

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07359

研究課題名(和文) 基質認識部位と触媒部位とが独立している新規タンパク質分解酵素の創製

研究課題名(英文) Creation of a protease with a catalytic site that is distant from the substrate binding site

研究代表者

伊倉 貞吉 (Ikura, Teikichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50251393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基質認識部位と触媒部位とが完全に分離したプロテアーゼの創製を目的として研究を行った。本研究の標的タンパク質として、すでにプロトタイプとしてのプロテアーゼ活性を見出している変異Pin1を対象に選び、まず、特異的な基質アミノ酸配列の決定を行った。そのための網羅的スクリーニングには、独自のシステムを開発した。次に、触媒部位を構成するアミノ酸残基を置換することにより、変異Pin1の触媒部位の最適化を行った。最後に、変異Pin1由来のプロテアーゼのマイクロ化を行った。プロテアーゼ活性部位から遠位のドメインの削除と安定性改善のための変異の導入も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質分解は生命活動にとって重要な役割を担っている。一方、生命科学分野の研究において、特異性の高いプロテアーゼは、*in vivo*と*in vitro*の両面で利用されてきた。また、その中には将来の医療現場での活用の可能性も期待されているものもある。ところが、自然界に存在するプロテアーゼは、基質認識部位の中に触媒部位を含むため、その利用には限界がある。本研究では、基質認識部位と触媒部位とが完全に分離したプロテアーゼの創製を目的として研究を行い、一定の成果を得た。さらなる特異性と触媒活性の向上が得られれば、将来の商品化の対象として展開が可能である。

研究成果の概要(英文)：In this research, I aimed to create a protease with a catalytic site that is distant from the substrate binding site. I selected a mutant of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 as a prototype for this purpose because the mutant happened to cleave the peptide bond between the 4th and 5th residues before a particular proline residue. First, I determined the sequence specificity of the substrate of the mutant Pin1 by the screening system I developed. Next, I optimized the catalytic site of the mutant Pin1 by substituting amino acid residues. Finally, I micronized the protease derived from the mutant Pin1. To this end, I deleted the N-terminal domain distal to the catalytic site and introduced several mutations to improve stability.

研究分野：生物物理学

キーワード：Pin1 プロリン異性化酵素 タンパク質分解酵素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質分解が生命活動にとって重要な役割を担っていることは周知の通りであり、翻訳後修飾の一つとして機能発現のトリガーを担うこともある。また、近年は、遺伝子組み換え技術を用い、ヒト由来のタンパク質を大腸菌等の別の生物で発現させて標品を得る事例が増えている。そこでは、用途に応じたアフィニティ・タグで精製後、特異性の高いプロテアーゼにより選択的にタグの切断・除去を行うことが常套手段として確立してきた。他方、プロテアーゼをタンパク質製剤として利用する試みもある。このようにプロテアーゼは、現在、*in vivo*と*in vitro*の両面での様々な研究で活用されているだけでなく、将来の医療現場での活用の可能性も期待されている。

(2) プロテアーゼに関する最大規模のデータベースである MEROPS (Sanger Inst.) には、現在までに 4000 種類以上のプロテアーゼが登録されているが、全てのプロテアーゼが、基質認識部位の内部に触媒部位を有している。そのため、基質の認識と触媒反応とが、一体化している。一方、基質側においては、認識される配列の中に切断部位が含まれることになるので、実験室でのプロテアーゼの利用にあたっては、切断したい部位の前後数残基を認識配列に置換してやらなければならない。このため、基質の切断部位近傍が非天然の配列になってしまうことは避けられない。多くの場合この非天然の配列が基質である標的タンパク質の性質に深刻な影響を及ぼすことはないが、時として問題になることもありえる。

### 2. 研究の目的

(1) 上述したように自然界に存在するプロテアーゼは、基質認識部位の中に触媒部位を含むため、その適用にあたっては、基質の切断部位の近傍の配列を認識配列に置換する必要がある。ここで、もし基質認識部位を触媒部位と分離することができれば、切断部位近傍が非天然の配列になってしまうのを避けることが可能になる。例えば、基質タンパク質の「認識配列から N 端側に正確に 5 残基離れた場所を、その場所の配列とは無関係に切断する」ことができれば、この結果できた N 端側断片は完全に天然配列になる。そこで、本研究では、このような基質認識部位と触媒部位とが完全に分離したプロテアーゼの創製を目的とする。

