

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2008～2009

課題番号：20790088

研究課題名 (和文)

ユニークな性状を持つ新規アミノペプチダーゼ Laeverin の生理機能の解明

研究課題名 (英文)

Elucidation of physiological role of Laeverin, a novel aminopeptidase.

研究代表者

丸山 正人 (MARUYAMA MASATO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00399445

研究成果の概要 (和文)：ヒト Laeverin のエキソペプチダーゼモチーフを構成する His-379 残基に着目し、本残基がユニークな Laeverin の酵素学的性状の発現においてどのような役割を担っているかを検討した。その結果、ヒト Laeverin の His-379 残基は基質特異性の発現や触媒作用に重要であり、さらに立体構造モデルより、本残基が触媒ポケット構造の維持に重要な役割を果たしている可能性を提示することができた。

研究成果の概要 (英文)：Here, we evaluated the roles of His<sup>379</sup>, comprising the exopeptidase motif, in the enzymatic properties of human Laeverin. Our results indicate that His<sup>379</sup> plays essential roles in its distinctive enzymatic properties and contributes to maintaining the appropriate structure of the catalytic cavity of the enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Laeverin, 絨毛外栄養膜細胞、エキソペプチダーゼモチーフ

## 1. 研究開始当初の背景

Laeverin は、新生児由来の絨毛外栄養膜細胞 (EVT) に特異的に発現する細胞表面抗原として、単離された新規タンパク質であり、その一次構造から M1 アミノペプチダーゼファミリーに分類される。当初、Laeverin が EVT の機能に密接に関連することが推察されたが、その機能は全く不明なままであった。研究代表者は、バキュロウ

イルス発現系を用いてヒトリコンビナント Laeverin を調製し、その酵素学的性状を解析した結果、Laeverin は新規のベスタチン感受性ロイシンアミノペプチダーゼであること、いくつかの生理活性ペプチドのアミノ末端から、塩基性及び芳香族アミノ酸残基を遊離することを見出し、本酵素がペプチドホルモンの代謝に関与していることを明らかにした。このような Laeverin の酵

素学的性状は、他の M1 アミノペプチダーゼと比べてユニークであるため、本酵素が胎盤において重要な役割を担っていると考えられた。また、Laeverin の基質となる Kisspeptin-10 (Kp-10) は、胎盤に豊富に存在し、細胞浸潤を抑制する作用を持つことが知られている。そのため、EVT 細胞膜上に存在する本酵素が、Kp-10 の濃度調節を介して EVT 浸潤を調節している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、Laeverin の触媒メカニズムの詳細を明らかにし、Laeverin の生理機能の推察、並びに Laeverin と関連する病態に対する新たな作用メカニズムを持つ創薬開発に向けた分子基盤を構築することが目的である。

## 3. 研究の方法

まず、His-379 残基を他の M1 アミノペプチダーゼやマウス Laeverin で見られるような Gly 残基へと置換した変異体 Laeverin (His379Gly) や環構造側鎖を持つ Phe への置換体 (His379 Phe)、正電荷を持つ Lys 置換体 (His379Lys)、疎水性アミノ酸 Leu 置換体 (His379Leu) をそれぞれバキュロウイルス発現系を用いて調製した。精製の効率を上げるために各組換え型酵素のカルボキシル末端に 6×His タグを付加した。バキュロウイルス感染 72 時間後の Sf-9 細胞培養上清 3L から Hydroxyapatite カラムおよび Ni<sup>2+</sup>-chelating-Toyopearl カラムを用いて精製を行った。

## 4. 研究成果

ヒト Laeverin の活性中心近傍の一次配列を他の M1 アミノペプチダーゼの相同配列と比較した。M1 ファミリー分子間では、エキソペプチダーゼモチーフ・GXMEN 配列がよく保存されている。しかし、ヒト Laeverin では、最初の Gly 残基がかさ高い側鎖をもつ His 残基へと置換されているというユニークな構造 (HAMEN) を有していた。次に、Laeverin の相同分子種間のエキソペプチダーゼモチーフの比較を行った。その結果、エキソペプチダーゼモチーフにおけるアミノ酸置換はヒト以外のいくつかの哺乳類 Laeverin でも認められるが、マウス及びラットでは GAMEN のままであった。そこで、ヒト Laeverin のエキソペプチダーゼモチーフを構成する His-379 残基に着目し、酵素学的性状における本残基の役割を部位特異的変異導入法により解析した。

