

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25日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21750181

研究課題名（和文）ヒト由来生理活性ペプチドホルモン末端Cアミド化酵素の構造と反応機構の全容解明

研究課題名（英文）Investigation of the structure and reaction mechanisms of human peptidylglycine α -amidating monooxygenase

研究代表者

下川 千寿（CHIZU SHIMOKAWA）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20529284

研究成果の概要（和文）：多くの生理活性ペプチドの活性発現に必要とされる C 末端アミド構造は PHM ドメインおよび PAL ドメインをもつ酵素 PAM の触媒作用によって生成される。本研究では、酵素 PAM に含まれる金属イオンの役割を明確にすることによる酵素反応機構の解明をめざした。金属を除去したアポ型酵素および一連の金属再構成酵素を作製し、それらの酵素活性の測定を行った。その結果、Apo-PAM/PAL では酵素活性が消失したが、再構成 Cu-PAM では PHM 活性が、再構成 Zn-PAL では PAL 活性が認められ、また、再構成 Cu, Zn-PAM では PAM 活性が認められた。さらに他の金属再構成酵素についても検討を行い、PAM の酵素反応機構について考察を行った。

研究成果の概要（英文）：Peptide C-terminal α -amide groups essential for the full biological activity of many peptide hormones are produced by a bifunctional peptidylglycine α -amidating enzyme (PAM). PAM consists of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM) and peptidylamidoglycolate lyase (PAL). The purposes of this study are the clarification of the roles of the metals in PAM for understanding its reaction mechanism. We prepared Apo-PAM/PAL and Metal(s)-substituted enzymes. Apo-enzymes are remarkably diminished the PHM and PAL activities. But the Cu-substituted PAM restored the PHM activity, the Zn-substituted PAL restored the PAL activity, and the Cu, Zn-substituted PAM fully restored the PAM (PHM and PAL) activity. In addition, the effects of a series of divalent metals on the PAM activity were determined. Based on the findings, we will discuss the roles of the enzyme-bound metals in the PAM reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合医学・生体関連化学

キーワード：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質・ホルモンとして機能する多くのペプチドは、C末端アミノ酸残基がアミド化されており、このアミド構造が生物活性の発現に重要な役割を果たしている。このC末端アミド基はC末にグリシン残基をもつアミド化ペプチドの直接の前駆体から、図1に示す2段階の酵素反応により酸化分解を受けて生成される。まず第1酵素であるPHMによってグリシン残基の水素の脱離と水酸化が起こる。このモノオキシゲナーゼ反応の電子供与体は ascorbate である。ついで生じた水酸化グリシン中間体は第2酵素であるPALによってアミド化ペプチドとグリオキシル酸に解裂される。

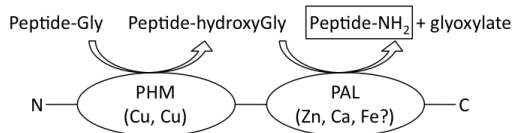


図1. 2頭酵素PAMにおけるペプチドC末端アミド化反応

PALについては、反応機構の解明は全く進んでおらず、酵素学的にも不明な点が多く残されている。解明すべき問題の1つは酵素に結合する金属イオンの役割である。PAL反応がEDTA処理により阻害され、Zn²⁺、Co²⁺、Cd²⁺の添加によって一部活性が復活することから、PALには何らかの二価金属イオンが必要である。我々を含めいくつかの研究グループは、PALに1molのZn²⁺と0.2-0.7molのFeが結合していることを明らかにしているが、これ以外に金属イオンの役割に関する大きな進展は不明である。第2の問題点は、反応に関わるアミノ酸残基である。PAL反応の本質は水酸化グリシンの水酸基が塩基触媒によって脱プロトン化されることでもっとも合理的に理解される。そうであれば、活性中心において塩基性アミノ酸あるいは金属に配位したOH⁻が触媒塩基として機能しなければならない。我々はArg残基の化学修飾によりPAL活性が100%阻害されることを見出し、Argが触媒塩基として深く関与していることを示唆した(*Prot. Expr. Purif.* **28**, 293, 2003)。従ってPAL反応の全貌を明らかにするためには、金属イオンの役割の解明や結晶構造解析による活性中心部位の構造解明が求められる。

