

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590081

研究課題名(和文) M1及びS9ファミリーに属する高分子量ペプチダーゼの構造解析

研究課題名(英文) Structural analyses of the high molecular mass peptidases belonging to M1 and S9 families

研究代表者

伊藤 潔 (Ito, Kiyoshi)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50201926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脳に豊富に存在するアミノペプチダーゼが属するM1ファミリーやトリパノソーマ感染に重要なオリゴペプチダーゼBを含むS9ファミリー酵素群は、ペプチドの切断活性を担う領域を覆う特異な構造を有するため分子サイズが大きいのが特徴である。2種類の高分子量ペプチダーゼを材料として研究を行い、活性発現に重要ないくつかのアミノ酸残基の機能を明らかにするとともに、構造解明に不可欠な酵素結晶の作成条件を見出すことに成功した。これらの成果は、脳内アミノペプチダーゼ酵素群の役割の解明とある種の微生物感染症の新たな化学療法の可能性として重要である。

研究成果の概要(英文)：High molecular mass is a characteristic feature of the M1 and S9 family enzymes. Enzymes belonging to M1 family contain many aminopeptidases abundant in brain and those to S9 family contain oligopeptidase B, which is involved in the infection process of trypanosomiasis. These enzymes possess unique structures covering the catalytic center of cleavage activity. In this study, two peptidases, a puromycin-sensitive aminopeptidase from human and oligopeptidase B from some bacteria were used to investigate important amino acid residues for activity. In addition, crystallization conditions for some enzymes were found. It is important to understand physiological functions of brain aminopeptidases and to develop a new way of chemotherapy against some infectious diseases.

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：ペプチダーゼ オリゴペプチダーゼB アミノペプチダーゼ S9ファミリー M1ファミリー 基質特異性 基質阻害

1. 研究開始当初の背景

M1 ファミリー酵素群には、脳に豊富に存在し神経ペプチドの分解に関わるピューロマイシン感受性アミノペプチターゼ (hPSAP) やコロナウイルスのレセプターとして機能するアミノペプチターゼ N (APN) が含まれる。大腸菌 APN については、申請者らの研究グループ (JBC, 2006, 281: 2283) と米国の研究グループ (PNAS, 2006, 103: 13339) がほぼ同時に立体構造を決定し、その後、髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* (PDB code: 2GTQ) やマラリア原虫 *Plasmodium* spp. 由来の APN (PNAS, 2009, 106: 2537) の構造が決定されている。ヒトの M1 ファミリーペプチターゼとしてはロイコトリエン A4 ヒドロラーゼの構造決定がなされているのみで、他のペプチターゼについては酵素活性を保持した状態でタンパク質を産生することが難しく、世界中で試みられているが構造決定できていない。また、構造解析に有利な大腸菌で発現させた場合、細胞内で封入体を形成してしまうという大きな問題もある。

オリゴペプチターゼ B (OPB) は、トリパノソーマの感染過程に関与することが報告されており、創薬上の重要な標的分子である (Cell Microbiol., 2002, 4: 701)。OPB の高次構造は、プロリルオリゴペプチターゼに見られるプロペラドメインが触媒ドメインを覆う特異な構造 (Cell, 1998, 94: 161) に類似することが予想される。この酵素についても世界中で結晶化が試みられているが、未だ結晶構造解析に成功していない。

2. 研究の目的

ピューロマイシン感受性アミノペプチターゼ (PSAP : EC 3.4.11.14) は、活性中心に一個の亜鉛を持つ分子量 99 kDa のメタロエキソペプチターゼで、ペプチターゼファミリー M1 に属する。ヒトには少なくとも 13 種類の M1 ファミリー酵素が同定されておりほとんどが膜結合型酵素であるが、本酵素は脳や神経の細胞質に存在する可溶性酵素である。ポリグルタミン配列の消化や疼痛に関与している等と報告されているが、詳細な生理機能は不明である。

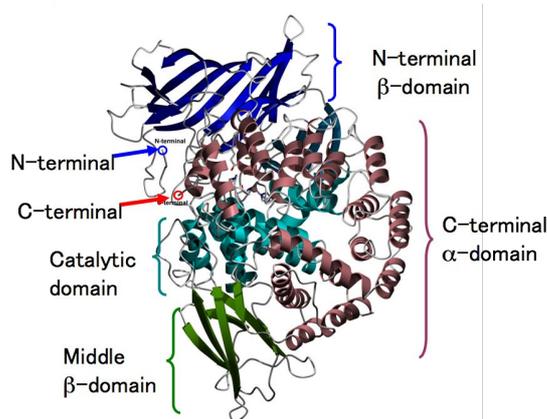


図1 大腸菌アミノペプチターゼNの全体構造

図1は申請者らが決定した、同ファミリーに属する大腸菌由来アミノペプチターゼ N (eAPN : EC 3.4.11.2) の立体構造である。サーモライシンに類似した活性ドメインのまわりを、他の3つのドメインが覆うように存在する特異な構造を有する事、Met260の側鎖のコンホメーション変化により非常に幅広い基質特異性を示す事を明らかにしている。本研究では、ヒトの M1 ファミリー酵素の基質認識機構を明らかにすることを目的として研究を行った。S9 ファミリーにはプロリルオリゴペプチターゼ (POP : EC 3.4.21.26) やオリゴペプチターゼ B (OPB : 3.4.21.83) が属する。図2には POP の構造を示している。