(2) 全く手がかりのないところからの出発では、本研究の研究期間内にこの目的を達成するのは難しい。これまでの研究の中で、私はすでに本研究が目指すプロテアーゼのプロトタイプを見出している。それは、Pin1 というプロリン異性化酵素の変異体である。この Pin1 の 1 残基置換体は、本来の機能を失い、弱いプロテアーゼ活性を示した。さらに、特定のプロリン残基から N 端側へ厳密に 5 残基離れたペプチド結合を切断することも、その後の研究から明らかにしてきた。本研究では、この Pin1 の変異体を鋳型に、基質認識の特異性を決定し、プロテアーゼ活性の向上を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 変異 Pin1 に特異的な基質アミノ酸配列の決定を行う。本来の Pin1 は pT/pS-P 配列に対し高い親和性を示すプロリン異性化酵素であるが、あまり注目されてはいないものの、pT/pS-P 配列の前後の配列も結合に影響している。さらに、今回の変異は Pin1 の基質特異性に大きな影響を与え、プロリン異性化活性の失活と、脱リン酸化 T/S-P への結合を示した。そこで、本研究では、この変異 Pin1 に対し最も親和性の高い基質アミノ酸配列を決定する。従来のプロテアーゼの場合は、基質親和性と触媒活性は半ば拮抗しており、反応生成物の遊離のためには、親和性が高すぎない方が良かった。しかし、この系では、変異 Pin1 の結合部位は切断部位の C 端側に離れており、切断後、N 端側断片は遊離する。従って、変異 Pin1 と基質タンパク質との親和性は高ければ高いほど、高い活性が得られるはずである。親和性の解析には、表面プラズモン共鳴法や等温滴定熱量計等が通常利用されるが、本研究では多種多様なアミノ酸配列に対してスクリーニングを行う必要があるため、新規スクリーニング法を開発した。この方法は、96 穴または 24 穴プレートに His タグで固定した GFP に融合した基質アミノ酸配列を標的として、変異 Pin1 のプロテアーゼ活性を発色変化により検出するものである。変異 Pin1 のプロテアーゼ反応は、サーモキサーを用いて行い、反応後のプレート洗浄と検出のためには、マイクロプレートウォッシャーと iMark マイクロプレートリーダーを適用する。基質となる His タグ付き GFP 融合蛋白質に関しては、すでに大腸菌での発現系を確立しており、1L の培養液から実質 1 日の精製で 4mg の精製標品を得ることが可能である。このスクリーニング系では、基質アミノ酸配列に網羅的な変異を導入し、変異 Pin1 のプロテアーゼ活性が最も高いものを決定する。また、pH、温度、塩強度などの反応条件の最適化も同時に試みる。

(2) 変異 Pin1 の触媒部位の最適化を行う。これまでの解析から、変異 Pin1 の触媒部位には、セリンプロテアーゼに特徴的な触媒 3 残基が存在することを見出している。しかし、現状の配置は最適とは言い難く、その活性は天然のプロテアーゼに比べて低い。そこで、本研究では、プロテアーゼ活性の最適化を目的として、触媒部位の配置を変えるようなアミノ酸残基の置換変異を

導入する。プロテアーゼ活性の測定には、特異的な基質アミノ酸配列の決定で用いたスクリーニング系を適用する。変異 Pin1 と最も親和性の高い配列をもつ基質アミノ酸配列を用いて、スクリーニング実験を行い、触媒部位の最適化を行う。

(3) 変異 Pin1 由来のプロテアーゼのマイクロ化を行う。プロテアーゼはタンパク質サイズが小さければ小さいほど立体障害を軽減することができ、攻撃可能な標的が多くなることが期待できる。そこで、本研究で創製したプロテアーゼのサイズを小さくすべく、プロテアーゼ活性部位とは遠位にある N 端側のドメインの削除を行う。また、それによって生じる熱力学的不安定性を、C 端側ドメインへの変異導入により改善する。ここで問題としている熱力学的安定性は、プロテアーゼ活性にも反映することが予想されるので、その評価系として、本研究の当初から用いているスクリーニング系を用いる。このようにして、本研究では、100 残基程度、すなわち、およそ 12kDa の、基質結合部位と触媒部位とが独立したプロテアーゼの創製を完成する。

(4) Pin1 の 1 残基置換が、本来の PPlase 活性をプロテアーゼ活性に転換する機構を理論的に解明する。野生型 Pin1 の結晶構造に対して C113A 変異を導入し、水中での野生型および変異体の分子動力学シミュレーションを行い、それらの 500 ナノ秒間の軌跡を解析し、ダイナミックスの比較を行う。解析では主成分分析を中心に据え、さらに特徴量の検出と比較のために独自の解析ツールのプログラミングも行う。

