

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580120

研究課題名（和文） D型アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼの構造・機能に関する先駆的研究

研究課題名（英文） structure and function of D-aspartic acid-specific endopeptidase

研究代表者

蕪澤 悟 (NIRASAWA SATORU)

独立行政法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：10343823

研究成果の概要（和文）：高橋らは世界で初めて微生物由来 D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ (Paenidase) を単離した (*J. Biochem.* 2006)。本研究では、Paenidase 前駆体は 322 アミノ酸残基の成熟領域及び 197 残基の N 末端プロ配列からなること明らかにしたとともに、Paenidase のアミノ酸変異体を作製し Paenidase の活性部位を推定した。また、Paenidase に対する阻害剤を発見するとともに、Paenidase の結晶化に成功した。

研究成果の概要（英文）：Paenidase is the first microorganism-derived D-aspartyl endopeptidase (Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* 2006). In this study, we revealed that the paenidase precursor was consisted of 322 amino acid residues of the mature region and 197 amino acid residues of the N-terminal extension peptide. Moreover, several mutants for the putative active site residues of the paenidase were constructed, whereas they showed no peptidase activity. These results indicate that these residues of the paenidase are essential for the enzyme activity. We also discovered novel paenidase-inhibitors and crystallized paenidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用生物化学

キーワード：D型アミノ酸、酵素、細菌、ペニシリン結合タンパク質、ゲノム、老化、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

これまで、一部の細菌の細胞壁に D 型アミノ酸の存在することが知られてきた。近年の分析手法の進歩により、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在が見出されている。さらに、これらの D 型アミノ酸が様々な病態と

関連することが示唆されており、それらの中でも、特に D-アスパラギン酸が注目されている。例えば、アミロイド・タンパク質や tau タンパク質では、アスパラギン酸残基の「D 型変異」がタンパク質の凝集を引き起こすことが示唆されている (T. Tomiyama *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**, 10205, 1994; A. Kenessey

et al., *Brain Res.* **675**, 183, 1995)。また、水晶体タンパク質（クリスタリン）では、特定部位のアスパラギン酸残基が D 型変異することにより、タンパク質全体が変性に導かれることが示唆されている (N. Fujii *et al.*, *J. Biochem.* **116**, 663, 1994)。さらに、脳や皮膚の老化した組織に存在するタンパク質のなかに D-アスパラギン酸残基を含むものが見いだされている (E.H. Man *et al.*, *Science* **220**, 1407, 1983; J.T. Powell *et al.*, *Atherosclerosis* **97**, 201, 1992)。一方、これまで D 型アミノ酸を特異的に認識するペプチダーゼの報告はほとんどなされておらず、とりわけ本研究の微生物由来 D-アスパラギン酸特異的ペプチダーゼは世界で唯一の例である。

2. 研究の目的

共同研究者である高橋らは、新規合成基質 Suc-[D-Asp]-pNA を用いて D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼのスクリーニングを行い、酵素生産菌 (Paenibacillus sp. B38 株) を分離するとともに、産生する酵素を Paenidase と命名し、その性質を検討した (S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197, 2006)。そこで、本研究においては、Paenidase 遺伝子のクローニング、発現と部位特異的変異体の解析を行い、Paenidase の特性を明らかにするとともに、Paenidase の結晶化および立体構造解析を行い、新規酵素 Paenidase の酵素化学的および構造生物学的諸性質の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Paenidase 遺伝子のクローニング

Paenidase の精製方法はすでに確立しているため (S. Takahashi *et al.*, 2006)、Paenidase を大量に精製し、PCR 用縮重プライマーを合成するために部分アミノ酸配列を決定する。つぎに、得られた部分アミノ酸配列をもとに PCR 法により目的クローンを取得し、部分塩基配列を決定する。つづいて、TAIL-PCR 法により全塩基配列を決定するとともに、これより、Paenidase の全アミノ酸配列を演繹する。これまでに報告されている N 末端アミノ酸配列 20 残基からは、相同性を持つタンパク質は得られていない。そこで、Paenidase の全アミノ酸配列をもとに、相同性解析、立体構造予測、活性部位予測等の各種バイオインフォマティクスの手法により、本酵素の新規性を評価する。