また、PHMとPALは本来はひとつのmRNAにエンコードされており、2頭酵素PAMとして翻訳されるが、種によっては、限定分解を受け別々の酵素として機能する場合と、限定分解を受けず二頭酵素として機能する場合がある。両酵素の間に何らかの基質チャンネルが存在するか否かは興味深い問題であるが、現在のところ両酵素がそれぞれ単独で働くのか複合体として働くのか、その相関はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、酵素PAMに含まれる金属の役割、とくにPALドメイン中に含まれているZnやFeイ

オンの役割の解明、およびPHM・PAL間の共同作用の実体を、分光学的、生化学的および構造学的研究により明らかにし、ペプチドC末端アミド化酵素の全貌を解明することを目的とする。

(1) PALにおける金属イオンの役割と反応に関与するアミノ酸残基の役割: PALにおけるZn²⁺の役割には、触媒的あるいは構造的役割の2つの可能性があるが、我々は一連の水和2価金属イオン(Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺)自身が、一般塩基触媒として非酵素的にPAL反応を促進することを見だし、PAL活性中心のZn²⁺に配位した水分子が触媒塩基として機能する可能性を示唆している(*Biochemistry* **48**, 1654-1662, 2009)。他のZn含有水解酵素で見いだされたような、金属除去・置換による活性の低下と回復あるいはkinetic parameterの変化は、PALの研究上非常に重要な意味を持つ。また、Zn²⁺が触媒的に機能しているならば、多くの場合Zn²⁺は四面体配位環境にあり、水分子が1つの配位子として結合していると考えられる。このような配位環境にCo²⁺が置換した場合、Co²⁺はhigh spin状態で安定化するため、特異的なESR spectrumが得られることが期待される。また、Feの反応への関与については、我々は次の理由から否定的に考えている。我々の野生型酵素標品には例外なくほぼ1molのZn²⁺が含まれるのに対し、Fe含量は0.2-0.7molと大きくばらばらである。一部の研究者は、Zn²⁺とFeがbimetallic centerを形成する可能性を指摘しているが(*JBC.* **281**, 20873, 2006)、我々の予備実験ではむしろFeはPAL活性に対し阻害的に働いている。PAL反応における金属の役割の解明は、他の金属酵素の理解に重要な情報をもたらす。

(2) PAMの結晶化と構造解析: 2頭酵素PAMの構造解析はPHMとPALの協同作用の実体を知るために必須である。また、PALはこれまでの予備実験から既知の亜鉛酵素とは異なるユニークな構造的性質を持つ可能性が期待され、PALの反応理解にとどまらず、新たな亜鉛酵素カテゴリーを見出す可能性を含んでいる。

3. 研究の方法

実験すべてにおいて必要なPAMおよびPALはCHO-K1を用いて発現させたヒト由来組換え蛋白質を用いた。PAMはC末端に膜結合領域を持つが、その領域を除いた蛋白質を発現し、実験に使用した。蛋白質は各種クロマトグラフィーを行うことにより、高純度に精製したものを使用した。

(1) ヒトPAMの金属除去および金属置換実験

a) ヒトPAMの金属除去と金属分析: この酵素に対する金属除去を、我々が考案した装置を用いて行った。この装置は、4°Cに保ったフラスコ内の透析外液に、酸素を完全に除去したアルゴンガスを持続的に通気することで、厳密な嫌気状態が保たれるように設計されている。透析外液への試薬の添加は嫌气的に行った。透析カセット内の酵素タンパクを、各種キレート剤および還元剤を含む緩衝液に対して透析した。透析前後で、酵素タンパク質に含まれる金属含量はICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析装置、久

留米リサーチパーク・オープンラボ設置装置の共同利用)にて測定し、金属除去効果を確認を行った。

b) 金属除去酵素の再構築と反応解析

得られた金属除去酵素を、様々な濃度の金属イオン溶液中で incubate し、金属再構成酵素の構築を行った。それぞれについて PHM および PAM 活性については Tyr-Val-Gly 誘導体を基質に用い、PAL 活性については

