をおこなってきたが、現在のところ、系の確立には至っていない。引き続き、条件検討を行う。大腸菌APNについては、目的としていた変異体のうち4種類の変異型遺伝子の構築に成功した。しかしながら、APN欠損株と野生型酵素と同じプラスミドを用いた発現系では、M260A変異型酵素の大量発現系の構築に成功したものの、他の3種の酵素はインクルージョンボディとして不溶化し、発現酵素を得られていない。現在、異なるプラスミドを使った発現系の条件検討を行っている。

本酵素の幅広い基質特異性に関与すると推定したMet260をAlaへと置換したM260A変異型酵素の作製に成功し、この速度論的研究を行った。アミノ酸-βNA基質を用いた活性測定から、M260A変異型酵素は、N末端がArg, Ala, Leu, Lysである基質を順に好むことが判明した。野生型では、Arg, Lys, Ala, Leuの順であり、M260A変異体はArgに対する高い活性を保持していたものの、Lysに対して $k_{cat}/K_M$ 値で野生型の13.2%へ低下していた。またM260A変異体は野生型酵素に特徴的であったPro基質に対する活性が消失した。M260A変異体のX線結晶構造解析から、Met260のAlaへの置換を除いて、変異体の活性部位構造は野生型APNと違いがほとんど見られなかった。Met260は活性部位のN末端側鎖結合ポケットに存在する。このMet260側鎖のコンホメーション変化によって、N末端側鎖結合ポケットの大きさを変化させ、多様な基質を認識することが判明した。またM260A変異体酵素-Arg複合体の結晶化に成功し、その結晶構造を明らかにすることに成功した。Arg側鎖は基質のN末端を認識するGlu121の主鎖カルボニル基およびAsn373の側鎖アミド基と水素結合を形成していた。ヒトAPNもArg基質に対して高い活性を示す。特にGlu121カルボニル基によるArg



活性部位へのPro-Leu結合(推定モデル図)

(a) 野生型酵素 (b) M260A変異型酵素

側鎖の認識は、APNに共通した機構であると推定される。

M260A変異体はArgに対する高い活性を保持していたものの、Lysに対しては $k_{cat}/K_M$ 値で野生型の13.2%に低下していた。本研究で、M260A変異体-Lys複合体の構造を明らかにした。Lysの側鎖アミノ基はArgと同様にGlu121の主鎖カルボニル基およびAsn373の側鎖アミド基酸素と水素結合を形成していた。このM260A変異体のLys基質に対する活性の低下は、速度論解析とX線結晶構造解析から、Metの疎水性側鎖がポケットから除去されたことによって、Lysの活性部位への親和性が強まった結果であると推定された。我々は、Met260側鎖のコンホメーション変化によってN末端側鎖結合ポケットの大きさを変化させ、本酵素が多様な基質を認識することを明らかにした。さらにLysなどの親水性アミノ酸生産物を活性部位から遊離させやすくする役割を担うと推定した。

#### 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 0件)

[学会発表] (計 4件)

- ① 小野原侑子 「大腸菌アミノペプチダーゼNの基質認識機構におけるMet260残基の役割」 第14回日本生物工学会九州支部長崎大会 2007/12/1 長崎大学
- ② 中嶋義隆 「M260A変異型アミノペプチダーゼNの結晶構造とその幅広い基質特異性におけるMet260の機能」 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会合同大会 2007/12/11 パシフィコ横浜
- ③ 中嶋義隆 「大腸菌アミノペプチダーゼNの基質認識機構」 日本薬学会第128年会 2008/3/26 パシフィコ横浜
- ④ 小野原侑子 「幅広い基質特異性を示すアミノペプチダーゼNの基質認識機構」 日本農芸化学会 2008年西日本支部大会 2008/9/20 長崎大学

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80372770

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者