(1) ヒト Laeverin 点変異体の人工蛍光基質に対する酵素活性

人工蛍光基質を用いて、野生型及び 4 種類の点変異体 (His379Gly、His379Phe、His379Lys、His379Leu) Laeverin の速度論的解析を行った (Table 1)。以前の解析から、野生型 Laeverin の触媒効率 (kcat/Km) は Leu-MCA を用いたときが最も高く、次いで Arg、

Table 1

Substrate	LVRN/APQ	$K_m^a$	$k_{cat}^a$	$k_{cat}/K_m \times 10^{3a}$
		$\mu M$	$s^{-1}$	$\mu M^{-1}s^{-1}$
Leu-MCA	Wild type	98.6 ± 19	37.7 ± 4.8	385 ± 26
	H379G	44.5 ± 15	11.3 ± 3.0	258 ± 19
	H379F	119 ± 21	49.8 ± 6.4	419 ± 24
	H379K	109 ± 9.6	33.7 ± 2.7	308 ± 3.2
	H379L	28.1 ± 2.7	4.85 ± 0.22	173 ± 11
Met-MCA	Wild type	65.0 ± 5.0	10.9 ± 1.0	168 ± 4.3
	H379G	26.4 ± 6.3	3.59 ± 0.66	137 ± 10
	H379F	62.8 ± 19	18.1 ± 3.9	292 ± 22
	H379K	61.5 ± 1.9	11.6 ± 2.7	189 ± 5.5
	H379L	9.26 ± 0.93	1.70 ± 0.066	184 ± 11
Arg-MCA	Wild type	21.0 ± 5.1	4.48 ± 0.49	219 ± 33
	H379G	11.1 ± 1.5	3.11 ± 0.23	282 ± 20
	H379F	21.5 ± 1.1	5.74 ± 0.17	267 ± 5.9
	H379K	18.9 ± 2.4	1.62 ± 0.12	84.9 ± 4.5
	H379L	9.85 ± 1.2	2.07 ± 0.17	210 ± 8.5
Lys-MCA	Wild type	31.2 ± 1.6	4.83 ± 0.19	155 ± 2.0
	H379G	15.5 ± 5.4	4.10 ± 1.2	269 ± 22
	H379F	31.3 ± 8.0	6.68 ± 1.5	215 ± 9.5
	H379K	27.5 ± 1.2	4.31 ± 0.14	157 ± 2.7
	H379L	5.82 ± 0.23	1.82 ± 0.044	313 ± 7.0
Phe-MCA	Wild type	43.2 ± 4.5	2.19 ± 0.18	50.9 ± 1.1
	H379G	26.1 ± 2.7	0.862 ± 0.062	33.2 ± 1.2
	H379F	44.7 ± 7.4	3.17 ± 0.56	71.0 ± 5.5
	H379K	44.2 ± 2.4	1.03 ± 0.11	23.1 ± 1.5
	H379L	18.2 ± 4.4	1.74 ± 0.22	97.7 ± 10

<sup>a</sup> Values are the mean ± S.D. (n = 3).

Met、Lys、そして Phe-MCA の順に低くなることが明らかにされている。His379Gly 変異体 Laeverin の中性アミノ酸残基 (Leu、Met 及び Phe-MCA) に対する親和性 (Km 値) は野生型 Laeverin の 41-60% の値であったが、代謝回転分子数 (kcat 値) は野生型 Laeverin の 30-39% であった。その結果として kcat/Km は野生型 Laeverin の値に比べ 66-82% に低下した。また、His379Gly 変異体 Laeverin の塩基性アミノ酸残基 (Arg、Lys-MCA) に対する Km 値は野生型 Laeverin の値の 50% 程度を示し、kcat 値は野生型 Laeverin と同程度であった。その結果、kcat/Km は野生型 Laeverin の同値に比べてそれぞれ 129、174% であった。