(2) 大腸菌での発現系の構築

取得した Paenidase 遺伝子を pET ベクター (Novogen 社) 等の大腸菌用高発現ベクターにクローニングし、大腸菌を用いた Paenidase の大量生産系を構築する。発現は、Paenidase

活性測定法及びゲル電気泳動法により評価する。

(3) 部位特異的変異体の解析

これまでの研究においても、Paenidase の活性中心残基に関する知見は得られていない。そこで、まず、一次構造解析と相同性解析の結果を総合的に判断し、活性中心残基を予測する。つぎに、予測されたアミノ酸残基をコードする Paenidase 遺伝子の塩基配列をインバーサ PCR 法により改変し、各種アミノ酸変異体遺伝子を構築する。これらが大腸菌において発現し、得られた変異酵素の活性を解析するとともに、CD および蛍光スペクトル法等により立体構造の変化を分析する。本解析により Paenidase の構造特性が明らかになるとともに、活性中心残基に関する基礎的データが取得され、Paenidase の構造機能相関解析に大きな足がかりを与えることとなる。

(4) 種々の基質、阻害剤に対する Paenidase の特性解析

老化や各種病態に関連して生成することが知られている D-アスパラギン酸含有ペプチドを合成し、これらを基質として Paenidase の活性を測定する。分析は高速液体クロマトグラフィ法、キャピラリー電気泳動法により行う。一方、相同性解析等により得られた関連酵素について、それらの基質および阻害剤となっている物質を Paenidase に与え、その反応、影響を分析する。

(5) 構造機能相関解析

Paenidase の結晶化を行い、X 線結晶構造解析法により Paenidase の立体構造を原子レベルで解明する。一方、相同性解析等により予想される酵素の阻害剤をスクリーニングし、Paenidase の活性中心との結合様式を解析する。これまでの研究において、Paenidase はペプチド鎖内の D-アスパラギン酸残基のみを特異的に認識することが明らかになっている。Paenidase の厳密な基質認識に関与していると考えられるアミノ酸残基を前項(3)の手法を用いて改変し、各種アミノ酸変異体を作製するとともに、その特性を解析する。

4. 研究成果

(1) Paenidase 遺伝子のクローニング

まず、天然 Paenidase I の配列分析を行い、68 番目までのアミノ酸配列を決定した。つぎに、各種 PCR により得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、これより Paenidase I の全アミノ酸配列を推定した。その結果、Paenidase 前駆体は 322 アミノ酸残基からなる成熟領域と、197 アミノ酸残基からなる N 末端延長ペプチドから構成されていることが明らかになった。配列をもとに成熟 Paenidase I の分子量を計

算すると34,980となり、天然Paenidase IのMALDI-TOF/MSの結果(34,748)と近い値を示した(Takahashi *et al.* 2006)。つぎに、アミノ酸配列の相同性を解析したところ、種々の β -lactamase、penicillin-binding protein、D-Ala-D-Ala carboxypeptidaseと35~39%の相同性があることが明らかになった。さらに、ペプチダーゼファミリーS12に分類されることが推定された。ペプチダーゼファミリーS12は、活性部位にSer、Lys、Tyr残基をもつセリンプロテアーゼの一群であり、Ser-Xaa-Thr-LysおよびTyr-Xaa-Asnのモチーフを持つ。これらのモチーフはPaenidase Iにおいても保存されていた。また、S12には *Streptomyces* R61 D-Ala-D-Ala carboxypeptidase、D-Stereospecific aminopeptidase DmpB、alkaline D-peptidaseなどのD型アミノ酸を認識するペプチダーゼが属しており、Paenidaseの構造機能相関を解明する上で大変興味深い。

(2) 大腸菌での発現系の構築

大腸菌においてPaenidase I、II、前駆体全長、及び種々のN末端延長ペプチドデリションクローンを発現させたところ、すべて活性型酵素が得られた。

(3) 部位特異的変異体の解析

アミノ酸配列の相同性より推定される活性部位Ser、Lys、Tyr残基を種々のアミノ酸に置換した変異体(S65A、S65C、K69A、K69I、Y149F)を作製した。得られた変異体はいずれも不活性型となったが、これらのCD及び蛍光スペクトルは野生型のスペクトルと一致し立体構造の変化は見られなかった。このことから、Paenidaseにおいてもこれらのアミノ酸残基がPaenidaseの活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 種々の基質、阻害剤に対する Paenidase の特性解析