#### 4. 研究成果

(1) 変異 Pin1 に特異的な基質アミノ酸配列等の解析の結果、以下の成果を得た。野生型の Pin1 は pT/pS-P 配列に対し高い親和性を示すプロリン異性化酵素であるが、今回の C113A 変異は Pin1 の基質特異性に大きな影響を与え、プロリン異性化活性の失活と、脱リン酸化 T/S-P への結合を示した。また、Pin1 は、今回の標的である PPlase ドメインの他に、pT/pS-P 配列を同様に認識して結合する WW ドメインも有するが、脱リン酸化 T/S-P に対しては WW ドメインの結合は見られない。そこで、本研究では、この C113A 変異体の基質として、脱リン酸化タンパク質を用いて、WW ドメインの影響の無い状態での解析を行った。この目的のために用いたモデルタンパク質は、183 残基のアミノ酸からなる立体構造既知のタンパク質である。このタンパク質中の 7 箇所の Pro 残基と、その 5 残基の前のアミノ酸が、それぞれ、認識部位と切断部位の解析対象となる。各種条件下での反応分解物の解析により、以下の 3 点が明らかになった。

認識部位である Pro 周辺のアミノ酸残基の種類は活性に影響しない。

切断部位のアミノ酸残基の種類は活性に影響しない。

切断部位の溶媒露出面積の大きさは、活性の高さと正の相関を示した。

これらは、C113A 変異体が標的となる Pro 残基だけを認識し、アミノ酸残基の種類に関係なく 5 残基前のペプチド結合を切断できることを示していた。このことは、この変異 Pin1 が極めて汎用性の高いタンパク質分解酵素になりうることを示唆した。

(2) 変異 Pin1 に対して、触媒部位の最適化を行い、以下の成果を得た。これまでの解析から、変異 Pin1 の触媒部位には、セリンプロテアーゼに特徴的な触媒 3 残基が存在することを見出している。しかし、現状の配置は最適とは言い難く、その活性は天然のプロテアーゼに比べて低い。そこで、プロテアーゼ活性の最適化を目的として、触媒部位に対するアミノ酸残基の置換変異の導入をおこなった。変異に伴うプロテアーゼ活性変化の測定には、本研究で開発したスクリーニング系を適用し、変異 Pin1 と親和性の高い配列をもつ基質アミノ酸配列を用いて、触媒部位の最適化を行った。一方、基質の必須条件が露出した Pro 残基だけであることが解明されたので、Pin1 自身に対する自己切断を避けるために、Pin1 が有する 7 つの Pro 残基を全て Ala に置換する変異も導入した。この結果、Pin1 の自己切断の消失を達成することができた。

(3) 変異 Pin1 由来のプロテアーゼのマイクロ化を行い、以下の成果を得た。プロテアーゼはタンパク質サイズが小さければ小さいほど立体障害を軽減することができ、攻撃可能な標的が多くなることが期待できる。そこで、本研究で創製したプロテアーゼのサイズを小さくすべく、プロテアーゼ活性部位とは遠位にある N 端側のドメインの削除を行った。さらに、触媒部位およびその周辺残基に変異を導入し、8 種類変異体を作成した。各変異体に対し、野生型のマイクロプロテアーゼを基準(1U)として比活性を比較した(図 1)。本研究の端緒であった C113A および

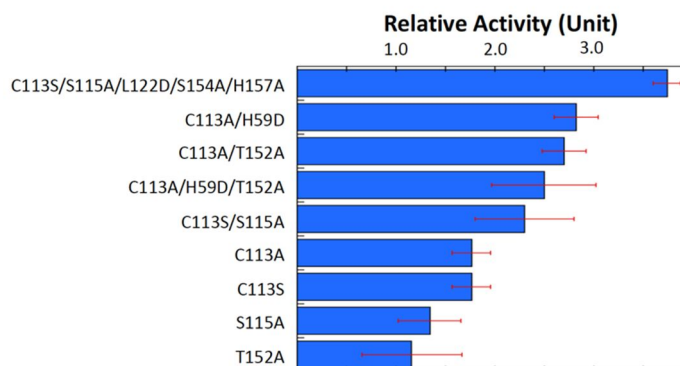


図 1 ミクロプロテアーゼの比活性

本研究の端緒であった C113A および

C113S は 1.8U で、H59D、S115A、T152A の変異をそれぞれ追加した C113A/H59D は 2.8U、C113S/S115A は 2.3U、C113A/T152A は 2.7U となり最大 1U の活性が上昇した。一方、S115A と T152A の変異は、それぞれ 1.3U と 1.2U に過ぎず、C113 の変異が不可欠であることがわかった。また、H59D と T152A を一緒に加えた C113A/H59D/T152A は 2.5U であり、H59D と T152A は機能的に等価であることが窺えた。その後、Pin1 の立体構造に基づき変異箇所を探っていき、最終的に C113S/S115A/L112D/S154A/H157A の 5 重変異体において、3.7U の最高値を得ることに成功した。