一方、His379Phe 変異体 Laeverin では、Table 1 で示すように検討した全ての基質に対する Km 値は野生型 Laeverin の値とほぼ一致した。しかしながら、いずれの基質の場合でも kcat 値は野生型 Laeverin よりわずかに高い傾向が認められたため、kcat/Km は野生型 Laeverin より若干高値 (109-174%) であった。His379Lys 変異体 Laeverin では Arg 及び Phe-MCA 以外の基質に対する各値は野生型 Laeverin の値と同程度であった。一方で、His379Leu 変異体 Laeverin の Km 及び kcat 値は His379Gly 変異体 Laeverin とほぼ同じ傾向を示した。

以上の結果より、His-379 残基の Gly もしくは Leu 残基への置換は基質特異性に大きな影響を及ぼすが、Phe もしくは Lys 残基への置換では基質特異性の変化は一部を除き、ほとんど変化しないことが明らかとなった。

(2) ヒト Laeverin 点変異体のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性

Table 2

LVRN/APQ	Bestatin <sup>a</sup>		Amastatin <sup>a</sup>	
	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
Wild type	3.81 ± 0.98		97.6 ± 10	
H379G	12.2 ± 1.2		17.3 ± 5.4	
H379F	4.19 ± 0.12		42.6 ± 12	
H379K	22.5 ± 6.1		92.1 ± 17	
H379L	8.37 ± 1.1		105 ± 13	

<sup>a</sup> Values are the mean ± S.D. (n = 3).

Laeverin は、ほとんどの M1 アミノペプチダーゼに対して弱い競合阻害剤として作用するベスタチンに高い感受性を示す。そこで、各変異体 Laeverin のアミノペプチダーゼ阻害剤に対する感受性を野生型 Laeverin と比較検討した (Table 2)。その結果、ベスタチンは野生型及び His379Phe 変異体 Laeverin の酵素活性を効果的に阻害したが、His379Gly、His379Lys 及び His379Leu 変異体 Laeverin のベスタチンに対する感受性は野生型 Laeverin より低かった。これらの結果より、本酵素の持つ特徴であるベスタチンへの高感受性の発揮には His-379 残基の芳香環が重要であることが示された。対照的に、アマスタチンへの感受性においては、His379Gly 変異体 Laeverin の方が、野生型 Laeverin よりも高い感受性を示した。以上の結果から、His-379 残基が、Laeverin の特徴的な阻害剤プロファイルに深く関与していることが示された。

(3) 天然ペプチドのヒト Laeverin 点変異体に対する阻害効果

これまでに、Laeverin のアミノペプチダーゼ活性は、ヒトの胎盤中に存在するペプチドホルモンである Substance P、Bradykinin、Ang IV によって競合的に阻害されることが明らかになっている。そこで次に、上記のヒト天然ペプチドの野生型及び His379Gly 変異体 Laeverin の酵素活性に対する阻害効果を比較した (Table 3)。Substance P は野生型及び His379Phe 変異体 Laeverin の Leu-MCA 水分解活性を競合的に阻害し、さらに His379Gly 変異体 Laeverin の酵素活性に対してはより効果的な阻害効果を示すことが明らかとなった。また、Substance P と同じアミノ末端配列 (Arg-Pro-) を持つ Bradykinin も、野生

Table 3

Enzyme	Substance P <sup>a</sup>	Bradykinin <sup>a</sup>	Angiotensin IV <sup>a</sup>
	(RPIKPKQQFFGLM-NH <sub>2</sub> )	(RPPGFSPFR)	(VIIHPP)
	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )
Wild type	1.83 ± 0.33	21.5 ± 1.1	8.92 ± 1.9
H379G	0.443 ± 0.052	13.3 ± 3.5	8.77 ± 1.9
H379F	1.52 ± 0.33	37.9 ± 6.4	8.15 ± 0.94

<sup>a</sup> Values are mean ± S.D. (n=3)

型及び His379Phe 変異体 Laeverin よりも His379Gly 変異体 Laeverin のアミノペプチダーゼ活性を強く競合阻害した。一方、アミノ末端に Val 残基を有する Ang IV に対する感受性は全ての酵素において同程度であり、点変異導入による影響は認められなかった。以上の結果から、His379Gly 変異体 Laeverin においては、アミノ末端に Arg 残基を有する上記2つのペプチドホルモンに対する親和性が上昇していることが明らかとなり、His-379 残基が Laeverin の基質ポケットの形成に関与している可能性が考えられた。

