

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580178

研究課題名(和文)マトリプターゼ活性化機構の解明とそれを制御する食品成分の探索

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of matriptase activation and exploration of food components that control the activation.

研究代表者

都築 巧 (TSUZUKI, Satoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50283651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マトリプターゼは膜結合性セリンプロテアーゼのひとつである。本研究ではマトリプターゼステムドメイン中の低密度リポタンパク質受容体ドメインリピートが本酵素前駆体の活性を増強する作用をもつこと、マトリプターゼ前駆体活性発現には2価のカチオンが必要とされることをみいだした。また、マトリプターゼ前駆体の活性化はそれら2分子の相互作用が必要とされるもの(トランスアクチベーション)であることを支持する証拠を得た。

研究成果の概要(英文)：Matriptase is a transmembrane serine protease. In this study, we found that low-density lipoprotein receptor class A domain repeat in the stem domain of matriptase acts to enhance its zymogen activity and that some kinds of divalent cations are required for the expression of zymogen activity. In addition, we obtained evidence supporting that the activation of matriptase zymogen occurs by a mechanism requiring the interaction of the two molecules (transactivation).

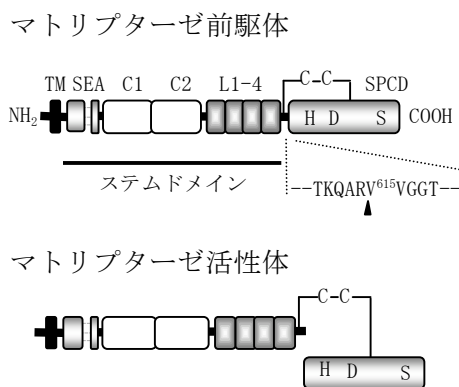
研究分野：農学

キーワード：酵素 食品 遺伝子 バイオテクノロジー 栄養学

### 1. 研究開始当初の背景

マトリプターゼはアミノ酸残基 855 からなる膜結合性セリンプロテアーゼであり(図1),高等動物の生体内において上皮完全性の維持に重要な役割を果たしている. 本酵素は一本鎖前駆体のアルギニン 614 のカルボキシル末端で限定分解を受けジスルフィド結合を介して結合した二本鎖の活性型へと変換される. 興味深いことにマトリプターゼ前駆体はプロテアーゼ活性を示し自己触媒的に活性型となることが知られている. その活性化機構の詳細は不明であるが, おそらく2分子の前駆体が互いに活性化しあうトランスアクチベーションによるものと推定されている.

マトリプターゼの細胞外領域はカルボキシル末端に位置する触媒ドメインとそのアミノ末端側のステムドメインからなる(図1). ステムドメインはアミノ末端側から sea urchin sperm protein-enteropeptidase-agrin ドメイン (以下 SEA ドメイン), 2つの complement proteases C1r/C1s-urchin embryonic growth factor-hone morphogenetic protein(以下 CUB ドメイン), 4つの low-density lipoprotein receptor class A ドメイン(以下 LDLRA ドメイン)で



TM: Transmembrane domain  
 L1-4: LDL receptor class A domain repeats  
 C1 and C2: CUB domains  
 SEA: SEA domain  
 SPCD: Serine protease catalytic domain  
 H, D, S: Residues of catalytic triad

図1 マトリプターゼ前駆体、活性体のドメイン構造

構成されている(図1). 我々は本研究開始以前に SEA ドメインから触媒ドメインで構成された組換え型マトリプターゼと触媒ドメインのみからなるその前駆体活性を評価し前者は後者に比べ活性が 30 倍程度高いことがわかっていた (Inouye K, Yasumoto M, Tsuzuki S, Mochida S, Fushiki T. J. Biochem. 147, 485-492, 2010). すなわちマトリプターゼ前駆体活性発現にステムドメインが重要な働きを示していることが示唆されていた.

### 2. 研究の目的

本研究ではマトリプターゼ前駆体の活性発現機構,特に活性発現におけるステムドメインの意義,また前駆体活性に影響を及ぼす食品成分を探索することを目的とした.