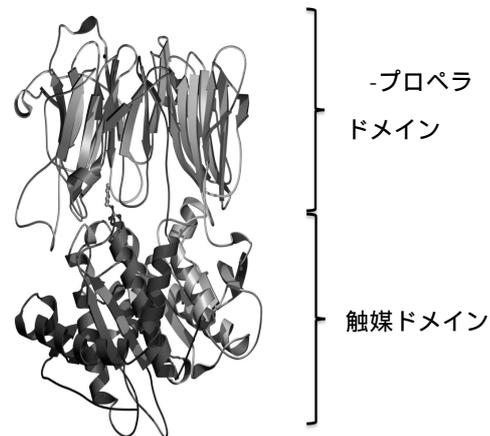


図2 ブタプロリルオリゴペプチターゼの構造

触媒ドメインの上部に -プロペラドメインが覆いかぶさるのが分かる。POP はプロリン残基に特異性を示すエンドペプチターゼであるが、OPB は塩基性アミノ酸残基に特異性を示すエンドペプチターゼである。何がこのような OPB の基質特異性を決定するかについては盛んに研究が行われてきた。しかしながら、部位特異的変異法を用いた基質特異性の解析によって触媒に必須のアミノ酸残基が決定されているのみで、高次構造からのアプローチは未だなされていない。OPB の構造決定を行い、POP との構造上の違いを比較することにより、同ファミリー間ペプチターゼの基質特異性や触媒メカニズムの違いを深く理解できる。これは、創薬として特異的阻害剤を開発する上で貴重な情報を提供する。

3. 研究の方法

完全長ヒト cDNA を鋳型として PCR で hPSAP 遺伝子を増幅し、pET28a(+) に挿入したものを発現プラスミドとした。大腸菌 BL21 (DE3) pLys を宿主として、IPTG により誘導後、18 の低温培養で hPSAP を発現した。Ni-アフィニティーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、アミノアシル

-MCA(メチルクマリナムイド)を基質として、遊離する AMC(アミノメチルクマリナム)量を蛍光光度計を用いて測定した(励起波長:380 nm、蛍光波長:460 nm)

報告されている細菌ゲノム情報を基に、3種のグラム陰性菌 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*、及びグラム陽性菌である *Rhodococcus erythropolis* のゲノム DNA から OPB 遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として各細菌の OPB を発現させた。OPB 活性は、各種ペプチジル-MCA を基質として、アミノペプチダーゼと同様の方法で測定した。

#### 4. 研究成果

M1 ファミリー酵素であるヒトアミノペプチダーゼ N (hAPN) とピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (hPSAP) と S9 ファミリー酵素であるオリゴペプチダーゼ B (OPB) を中心に研究を行った。M1 ファミリー酵素群には、脳に豊富に存在し神経ペプチドの分解に関わるピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (hPSAP) やコロナウイルスのレセプターとして機能するアミノペプチダーゼ N (APN) 等が含まれ、構造の解明によりこれらの重要な機能を制御する可能性が高まると期待できる。また、ある種の微生物感染過程に重要な役割を果たしている OPB の構造解明により新たな化学療法の道が開ける可能性があり重要である。

すでに構築していた大腸菌発現系を用いて hAPN と hPSAP の発現条件の検討を行い、hPSAP については 18 の低温条件において活性を有する可用性酵素の発現に成功した。His タグ付加酵素についていくつかの結晶を得ることができたが、さらに良好な結晶を得ることを目的として、タグなし酵素の発現系も構築し、精製酵素を得ることに成功した。この酵素を用いて結晶化条件の検討を再度検討したが、構造解析を行うことができる品質の結晶は得ることができなかつた。そこで、我々が結晶構造解析に成功した大腸菌アミノペプチダーゼ N (eAPN) との一次配列比較から Ala271、Asn337、および Phe389 に注目し、これらのアミノ酸残基を eAPN 型に変化させた A271M、Q337K、F389Y 変異体を作製し、性質を解析した。Q337K 変異体はうまく発現させることができなかったが、eAPN の M260A 変異体ではピューロマイシン感受性が低下したのに対し、hPSAP の A271M 変異体ではピューロマイシン感受性に大きな変化は認められないことを明らかにした。eAPN の Met260 は幅広い基質特異性に重要な役割を果たすアミノ酸残基である。種々の合成基質を用いた速度論解析の結果からは、A271M 変異体における基質特異性の変化が観察され、Ala271 も eAPN の Met260 同様に基質特異性に関与しているが、役割は異なっていると考えられた。F389Y 変異体の Km 値は変化せず kcat 値が大きく低下したことから、Phe389 はミカエリス