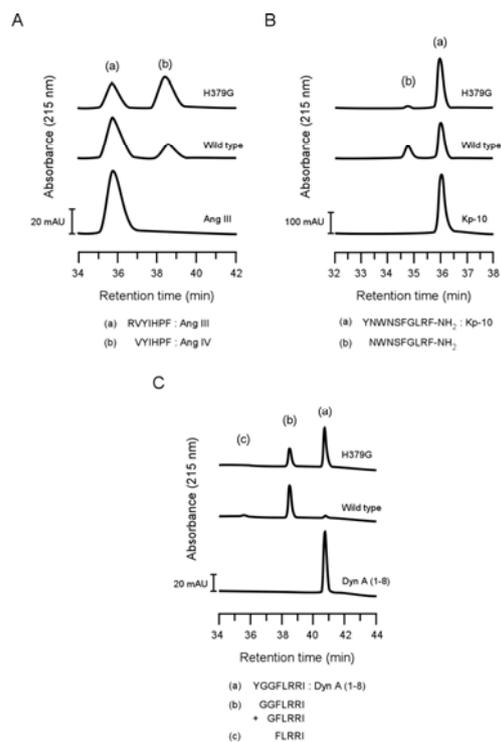
(4) ヒト Laeverin 点変異体の天然ペプチドに対する分解活性

これまでに、Laeverin は血圧調節ホルモンである Ang III、胎盤性ホルモンである Kisspeptin-10、脳内ホルモンである Dynorphin A (1-8) などを基質とすることが明らかとなっている。そこで、野生型および各変異体 Laeverin の Ang III、Kisspeptin-10 及び Dynorphin A (1-8) に対する分解活性を比較した。まず、アミノ末端に Arg 残基を有する Ang III の分解について解析をした。その結果、野生型 Laeverin と Ang III を 37°C で 60 分間、反応させた場合、約 30% の Ang III がアミノ末端から Arg 残基を遊離し、Ang IV へと変換された (Fig. 1A)。一方、同条件下において His379Gly 変異体 Laeverin は約 60% の Ang III を Ang IV へと変換し、その変換能は野生型 Laeverin と比べて約 2 倍高いことが示された (Fig. 1A)。また、速度論的解析の結果、His379Gly 変異体 Laeverin では野生型及び His379Phe 変異体 Laeverin と比べて基質に対する Km 値が高くなるため、 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  が高くなることが明らかとなった (Table 4)。これらの結果から、His379Gly 変異体 Laeverin では、天然ペプチドのアミノ末端からの塩基性アミノ酸残基遊離活性が野生型 Laeverin より高くなることが示された。

続いて、アミノ末端に Tyr 残基を有する Kisspeptin-10 の分解活性について検討した。その結果、野生型 Laeverin は、反応 60 分後には約 45% の Kisspeptin-10 のアミノ末端の Tyr 残基を遊離した (Fig. 1B)。一方、同条件下において、His379Gly 変異体 Laeverin は約 15% の Tyr 残基を遊離するに留まり、野生型 Laeverin と比較すると、Kisspeptin-10 の分解能は約 1/3 程度に低下していた (Fig. 1B)。この傾向は Phe-MCA 水分解活性と同様であった。

さらに、アミノ末端に Tyr 残基を有する Dynorphin A (1-8) の分解活性を検討した結果、野生型 Laeverin では、反応 30 分後に約 90% の Dynorphin A (1-8) のアミノ末端から Tyr 残基が遊離され、さらに 6mer まで分解さ

