

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658092

研究課題名(和文) プロ酵素の不活性状態を生み出す分子機構の解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism underlying inactivation states of proenzyme and its application for drug design

研究代表者

海老原 章郎 (Ebihara, Akio)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60415099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分解酵素は、余分な配列が付いたプロ酵素として生合成される。その余分な配列は、酵素が“暴発”しないよう不活性状態を生み出す「安全装置」である。本研究の目的は、血圧調節酵素レニンのプロ酵素に備わる安全装置の役割を解明することである。現在、酵素レニン・基質複合体の高分解能の立体構造の情報が欠落している。そこで、光架橋による強固な複合体を調製し分解能を向上することを目標とし、光反応性の非天然アミノ酸を導入した基質タンパク質の生産に挑戦、その大量調製に成功した。現時点での複合体形成効率は低いものの、今回調製した光反応性の標品は、レニンの不活性化機構の解明に効果的なツールになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In our body, protease or a proteolytic enzyme is synthesized as a proenzyme that attaches an extra-sequence compared with the mature enzyme. The extra-sequence functions as a "safety lock", which prevents an unwanted burst of enzymatic activity. The aim of this study is to clarify the role of the safety lock that works in the proenzyme of renin, a key enzyme for regulating of blood pressure in our body. To date, no high-resolution structural information is available for renin in complex with its substrate. To improve the resolution of the complex structure, we planned to prepare a tight complex by an ultraviolet-cross linking. We succeeded in preparing a substrate protein where a non-natural amino acid suitable for the cross-linking is incorporated. In addition, we detected the complex formation via cross-linking reaction. This new preparation with a non-natural and photo-reactive amino acid would be a useful tool for understanding an inactivation mechanism of renin.

研究分野：農学・農芸化学・応用生物化学

キーワード：プロレニン プロ酵素 レニン レニン・アンジオテンシン系 血圧調節 酵素化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向

プロ酵素には活性型酵素と比べて余分なポリペプチド鎖（プロセグメント）が付いている。プロセグメントは活性部位を覆い基質タンパク質の進入を阻害するため、プロ酵素は不活性となる。血圧調節プロテアーゼ・レニンのプロ酵素（プロレニン）では、タンパク質分解によるプロセグメントの除去が古典的活性化機構として知られていた。しかし2002年、Nguyenらによって、非タンパク質分解的にプロレニンを活性化する特異的受容体が報告された。現在、受容体を介した組織特異的なプロレニン活性化と高血圧や糖尿病などの病態との関係解明、そしてレニン活性を阻害する新薬剤を求め、農学、医学、薬学の枠を超え競争が激化している。

(2) 本研究計画の着想に至った経緯

研究代表者らは2003年、Nguyenらとは独立に、抗プロセグメント抗体が非タンパク質分解的にプロレニンを活性化することを報告した。活性化にはプロセグメント（43残基）の第11～15残基が重要であった。予測した立体構造モデル上でそれらの重要残基は触媒残基に隣接するが、プロセグメント自体は切断されない。その要因には、触媒残基に結合し切断を受けるレニン基質と異なり、プロセグメントでは上記の重要残基が触媒残基の立体配向にひずみを作り不活性状態を生む可能性が考えられる。そこで、レニン基質の構造と機能を研究してきた研究代表者の視点からプロレニンの不活性化機構が解明でき、創薬へ展開できると考えた。

不活性状態を生み出すプロセグメントは活性部位に結合しているが、基質とは異なり、酵素によって切断されない。プロセグメントはいわば、酵素が“暴発”しないよう不活性状態を生み出す「安全装置」である。本研究の斬新性は、安全装置によってプロ酵素が不活性となる分子機構を解明し、活性型酵素を阻害する手がかりを発見しようとする点にある。その際、プロ酵素単独の解析ではなく、プロ酵素から活性型酵素、酵素・基質複合体へ向かう分子機構を解析し、阻害剤設計の糸口を見いだす。その発想は、触媒残基周辺に特異的な基質類似物を見いだす従来の阻害剤設計とは根本的に異なっている。

2. 研究の目的

これまでに、レニン反応の解明に有用な三次元立体構造が、プロ酵素、酵素・低分子阻害剤複合体、酵素・基質複合体に対し合計65種類決定されている。しかし酵素・基質複合体は低分解能（分解能4.4Å）の構造に留まっている。そこで、反応機構の理解に必要な分解能（2Å）にて酵素・基質複合体の結晶構造を決定するため、研究代表者は、光架橋によって強固な複合体を作り分解能の向上するアイデアを着想した（図1）。