(4) 野生型と C113A 変異体の分子動力学シミュレーションを行い、以下の成果を得た。野生型と C113A 変異体のそれぞれに対し、500 ナノ秒間の分子運動の軌跡を観測し、主成分分析により両者の構造ダイナミクスを比較した。野生型では、H59 の側鎖がフリップ・フロップすることにより、C113 の側鎖および S115 の側鎖と交互に水素結合を形成することが観測された。さらに、この水素結合の変化は、水素結合ネットワークによって基質結合ポケットの開閉をもたらすことが明らかになった。一方、C113A 変異体では、H59 と C113 の側鎖間の水素結合が形成できないため、H59 の側鎖は S115 の側鎖とだけ水素結合を形成することになり、基質結合ポケットが閉じた構造だけをとっていることを発見した。これらの解析に基づき、水素結合ネットワークの変化が構造ダイナミクスの変化をもたらす分子機構の解明に成功した。また、C113A の変異が H59 の側鎖のフリップフロップを抑制し、水素結合ネットワークを介して分子を閉構造に固定することがわかった(図2)。この分子の閉構造への固定がプロテアーゼ活性を促進すると推察される。

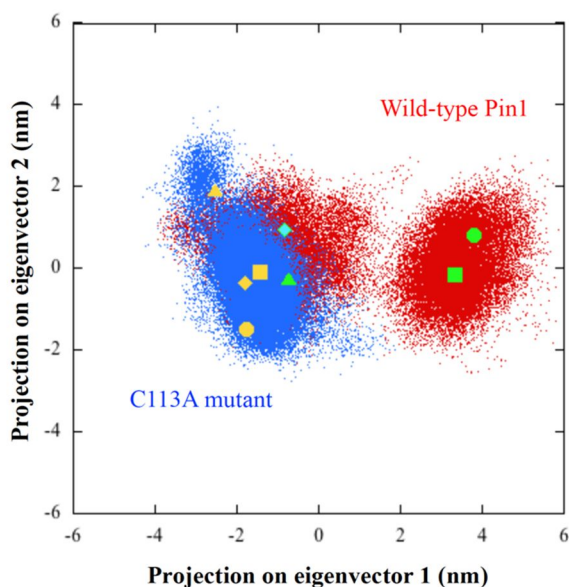


図2 野生型 Pin1 と C113A 変異体のダイナミクス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Teikichi Ikura, Naoya Tochio, Ryosuke Kawasaki, Mizuki Matsuzaki, Akihiro Narita, Mahito Kikumoto, Naoko Utsunomiya-Tate, Shin-ichi Tate, Nobutoshi Ito	4. 巻 592
2. 論文標題 The trans isomer of Tau peptide is prone to aggregate, and the WW domain of Pin1 drastically decreases its aggregation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3082-3091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teikichi Ikura, Yasushige Yonezawa, Nobutoshi Ito	4. 巻 16
2. 論文標題 Mutational effects of Cys113 on structural dynamics of Pin1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 452 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊倉貞吉, 米澤康滋, 伊藤暢聡
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1の1残基変異C113Aに伴うダイナミクスの劇的变化
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito
2. 発表標題 Micronization of a protease derived from Pin1
3. 学会等名 The 57th annual meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊倉貞吉, 米澤康滋, 伊藤暢聡
2. 発表標題 Pin1由来のタンパク質分解酵素の触媒部位の構造ダイナミクス
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teikichi Ikura and Nobutoshi Ito
2. 発表標題 Mutational analysis on the catalytic site of a protease derived from Pin1
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊倉貞吉, 栃尾尚哉, 川崎亮祐, 松崎瑞季, 成田哲博, 菊本真人, 楯直子, 楯真一, 伊藤暢聡
2. 発表標題 Pin1のWWドメインは、タウペプチドのトランス異性体の凝集化を阻害する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊倉貞吉
2. 発表標題 タンパク質機能における階層的様相
3. 学会等名 理論生物物理学の現在と未来
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikura, T., Ito, N.
2. 発表標題 Functional conversion from peptidyl-prolyl isomerase to protease by a single amino acid substitution.
3. 学会等名 2017 International Biophysics Congress (IUPAB) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊倉貞吉, 伊藤暢聡
2. 発表標題 Pin1由来のタンパク質分解酵素の触媒機構
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊倉貞吉, 伊藤暢聡
2. 発表標題 タウ蛋白質に対するPin1由来のプロテアーゼの活性の定量的評価
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 赤澤陽子, 浅野竜太郎, 荒川力, 有坂文雄, 安藤昭一郎, 伊倉貞吉, 池口雅道, 石井明子, 石原智彦, 伊豆津健一, 今村比呂志, 岩下和輝, 千賀由佳子, 内山進, 江島大輔, 太田里子, 小澤大作, 小野寺理, 加藤昌人, 河村義史, 城所俊一, 黒田裕, 黒谷篤之, 五島直樹, 後藤祐児, 柴田寛子, 白木賢太郎, 杉山正明, 千賀由佳子, 田口英樹, 武内敏秀, 津本浩平, デミエン ホール 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 283
3. 書名 タンパク質のアモルファス凝集と溶解性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----