Tyr-Val-hydroxyGly 誘導体を基質に用いて酵素活性測定を行った。単独の金属イオンで PAL 活性が回復するか、あるいは複数の金属イオンが同時に必要かについても検討を加えた。

(2) ヒト PHM および PAL 発現細胞の樹立: PHM および PAL ドメインを用いた反応解析を行うため、ヒト由来 PHM ドメインおよび PAL ドメインの発現系の構築を行った。

(3) ヒト PAL の金属除去・金属再構成および反応解析: (1)と同様の方法を用いて、PAL について金属除去、金属再構成およびそれぞれについて活性測定を行った。

(4) PAM の結晶化:我々は、2 頭酵素 PAM の発現・精製系を確立して以来、その結晶化に着目しており、いくつかの結晶化条件において、針状結晶が再現性よく生じることを見出ししている。この結晶が有機物や塩の結晶ではなくタンパク質の結晶である事はタンパク質結晶染色色素を用いて確かめているが、この結晶は複数の結晶の混在であるため、構造解析に適していない。そこで、さらに沈殿剤や塩の濃度変化、金属イオンの添加などを行い、結晶化条件の最適化を行った。また、糖タンパク質の不均一性を解消するために酵素的な手法や変異導入における脱糖鎖についても行った。また基質結合型 PAM の構造解析を得るため、結合させる基質として C 末端にピルビン酸を結合させた基質アナログである *N*-acetyl-Phe-pyruvate を用いた結晶化についても試みた。このものは PAL の基質とはならず、競合阻害剤として働くことが知られている (*Biochem. J.* **350**, 521, 2000)。

このような実験から得られた情報を総合して、二頭酵素 PAM の反応機構の詳細について考察した。

4. 研究成果

(1) 二頭酵素 PAM を用いた金属除去実験において、透析外液に *o*-Phenanthroline を加え、さらに還元剤に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を用いることで、PAM 中のほぼすべての Fe イオンを除去することに成功した。透析前の PAM には、560 nm にアミノ酸から Fe への LMCT バンドが確認されているが、透析後にはこの吸収が消失する。活性測定の結果、Apo-PAM に Cu イオンを添加して得られた再構成 Cu-PAM には水酸化中間体の生成がみられ、PHM 活性が回復された。Apo-PAM に Cu と Zn イオンを添加して得られた再構成 Cu, Zn-PAM にはアミド化ペプチドの生成がみられ、PAM 活性が回復された。一方、Apo-PAM に Cu と Fe イオンを添加して得られた再構成 Cu, Fe-PAM には水酸化中間体のみが生成し、アミド化ペプチドの生成活性は確認されなかった。

このことから、PAL 活性の発現には Fe イオンを必要としない事が明らかとなった。さらに金属を組み合わせて詳細に反応解析を行う事で、いくつかの金属イオンがその酵素活性を促進または阻害することを突き止めた。複数の金属サイトが存在する二頭酵素 PAM ではそれ以上の解析が困難であったため、各ドメインを用いた反応解析を行う必要があった。

(2) そこで、PHMドメインおよびPALドメインの発現系の構築について検討を行った。既存のヒト由来 PAM 発現ベクターから PHM および PAL 遺伝子それぞれのサブクローニングを行い、CHO 細胞にそれらの遺伝子を導入した。限界希釈法で希釈して 96 穴プレート上で培養した結果、各ドメインの高発現細胞を樹立することができた。

(3) 今回新たに樹立した PAL 発現細胞から PAL を精製し、得られた PAL から含まれる金属イオンの除去を行った。この金属除去 PAL および金属再構成 PAL を用いて反応解析を行うことで、PAL 活性の発現に必要な金属イオンを明らかにした。この実験においても二頭酵素 PAM を用いたときと同様に PAL 活性の発現には Fe イオンを必要としない事が明らかとなった。さらに金属除去 PAL に添加する金属イオンの種類によって PAL 活性を促進または阻害することを突き止めた。これら一連の研究によって 2 頭酵素 PAM に含まれる全ての金属イオンの役割が明らかにされた。