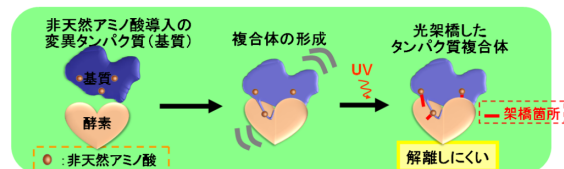


図1 光架橋による酵素・基質複合体の形成

本研究では、光架橋が可能な非天然アミノ酸の一つであるアジドチロシンをタンパク質へ部位特異的に導入する事が可能な大腸菌宿主 (Ikeda-Boku et al., *J. Biochem.* **153**, 317-326, 2013) を用いることを選択した。そして、プロレニンおよび活性型酵素の特異的基質アンジオテンシノーゲンを生産し、酵素・基質複合体の作成を検討した。

3. 研究の方法

(1) 組換え型プロレニンの生産検討

① 動物細胞による生産

先行研究 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 338-340, 1998) に基づき、動物細胞の一つである CHO 細胞を用いて組換え型ヒトプロレニン (hPRen) を生産・精製した。

② 大腸菌による生産

タンパク質の高発現を特徴とする T7 プロモーターを利用した発現プラスミド (Novagen 社) に、hPRen の cDNA を導入した。構築したプラスミドを用い、大腸菌宿主、培地、生育温度等を変数とした計 89 条件にて、hPRen を発現させた。さらに、可溶性促進タグタンパク質 SUMO (LifeSensors 社) を融合した hPRen を生産する発現プラスミドを構築し、発現条件を検索した。

得られた大腸菌から調製した細胞破砕液、上清画分、沈殿画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、含まれる全てのタンパク質を染色するクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色および、抗レニン抗体によるウェスタンブロットを行い、hPRen の発現を確認した。分子機能は、hPRen に対しトリプシン処理を行い、プロセグメントを除去して酵素レニン標品とした後、基質アンジオテンシノーゲンに対する酵素活性によって評価した。

(2) 組換え型アンジオテンシノーゲンの調製

① 動物細胞による生産

先行研究 (*Biomed. Res. Tokyo* **18**, 439-443, 1997) に基づき、動物細胞の一つである CHO 細胞を用いて組換え型ヒトアンジオテンシノーゲン (sAog) を生産・精製した。

② 大腸菌による生産

中程度のタンパク質発現を特徴とする tac プロモーターを利用した発現プラスミド (Sigma 社) に、sAog の cDNA を導入した。構築したプラスミドによって大腸菌を形質転換した。自作した通気型培養槽を用いて、

培地 0.5 L、温度 37°Cにて sAog を発現させた。回収した大腸菌を破碎した後、破碎液上清に対して、アフィニティー (Ni-NTA superflow、Qiagen 社)、陰イオン交換 (HiTrap Q HP、GE healthcare 社)、ゲルろ過 (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg、GE healthcare 社) の 3 段階にて精製を行った。

### (3) 組換え型アンジオテンシノーゲンの特性解析

#### ① 分子サイズの評価

精製した sAog をゲルろ過 (Superdex 200 10/300 GL) および光散乱 (Zetasizer Nano-ZS、Malvern 社) で測定し、分子サイズを評価した。

#### ② 構造の評価

精製した sAog に対する遠紫外の円二色性偏光 (CD) スペクトルを分散計 Jasco J-820 (日本分光) を用いて測定した。次いで、StepOnePlus リアルタイム PCR 装置 (Applied biosystems 社) を用いた示差走査蛍光定量によって、熱安定性の指標である変性中点温度 ( $T_m$ ) を求めた。

#### ③ 分子機能の評価

精製した hPRen に対しトリプシン処理を行い、プロセグメントを除去して、酵素レニン標品を得た。酵素レニン標品と精製した基質 sAog との間の反応速度論的解析を行った。

### (4) 部位特異的アジドチロシン導入アンジオテンシノーゲンの調製

本研究では、終止コドンの一つであるアンバーコドンに対して光反応性の非天然アミノ酸・アジドチロシンを導入する大腸菌利用型タンパク質発現システム (*J. Biochem.* **153**, 317-326, 2013) を用いた。5 位にアンバーコドンを配した sAog の cDNA を導入した発現プラスミドを用いて、大腸菌を形質転換した。アジドチロシンを含む培地を用いてアジドチロシン導入 sAog を発現した。回収した大腸菌を破碎した後、破碎液上清に対して、上述の 3 段階のカラムクロマトグラフィーにて精製を行った。目的タンパク質へのアジドチロシン導入は、アジド基選択的蛍光修飾により確認した。さらに、変異箇所を 80 位、83 位、128 位に変えたプラスミドを構築後、同様に発現・精製を行った。