### 3. 研究の方法

本研究で使用した9種類の組換え型マトリプターゼのドメイン構造を図2に示す. 組換え体の命名における C は CUB ドメイン, L は LDLRA ドメイン, SPCD は触媒ドメインを示す. すなわち CLS は CUB, LDLRA, 触媒ドメインから, LS は LDLRA, 触媒ドメインから構成され, S は触媒ドメインのみからなる組換え型マトリプターゼであることを示す. 組換え体名の肩字の WT は活性化切断部位, 活性中心のセリン残基が野生型マトリプターゼと同じであるもの, S805A は活性化切断部位は野生型と同じであるが, 活性中心のセリン残基がアラニン残基に置換されているもの, EK-A(enterokinase-activated の意味)は活性中心のセリン残基はそのまま活性化切断配列 TKQAR がエンテロペプチダーゼ切断配列の DDDDK に置換されているものである.

WT と S805A 型は COS-1 細胞に一過性発現させ活性化の程度を抗マトリプターゼ抗体を用いたウエスタンブロッティング解析により評価した(マトリプターゼ活性化におけるステムドメインの意義解明のための *in cellulo* 解析).

様式 C-19, F-19, Z-19 (共通)

EK-A 型は一本鎖として精製され、市販のエントロペプチダーゼで処理をすることにより人為的に活性型へと変換させることができる。一方、エントロペプチダーゼ処理をしない場合はモデルマトリプターゼ前駆体として使用できる。実際に SEA ドメインから触媒ドメインで構成された組換え型マトリプターゼと触媒ドメインのみからなるそれ(図2中 S-Mat<sup>EK-A</sup>)の前駆体活性を市販の合成基質 KTKQLR-MCA を使用して評価できることを報告してきている。今回は3種の EK-A 型組換え型マトリプターゼ(エントロペプチダーゼ処理なし)の活性を KTKQLA-MCA, 新たに合成した FTKQAR-MCA(この配列は野生型マトリプターゼの活性化切断部位のそれと一致), CLS-Mat<sup>S805A</sup> を基質として評価した。また, FTKQAR-MCA を基質としたアッセイ系において CLS-Mat<sup>EK-A</sup> の活性におよぼす2価のカチオンの影響について検討した。

4. 研究成果

CLS-, LS-, S-Mat<sup>WT</sup>, CLS-, LS-, S-Mat<sup>S805A</sup> の COS-1 細胞における一過性発現解析から (i) マトリプターゼのこの細胞における活性化には自身の活性中心のセリン残基が必要とされること, すなわち自己触媒的に活性化されること (ii) CUB ドメインリピートはマトリプターゼの活性化を抑制する方向に働くこと (これはマトリプターゼの阻害物質である hepatocyte growth factor activator inhibitor type I の活性を補助するからであると考えられた), (iii) LDLRA ドメインリピートはマトリプターゼの活性化を促進することが示された。

3 種類の精製 EK-A 型組換え型マトリプターゼ(エントロペプチダーゼ処理なし)の KTKQLR-MCA 基質切断活性の解析から, (i) CUB ドメインリピートは前駆体活性発現自体には影響しないこと (ii) LDLRA ドメインリピートが前駆体活性を増強させることが示された。なお, 本研究において最も強調されることは LDLRA ドメインリピートが前駆体活性発現に必須の働きをすることを明らかにしたことで