Fig. 1



れた産物も認められた (Fig. 1C)。一方、同一条件下で His379Gly 変異体 Laeverin は、約 30% のアミノ末端の Tyr 残基を遊離するに留まり、野生型 Laeverin と比較すると Dynorphin A (1-8) の分解能は約 1/3 にまで低下した (Fig. 1C)。さらに速度論的解析の結果、Phe-MCA の場合と同様に、His379Gly 変異体 Laeverin では、Kisspeptin-10 及び Dynorphin A (1-8) に対する  $K_m$  値が高くなり、 $k_{cat}$  値が顕著に低下したことで、 $k_{cat}/K_m$  は野生型 Laeverin よりも低下していた (Table 4)。一方、His379Phe 変異体 Laeverin のこれら 2 つのペプチドに対する  $K_m$  及び  $k_{cat}$  値は若干低値であった (Table 4)。以上の結果から、His379Gly 変異体 Laeverin では、天然ペプチドの Tyr 残基遊離活性が野生型 Laeverin よりも低くなることが示された。これより、Laeverin の His-379 残基は、アミノ末端に Tyr 残基を有する基質ペプチドとの感受性及び分解活性を決定している重要な残基であることが示唆された。

Endokinin C はヒト胎盤に発現している新規ペプチドホルモンであり、Laeverin の基質となることが報告されている。そこで、野生型および各変異体 Laeverin の Endokinin C に対する分解活性についても比較検討した。Endokinin C はアミノ末端に Lys 残基を有するため、Lys-MCA を用いた解析からは His379Gly 変異体 Laeverin では分解活性の上昇が予測されたものの、実際には、His379Gly 変異体 Laeverin の Endokinin C 分解活性は、野生型 Laeverin に比べて逆に低下していた

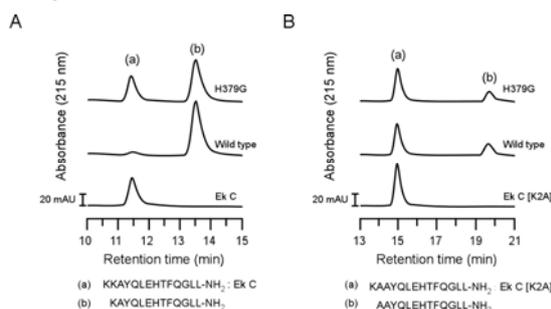
(Fig. 2)。さらに速度論的解析の結果から、Endokinin C に対する His379Gly 変異体及び His379Phe 変異体 Laeverin の  $K_m$  値は、野生型 Laeverin のそれに比べて高かったが、一方、 $k_{cat}$  値については His379Gly 変異体 Laeverin では著しく低かった。その結果、His379Gly 変異体 Laeverin の  $k_{cat}/K_m$  は野生型 Laeverin に比べて低値であることが明らかとなった (Table 4)。

Table 4

Substrate (sequence)	LVRN/APQ	$K_m^a$	$k_{cat}^a$	$k_{cat}/K_m$
		$\mu M$	$s^{-1}$	$\mu M^{-1} s^{-1}$
Angiotensin III (RVYIHPF)	Wild type	13.4 ± 2.1	1.24 ± 0.11	92.9 ± 7.2
	H379G	4.30 ± 1.1	1.84 ± 0.22	440 ± 69
	H379F	16.6 ± 2.4	1.86 ± 0.10	113 ± 10
Kisspeptin-10 (YNWNFGLRF-NH <sub>2</sub> )	Wild type	32.1 ± 8.9	3.62 ± 0.92	113 ± 5.2
	H379G	10.8 ± 4.1	0.501 ± 0.10	48.6 ± 8.1
	H379F	16.7 ± 4.5	2.28 ± 0.45	138 ± 12
Dynorphin A-(1-8) (YGGFLRRI)	Wild type	65.6 ± 15	22.3 ± 4.6	340 ± 7.3
	H379G	5.96 ± 1.2	0.748 ± 0.049	128 ± 18
	H379F	11.3 ± 2.9	2.48 ± 0.55	219 ± 11
Endokinin C (KKAYQLEHTFQGLL-NH <sub>2</sub> )	Wild type	38.4 ± 3.1	6.25 ± 0.86	162 ± 9.6
	H379G	22.3 ± 7.7	1.75 ± 0.41	80.3 ± 9.4
	H379F	19.6 ± 1.3	3.25 ± 0.63	164 ± 20
Endokinin C K2A (KAAYQLEHTFQGLL-NH <sub>2</sub> )	Wild type	180 ± 25	10.8 ± 3.5	59.5 ± 14
	H379G	24.4 ± 6.8	1.11 ± 0.31	45.3 ± 2.2
	H379F	40.7 ± 3.8	2.58 ± 0.15	63.5 ± 2.2

<sup>a</sup> Values are the mean ± S.D. (n = 3).