### (5) 光架橋による酵素・基質複合体形成

リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて変異型 sAog 精製標品とレニン標品の混合液を室温で調製後、直ちに紫外線を室温で照射した (光架橋)。反応後の溶液を SDS-PAGE に供した後、抗 sAog 抗体または抗レニン抗体を一次抗体としてウェスタンブロットを行った。

### (6) レニンの立体構造のコンピューター解析

ヒトレニンのアミノ酸配列と 50%以上の相同性を持つ立体構造を、生体高分子の立体構造のデータベースである Protein Data Bank で検索し、65 種類の構造データを得た。Andreeva らは、ペプシン類酵素 (レニンと同族の酵素群) が、活性部位を覆うループ構造の N-フラップが活性部位に接近した CLOSED 構造と、離れた OPEN 構造をとることを報告した (*Protein Sci.* **10**, 2439-2450, 2001)。そこで 65 種類のレニン立体構造の C-ドメインを、Andreeva らが OPEN 構造として示しているペニシロペプシンの C-ドメインと重ね合わせた。側鎖のアミノ酸残基の立体配置に注目し、レニンの立体構造の中に OPEN 構造と CLOSED 構造があるかを探索した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸菌を用いた組換え型プロレニンの生産検討

研究代表者は、タンパク質の大量生産が可能な大腸菌を用いて、組換え型プロレニン (hPRen) を生産する条件を検索した。

① CBB 染色の結果、ほぼ全ての条件で hPRen の大部分は沈殿画分に存在した。しかし、ウェスタンブロットの結果から、上清画分にわずかだが hPRen が存在する条件があった。それらの条件の中から、レニンが分子内にジスルフィド結合 (S-S 結合) を形成することに着目し、S-S 結合形成を促進する大腸菌宿主を用い、25°C で培養するという条件を選択した。His タグアフィニティークロマトグラフィーを用い hPRen の精製を試みた結果、カラム吸着画分のみが酵素活性を示した。

② タンパク質の可溶性を向上させるため、可溶性促進タグタンパク質 SUMO を融合した。その結果、S-S 結合形成を促進する宿主を使用した場合のみ、酵素活性を確認した。本研究の結果、大腸菌宿主を用いて、適切に折りたたまれた可溶性ヒトプロレニンを生産できたと考えられる。

これまでに、大腸菌内で直接プロレニンを生産した報告はない。今後更に条件を検討し、結晶構造解析に必要な mg オーダーで hPRen を生産できる方法の確立を目指す。

#### (2) 大腸菌を用いた組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲンの調製と特性解析

研究代表者らは、大腸菌を用いて、組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲン (sAog) を生産する条件を検索した。その結果、tac プロモーターを利用した発現プラスミドを用いた時、可溶性の sAog が存在することが分かった。この結果に基づき、sAog の大量生産に着手した。

① 通気型培養槽を用いて、培地 0.5 L から得られた sAog 精製標品は SDS-PAGE で単一バンドを示し、収量は約 2 mg であった。

② ゲルろ過および光散乱、CD スペクトル、反応速度論的解析を行った結果、今回得られた精製標品は、動物細胞で生産した sAog 精製標品と同様の特性を示すことが分かった。一方、大腸菌で生産した標品は、動物細胞で生産した標品より熱安定性 ( $T_m$  値) が約 2 度低かった。以上より、大腸菌で生産した sAog は、動物細胞で生産した標品と同様に適切に折りたたまれており、結晶構造解析に十分利用可能であると考えられる。

現在、(2)の①と②を合わせた内容に関して、論文を執筆している。

### (3) アジドチロシン導入アンジオテンシノーゲンによる酵素・基質複合体形成

図 1 に示したアイデアに沿って、アジドチロシンを導入した基質アンジオテンシノーゲンと酵素レニンとの複合体を光架橋法で形成することを試みた。

① 収率向上の試行錯誤の結果、通気型培養槽を用いて、培地 0.5 L から収量約 0.5 mg にアジドチロシン導入 sAog 精製標品 (5 位にアンバーコドン導入) を得た。精製標品は、SDS-PAGE で単一バンドを示した。

② アジドチロシン特異的蛍光修飾によって、同標品へのアジドチロシン導入を確認した。また、CD スペクトルおよび熱安定性 ( $T_m$  値) を調べた結果、アジドチロシン未導入の標品 (前項(2)で調製した標品) と同様の構造特性を示した。一方、反応速度は未導入標品と比べ約半分にまで低下した。同様の方法に基づき、80 位、83 位、128 位にアンバーコドンを導入した変異型標品を調製した。