複合体形成ではなく触媒反応に関与していると考えられた。eAPN の Tyr376 は N 末端アミノ基を認識する Glu121 と相互作用しており、これは構造解明されている human leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) でも同様であったが、もう一つの既知結晶構造である *Thermoplasma acidophilum* tricorner interacting factor F3 (TIF3) では反応中間体安定化残基である Tyr351 (eAPN の Tyr381) の方を向いていた。従って、hPSAP の F389Y 変異体においては、Glu136 または Tyr394 残基 (eAPN の Glu121 か Tyr381) との相互作用により代謝回転数が低下したのではないかと推測している。尚、hAPN については、少量を可溶性タンパク質として回収することには成功したものの、その酵素活性はきわめて低く、hPSAP を含めた構造決定を目的として、更なる結晶化条件の検討を現在も継続している。

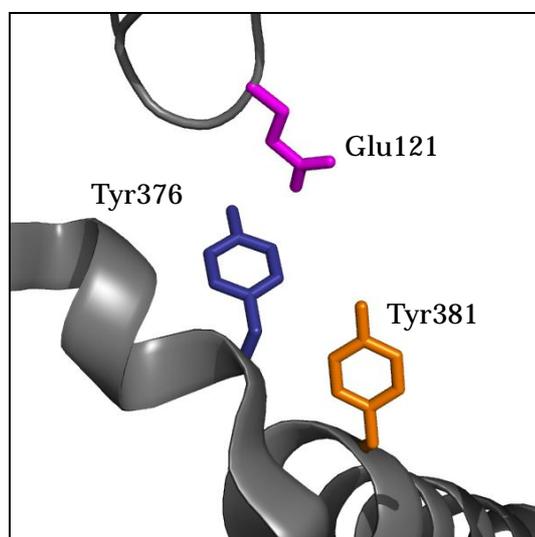


図3 大腸菌アミノペプチダーゼNの活性中心の構造

一方、OPB について、数種類の細菌より遺伝子をクローニングして大腸菌発現系を構築した。多くの酵素について活性を有する酵素を精製することにも成功したので、それらの内、十分量の発現酵素を得ることができた4種類の酵素、日和見感染菌として知られる *Serratia*、*Xanthomonas* とグラム陽性の *Rhodococcus* およびグラム陰性である大腸菌の OPB について、種々の合成基質を用いた詳細な速度論解析を行い、基質特異性を比較した。その結果、*Serratia marcescens* の OPB (SemOPB) が、OPB の大きな特徴である基質阻害現象を示さないことを明らかにすることができた。この結果は、感染症のドラッグターゲットとしての価値を持つ OPB の効率的な阻害剤をデザインするための有用な情報となると考えられ、その原因解明のため、*Serratia marcescens* OPB と他の OPBs のの一次構造を比較しながら部位特異的変異体の構築を行い、酵素化学的解析を計画している。

これら OPBs についても、構造決定を目的とした結晶化条件の検討を M1 ファミリー酵素と同様に継続している。

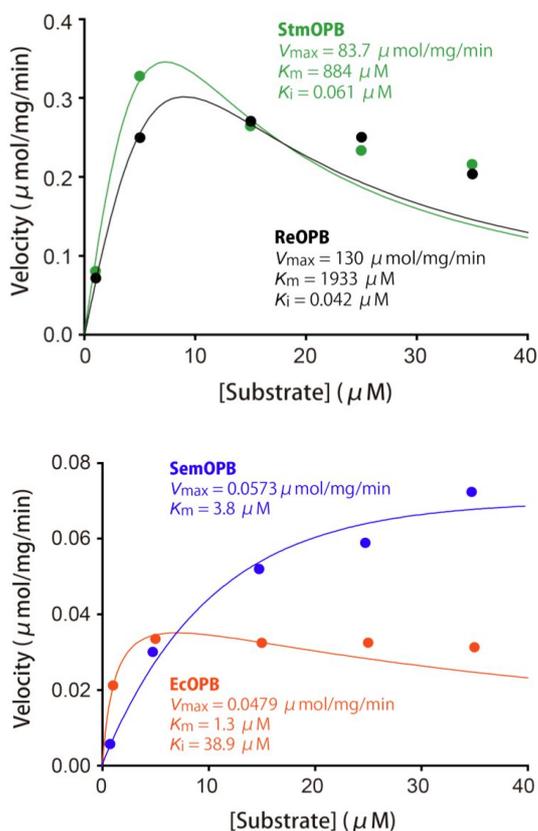


図4 OPBの示す基質阻害

(青色の SemOPB=Serratia marcescens OPB だけは基質阻害現象を示さない)