Fig. 2



M1 ファミリーのひとつであるヒト LTA4H の X 線結晶構造から、Laeverin の His-379 残基に相当する Gly-268 残基が基質の P1' 残基と相互作用することが示されている。そこで、Endokinin C の 2 番目に位置する Lys 残基を Ala 残基に置換した Endokinin C [K2A] の分解活性を検討することで、P1' 残基の認識に His-379 残基が関与しているかどうかを検討した。その結果、野生型 Laeverin の Endokinin C [K2A] に対する分解活性は Endokinin C に比べて低下することが明らかとなった (Fig. 2)。また、His379Gly 変異体 Laeverin の Endokinin C [K2A] に対する分解活性も Endokinin C を基質とする場合に比べて低く、それは野生型 Laeverin の Endokinin C [K2A] に対する分解能と同程度であった。速度論的解析の結果、野生型 Laeverin の Endokinin C [K2A] に対する  $K_m$  値に比べ Endokinin C に対する  $K_m$  値が高いことから、Endokinin C の P1' 位 Lys 残基の Ala 残基への置換により、野生型 Laeverin の  $k_{cat}/K_m$  が低下していることが明らかとなった

(Table 4)。これらの結果から、His-379 残基が基質の P1 残基を認識するだけでなく、基質の P1' 残基の認識や基質ポケットの構造維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### (5) Laeverin の立体構造モデルの構築

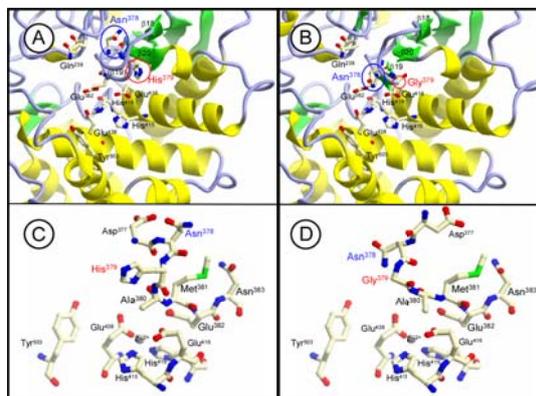
これまでに、*T. acidophilum* の TIFF3、ヒトロイコトリエン A4 加水分解酵素 (LTA4H) 及び大腸菌 APN の X 線結晶構造が解明されている。エキソペプチダーゼモチーフを構成する 5 つのアミノ酸残基は、短い  $\beta$ -strand を形成して触媒ポケットの内側に存在している (例えば TIFF3 における  $\beta$  19 鎖)。ヒト LTA4H においては、エキソペプチダーゼモチーフの中の 4 番目の Glu-271 残基は、基質やアミノペプチダーゼ阻害剤であるベスタチンのアミノ末端アミノ基と水素結合を形成し、1 番目の Gly-268 残基の主鎖のアミド基は、ベスタチンの主鎖のカルボニル基や基質ペプチドの P1' に位置するアミノ酸残基と水素結合を形成することが明らかとなった。さらに、大腸菌 APN の X 線結晶構造が明らかになった際に、エキソペプチダーゼモチーフの 1 つ前に位置する Met-260 残基が、構造変化を引き起こすことで、S1 ポケットの容積が変化し、様々な基質のアミノ末端に位置し異なる大きさを持ったアミノ酸残基をポケット内に受け入れることができるという新しい基質認識モデル「クッションモデル」が提唱された。これによって M1 アミノペプチダーゼの広範な基質特異性がいかに生じているかがうまく説明できる。またごく最近、マウス APA のエキソペプチダーゼモチーフの 1 残基手前の Thr-348 残基 (大腸菌 APN の Met-260 残基に相当) についても、それが基質特異性の発現に必須であることが報告されている。