得られた組換え酵素を用いてPaenidaseの基質特異性を解析したところ、suc-[D- α -Asp]-MCA、suc-[D- α -Asp]-pNAは加水分解したが、suc-[D- α -Glu]-pNA、suc-[D- α -Ala]-pNA、suc-[D- α -Leu]-pNA、Ac-[D- α -Phe]-pNAには作用しなかった。また、種々の合成 $\alpha\beta$ ペプチド(10残基)を用いて解析したところ、DAEFRH-[D- α -Asp]-SGYは加水分解したが、DAEFRH-[L- α -Asp]-SGY、DAEFRH-[L- β -Asp]-SGY、DAEFRH-[D- β -Asp]-SGYには作用しなかった。以上の結果から、PaenidaseはD- α -Aspのみを基質とする極めて特異的なエンドペプチダーゼであることが示唆された。つぎに、種々の抗生物質について、Paenidaseが阻害を受けるかどうか解析した。その結果、Ampicillin、Benzyl

penicillin、Carbenicillin、Cloxacillin、Oxacillin、Ticarcillineでは、10 mg/mlの濃度において残存活性10%程度の阻害が見られたが、Kanamycin、Streptomycinでは阻害されなかった。よって、Paenidaseはペニシリン系抗生物質によって比較的弱く阻害を受けることが明らかとなった。

(5) 構造機能相関解析

種々の条件でpaenidaseの結晶化を試みた結果、硫酸アンモニウムを緩衝液に用いる条件で結晶が得られた。X線回折法により得られた結晶を解析したところ、約3Åの解像度であった。つぎに、Paenidaseと阻害剤との共結晶を試みるため、新規阻害剤を合成した。現在、この阻害剤を用いた共結晶の条件検討を行っている。

活性部位近傍のHis残基を置換した変異体(H111A、H276A)を作製したところ、活性型が得られた。これにより、Paenidaseの反応機構が一般的なセリンプロテアーゼのそれとは異なることが示唆された。また、Paenidase阻害剤をスクリーニングしたところ、新規阻害剤を単離することに成功し、現在、構造解析を行っている。

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)

[学会発表](計7件)

①高橋 砂織、原核微生物由来D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ、平成23年度第11回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2012年1月31日、産総研つくばセンター共用講堂(茨城県つくば市)

②小笠原 正人、Protein isoasparatyl methyltransferase gene knock down induced human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition through endoplasmic reticulum stress、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(神戸市)

③葦澤 悟、原核微生物由来D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(Paenidase)遺伝子のゲノムライブラリーからの単離、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド(神戸市)

④葦澤 悟、原核微生物由来D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(Paenidase)遺伝子のゲノムライブラリーからの単離、及び生産菌の全ゲノムシーケンズ、第6回D-アミノ酸研究会学術講演会、2010年9月17日、富山国際会議場(富山市)

⑤葦澤 悟、原核微生物由来D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(Paenidase)の部位特異的変異法による特性解明、日本農芸化学

会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京大
学駒場キャンパス（東京都）

⑥ 萠澤 悟、Site-directed mutagenesis of
bacterial D-aspartyl endopeptidase
(paenidase)、第 32 回日本分子生物学会年会、
2009 年 12 月 10 日、パシフィコ横浜（横浜市）

⑦ 萠澤 悟、Primary Structure and
Functional Expression in Escherichia coli
of Novel D-Aspartyl Endopeptidase,
Paenidase, from Prokaryote、International
Conference of D-Amino Acid Research
(IDAR2009)、2009 年 7 月 1 日、淡路夢舞台国
際会議場（兵庫県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萠澤 悟 (NIRASAWA SATORU)

独立行政法人国際農林水産業研究センタ
ー・生物資源・利用領域・主任研究員

研究者番号：10343823

(2) 研究分担者

高橋 砂織 (TAKAHASHI SAORI)

秋田県総合食品研究センター・食品加工研
究所・所長

研究者番号：10142184

(3) 連携研究者

()

研究者番号：