③ 光架橋後の反応液を抗 sAog 抗体と抗レニン抗体を用いたウェスタンブロットに供した。抗 sAog 抗体では、光架橋産物由来のバンドが複数存在した。一方、抗レニン抗体では、光架橋産物由来の明瞭なバンドを検出した (図 2 の\*印)。これは酵素・基質複合体であると示唆された。

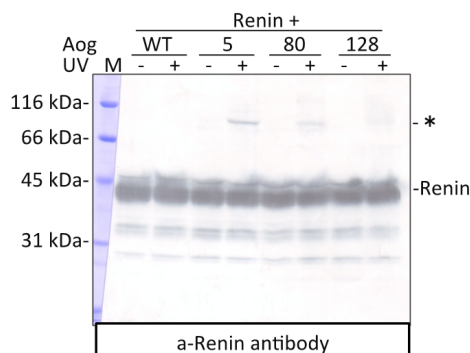


図 2 光架橋による酵素・基質複合体形成

(4) レニンの立体構造のコンピューター解析  
65 種類のレニンの立体構造を比較したところ、CLOSED 構造と OPEN 構造があることが分かった (図 3 A)。レニンは N-フラップのコンフォメーション変化を示すと推測する。今回 OPEN 構造が見られたのは pH8 で結晶化された構造であった。N-フラップの Tyr83 は pH8 付近での触媒機構に関与する (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 338-340, 1998)。N-フラップが動くとき Tyr83 が触媒残基 (Asp38, Asp219) 周辺に接近し、Trp45-Tyr83-水分子-Ser41-Asp38 の水素結合を形成する (図 3 B)。この水素結合ネットワークを通して、Asp38 の  $pK_a$  を増加させる仕組みがあると推測する。

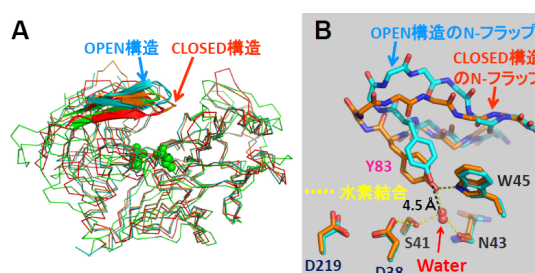


図 3 (A) レニンの構造比較。(B) レニンの構造に観察された水素結合ネットワーク。

### (5) 展望

これまでに、光架橋が可能な非天然アミノ酸を導入した基質アンジオテンシノーゲンを調製した報告はない。高分解能の酵素・基質複合体の結晶構造決定に向けて、複合体形成条件を最適化し、血圧調節酵素レニンの不活性化機構を解明する。

### 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)

[学会発表] (計 4 件)

① 海老原章郎、小林由樹、中川寅、鈴木文昭：中性で働くアスパラギン酸プロテアーゼ、酵素レニンの結晶構造群の解析：活性部位を構成するアミノ酸残基の立体配置の推定、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、京都国際会議場 (京都市・京都)。

② Akio Ebihara, Erika Abe, Ayumi Inayama, Takashi Yamaguchi, Akiyoshi Boku, Satoshi Ohno, Takashi Yokogawa, Kazuya Nishikawa, Tsutomu Nakagawa, Fumiaki Suzuki, A novel production method of recombinant sheep angiotensinogen amenable for clinical assay of plasma renin concentration. 16 June 2013, The Annual Meeting of European Society of Hypertension 2013, Milan, Italy.

③ 安部江里香、稲山亜由美、山口貴士、朴明宣、大野敏、横川隆志、西川一八、鈴木文昭、中川寅、海老原章郎：大腸菌発現系を用いたヒツジアンジオテンシノーゲンの大量生産、日本農芸化学会 2013 年度仙台大会、2013 年 3 月 27 日、東北大学川内北キャンパス（仙台市・宮城）。

④ 田村直希、中原恵子、朴明宣、大野敏、横川隆志、西川一八、鈴木文昭、中川寅、海老原章郎：ジスルフィド結合形成に着目した大腸菌を用いたヒトプロレニンの生産と特性解析、2012 年 5 月 26 日、第 76 回日本生化学会中部支部例会、自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター（岡崎市・愛知）。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海老原 章郎 (EBIHARA, Akio)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60415099

### (2) 研究分担者

該当者なし

### (3) 連携研究者

大野 敏 (OHNO, Satoshi)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：10345796

鎌足 雄司 (KAMATARI, Yuji O.)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：70342772