以上の知見を考え合わせると、もしエキソペプチダーゼモチーフ中の Gly 残基が他のアミノ酸、特にかさ高いアミノ酸残基に置換された場合は、周囲のアミノ酸残基側鎖の空間的な配置にある程度の変化が生じ、その結果、M1 アミノペプチダーゼの酵素学的性状にも影響がでるのではないかと推察される。

そこで、この仮説について検証するため、野生型及び His379Gly 変異体 Laeverin について、触媒ポケットの立体構造モデルを *T. acidophilum* TIFF3 を鋳型にして作製した。シミュレーションの結果、野生型と変異体の間で、 $\beta$  19-strand 周辺のス1 ポケットの構造が大きく異なっていた (Fig. 3A, B)。また His-379 残基以外のエキソペプチダーゼモチーフを構成するアミノ酸残基の側鎖の空間配置についても His 残基から Gly 残基への点変異体によって影響を受けることが示唆された (Fig. 3C, D)。さらに Asn-378 残基 (大

腸菌 APN の Met-260 残基に相当) の側鎖の配置も、両酵素間で大きく異なることが示唆された。これらの結果から、エキソペプチダーゼモチーフの Gly 残基が His 残基へと置換されたことで S1 ポケットの構造に変化が生じ、その結果、ヒト Laeverin が分子進化の過程でユニークな基質特異性を獲得したのではないかと考えられる。

Fig. 3



これまでの研究において、Laeverin は胎盤中の EVT に特異的に発現する M1 アミノペプチダーゼであることが報告されている。それに加えて最近、Laeverin が子癩前症の患者の胎盤や間接リウマチ患者の滑膜組織においても高発現していることが報告されている。本申請課題では、野生型 Laeverin が、His379Gly 変異体 Laeverin よりも、Kisspeptin-10 や Endokinin C などの胎盤由来ペプチドホルモンを効率よく分解することを示したが、このことからヒト Laeverin がこれらペプチドホルモンの濃度調節を行うことで正常な妊娠をコントロール・維持するという生理的な役割を担っている可能性が示唆された。

一方、げっ歯類 (マウス、ラット) の Laeverin では、エキソペプチダーゼモチーフが GAMEN であることから、その酵素学的性状や生理作用は、ヒト酵素とは異なっていると推測できる。ヒトとげっ歯類では、胎盤形成の機構は大きく異なっており、特に EVT の子宮動脈への浸潤やその後の血管新生モデリングなどの点では差異が認められることが知られている。さらに Laeverin が EVT の細胞膜表面に発現していることを考え合わせると、ヒトとげっ歯類の Laeverin の酵素活性の差異が、それぞれの種の EVT の細胞機能に差異を生じ、ひいては胎盤形成の過程の違いにまで反映されるのではないかと考えられる。

以上、本申請課題を通じて、ヒト Laeverin のエキソペプチダーゼモチーフを構成する His-379 残基が、本酵素にユニークな基質特異性の発現や触媒作用に重要であることを明らかにした。さらに、本残基が最適な触媒

ポケットの構造形成に重要な役割を果たしている可能性を提示することができた。これらの成果は、今後 Laeverin に対する特異的な阻害剤の開発や、M1 アミノペプチダーゼファミリー分子の触媒メカニズムの解明に有用な知見を与えることが予想される。

#### 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 1 件)

Masato Maruyama, Naomi Arisaka, Yoshikuni Goto, Yosuke Ohsawa, Hideshi Inoue, Hiroshi Fujiwara, Akira Hattori, Masafumi Tsujimoto, “Histidine 379 of Human Laeverin/AminopeptidaseQ, a Nonconserved Residue within the Exopeptidase Motif, Defines Its Distinctive Enzymatic Properties” The Journal of Biological Chemistry, 査読有, vol. 284, 2009, 34692-34702

[学会発表] (計 2 件)

①Hattori A, Maruyama M, Arisaka N, Goto Y, Osawa Y, Inoue H, Fujiwara H, Tsujimoto M, “Histidine-379 of human laeverin/aminopeptidase Q, a non-conserved residue within the exopeptidase motif, defines its distinctive enzymatic properties” 6th General Meeting of the International Proteolysis Society, Surfers Paradise, Australia October, 2009

②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 残基の機能解析” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸 2008 年 12 月

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/anat2/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 正人 (MARUYAMA MASATO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00399445