#### 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. Malik Suliman, Yoshitaka Nakajima, Hiroshi Oyama, Nobuhisa Iwata, and Kiyoshi Ito  
 Assesment of Substrate Inhibition of Bacterial Oligopeptidase B.  
 Biol. Pharm. Bull. (査読有) 35 (11), 2010-2016 (2012)
2. Ryuji Yamazawa, Yoshitaka Nakajima, Karin Mushiake, Tadashi Yoshimoto, Kiyoshi Ito  
 Crystal Structure of Serine Dehydrogenase from Escherichia coli: Important role of the C-terminal region for closed-complex formation.  
 J. Biochem. (査読有) 149, 701-712 (2011)

[学会発表](計 13 件)

1. 新田有香, 伊藤潔, 他 5 名: FDP-lysine による血管内皮細胞接着分子の発現誘導メ

カニズムの解析、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本市

2. 魚住茉莉, 伊藤潔, 他 5 名: シソ精油は血管内皮細胞における ICAM-1 の発現を抑制する、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本市
3. 大河原晋, 伊藤潔, 他 6 名: GT1-7 細胞を用いたカドミウムの細胞死誘導作用の解析、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本市
4. 新田有香, 伊藤潔, 他 5 名: FDP-lysine による内皮細胞接着分子の発現誘導、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日、佐世保市
5. 小山裕也, 伊藤潔, 他 7 名: PrP 断片ペプチドに対する pH および金属の影響、日本薬学会第 133 年会、平成 25 年 3 月 29 日、横浜市
6. 大河原晋, 伊藤潔, 他 6 名: ゼラニウム精油によるレプチン受容体の発現誘導、日本薬学会第 133 年会、平成 25 年 3 月 29 日、横浜市
7. Malik Suliman, 伊藤潔, 他 8 名: 細菌由来オリゴペプチダーゼ B の基質阻害、第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 16 日、福岡市
8. 黒川裕美, 浅井将, 伊藤潔, 他 13 名: G179S 変異体を用いたクレアチナーゼの基質および金属イオン親和性の解析、第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 16 日、福岡市
9. 久土綾香, 伊藤潔, 他 6 名: 脂質過酸化最終産物の不死化視床下部神経細胞 GT1-7 に対する毒性発現機構の解析、第 29 回日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 8 日、熊本市
10. 大河原晋, 伊藤潔, 他 6 名: N-(3-formyl-3,4-dBehydropiperidino)lysine の不死化視床下部神経細胞 GT1-7 に対する毒性発現「フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー」、平成 24 年 10 月 25 日、名古屋市
11. Malik Suliman, 伊藤潔, 他 4 名: Substrate inhibition of bacterial oligopeptidase B、第 18 回日本生物工学会九州支部福岡大会、平成 23 年 12 月 10 日、福岡市
12. Malik Suliman, 伊藤潔, 他 6 名: Expression, purification, and crystallization of bacterial oligopeptidase B、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 24 日、京都市
13. 大元崇裕, 伊藤潔, 他 8 名: ヒト由来ピユーロマイシン感受性アミノペプチダーゼの発現と大腸菌アミノペプチダーゼ N との比較、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 23 日、京都市他

[図書](計 3 件)

1. Kiyoshi Ito, Yoshitaka Nakajima, and Tadashi Yoshimoto, Academic Press

- Prolyl oligopeptidase in Handbook of Proteolytic Enzymes (3<sup>rd</sup> ed.) 4104 (3360-3364) (2013)
2. Yoshitaka Nakajima, Kiyoshi Ito, and Tadashi Yoshimoto, Academic Press  
Prolyl tripeptidylpeptidase in Handbook of Proteolytic Enzymes (3<sup>rd</sup> ed.) 4104 (3371-3374) (2013)
  3. Kiyoshi Ito, Yoshitaka Nakajima, and Tadashi Yoshimoto, Academic Press  
Prolyl aminopeptidase in Handbook of Proteolytic Enzymes (3<sup>rd</sup> ed.) 4104 (3438-3443) (2013)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 潔 (ITO KIYOSHI)  
九州保健福祉大学・薬・教授  
研究者番号：50201926

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者

芳本 忠 (YOSHIMOTO TADASHI)  
摂南大学・理工生命・教授  
研究者番号：60088870

中嶋 義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)  
摂南大学・理工生命・准教授  
研究者番号：80372770