ある。新たに合成した FTKQAR-MCA を基質として用いた場合でも, 同等の結果が得られた。

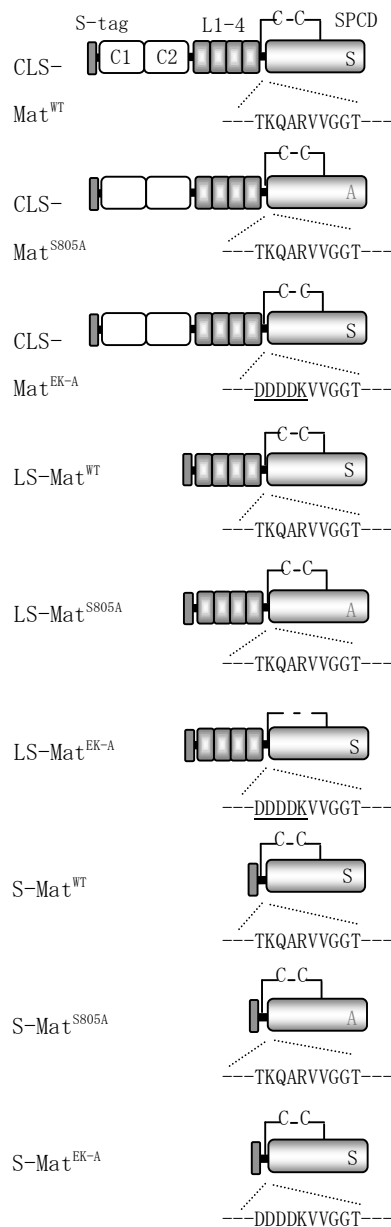


図2 本研究で使用した組換え型マトリプターゼのドメイン構造 S; セリン残基, A; アラニン残基, C; システイン残基

CLS-Mat<sup>S805A</sup> は活性中心のセリン残基がアラニン残基に置換されたものであり, プロテアーゼ活性を示さない。この組換え型マトリプターゼの活性化配列部位は野生型と同じ(---FTKQLRVVGG---)であるので EK-A 型マトリプターゼのモデル基質として使用できる。実際に 3 種類の精製 EK-A 型組換え型マトリプ

様式 C-19, F-19, Z-19 (共通)

ターゼ(エンテロペプチダーゼ処理なし)によって CLS-Mat<sup>S805A</sup> が活性化配列部位で切断されること、ペプチド基質を用いたときと同様に LDLRA ドメインリピートが切断活性を増強することが示された。またこの実験からマトリプターゼの活性化は2分子の前駆体が相互作用して活性化切断が起こるトランスアクチベーションによるものであることが支持された。

CLS-Mat<sup>EK-A</sup> の FTKQAR-MCA 切断活性は EDTA の存在下で著しく低下することが明らかになった。LDLRA ドメインにはカルシウムイオンを抱合するカルシウムケージという領域があり、この領域へのイオンの結合によって構造が安定化する。キレート処理によっての LDLRA ドメインの構造が不安定化し、CLS-Mat<sup>EK-A</sup> の活性が低下したと考えられる。実際にマトリプターゼの LDLRA ドメインにカルシウムイオンが結合しているかどうか、さらなる検討が必要である。

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2件)

① Mochida S, Tsuzuki S, Inouye K, Fushiki T, A recombinant matriptase causes an increase in caspase-3 activity in a small-intestinal epithelial IEC-6 line cultured on fibronectin-coated plates. Cytotechnology, 査読有, Vol. 66, 2014, pp. 357-363,

DOI: 10.1007/s10616-013-9582-2

② Inouye K, Tomoishi M, Yasumoto M, Miyake Y, Kojima K, Tsuzuki S, Fushiki T, Role of CUB and LDL receptor class A domain repeats of a transmembrane serine protease matriptase in its zymogen activation. J. Biochem. 査読有, Vol. 153, No. 1, 2013, pp. 51-61,

DOI: 10.1093/jb/mvs118

[学会発表] (計2件)

①友石満里絵, 都築巧, 安元誠, 伏木亨, 児島憲二 (発表者), 井上國世, マトリプターゼ LDL 受容体クラス A ドメインの意義解明, 第 59 回に生化学会近畿支部例会, 2012 年 5 月 19 日, 京都大学 宇治おうばくプラザ 京都府宇治市

②友石満里絵 (発表者), 都築巧, 安元誠, 伏木亨, 児島憲二, 井上國世 マトリプターゼ前駆体の酵素活性に対する LDL 受容体クラス A ドメインの役割解明 2012 年度 日本農芸化学会 関西支部大会(第 476 回講演会) 2012 年 9 月 22 日, 京都学園大学, 京都府亀岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都築 巧(TSUZUKI, Satoshi)

研究者番号: 50283651

(2) 連携研究者

井上國世(INOUE, Kuniyo)

研究者番号: 10223249