(4) PAM の結晶化についてであるが、まず糖タンパク質の不均一性を解消するために行った酵素的な手法や変異導入法を用いて脱糖鎖 PAM を作成したところ、非常に早く分解することがわかり、糖鎖が酵素の安定性に大きく寄与していることが明らかとなった。結晶化条件の最適化について検討したところ、さらにいくつかの条件において結晶が生じたが、いずれも構造解析に適した結晶ではなかった。基質存在下における結晶化についても同様であった。しかし、今回の研究で新たに得られた PHM および PAL ドメインおよび二頭酵素 PAM の金属除去および金属再構成体は、結晶構造を得るための新たな可能性の 1 つである。

以上のように、本研究では酵素 PAM に含まれる金属イオンの役割を明確し、さらに金属イオンの種類によって酵素活性を促進または阻害することが明らかとなった。また、得られた金属除去および金属再構成酵素は 2 頭酵素 PAM の機能解明につながるのみでなく、結晶構造解析や新規な酵素反応の発現などに大きな可能性を見いだした。

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 4 件)

1) N. Fujieda, M. Murata, S. Yabuta, T. Ikeda, C. Shimokawa, Y. Nakamura, Y. Hata, and S. Itoh:

Multifunctions of MelB, a Fungal Tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. *ChemBioChem*, **13**(2), 193-201 (2011), 査読有り

2) H. Sato, Y. Higashimoto, H. Sakamoto, M. Sugishima, C. Shimokawa, J. Harada, G. Palmer, and M. Noguchi: Reduction of oxaporphyrin ring of CO-bound α -verdoheme complexed with heme oxygenase-1 by NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Inorg. Biochem.* **105**(2) 289-296 (2011), 査読有り

3) T. Miyazaki, C. Shimokawa, T. Matsushita, S. Itoh, and J. Teraoka: Resonance Raman Spectra of β -Diketiminatocopper(II) Complexes. *Bull. Chem. Soc. J.*, **83**(10), 193-201 (2010), 査読有り (Selected Paper)

4) H. Sato, M. Sugishima, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, C. Shimokawa, K. Fukuyama, G. Palmer and M. Noguchi: Crystal structure of rat haem oxygenase-1 in complex with ferrous verdohaem: presence of a hydrogen-bond network on the distal side. *Biochem. J.* **419**(2) 339-345 (2009), 査読有り

[学会発表] (計6件)

1) 下川千寿, 原田沙織, 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 野口正人: ヒト由来アポ型アミド化酵素の金属再構成体を用いた反応解析. (平成23年度日本生化学会九州支部例会, 2011/5/21-22, 久留米大学旭町キャンパス, 福岡)

2) C. Shimokawa, S. Harada, Y. Higashimoto, H. Sato, M. Sugishima, and M. Noguchi: The roles of zinc and iron in peptide amidation. (2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), 2010/12/15-20, Honolulu, Hawaii, USA)

3) 杉島正一, 原田二朗, 佐藤秀明, 下川千寿, 原田沙織, 野口正人: Hinge 欠損型 NADPH-シクロム P450 還元酵素を用いたヘムオキシゲナーゼ反応と相互作用解析. (平成22年度日本生化学会九州支部例会, 2010/5/22-23, 鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島)

4) 下川千寿, 原田沙織, 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 野口正人: ペプチドアミド化反応における亜鉛および鉄イオンの役割. (日本化学会第90春季年会, 2010/3/26-29, 近畿大学本部キャンパス, 大阪)

5) H. Sato, M. Sugishima, Y. Higashimoto, H. Sakamoto, C. Shimokawa, M. Noguchi: Ferrous α -verdoheme in complex with rat heme oxygenase-1. Its crystal structure and electrochemistry. (Heme oxygenases in biology and medicine; The 6th international congress on heme oxygenases, 2009/9/30-10/4, Miami Beach, Florida, USA)

6) 下川千寿, 原田沙織, 東元祐一郎, 佐藤秀明, 杉島正一, 野口正人:

Peptidylamidoglycolate lyase 反応における亜鉛および鉄イオンの役割. (第24回生体機能関連化学シンポジウム・第12回バイオテクノロジーシンポジウム, 2009/9/13-15, 九州大学医系キャンパス, 福岡)

[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

下川 千寿 (CHIZU SHIMOKAWA)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 20529284

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者