

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790057

研究課題名(和文) X線結晶解析法及びX線溶液散乱法を用いた難分解性動物タンパク質分解機構の解明

研究課題名(英文) Structure determination and Characterization of proline-specific aminopeptidases

研究代表者

中野 博明(Nakano, Hiroaki)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：10378789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、地球温暖化の主原因となっている二酸化炭素排出量の削減のために、現在は焼却処分されているコラーゲンなどの難分解性動物タンパク質を分解する特殊なタンパク質群の立体構造を、X線結晶構造解析法を用いて原子レベルで詳細に明らかにし、難分解性動物タンパク質の分解機構を解明するものであり、3種類のコラーゲンを分解するタンパク質の立体構造を高分解能で決定するとともに、SAXS解析から溶液中での挙動についても解明することができた。また、研究の過程で新たに1種類新規のコラーゲン分解酵素を発見した。

研究成果の概要(英文)：Proline-specific aminopeptidases are critical to the degradation of proline-rich peptides and proteins, such as collagen and its denatured form, gelatin. Collagens are the largest components in animal tissues and the most major hard-to-degrade proteins because of their unique fibrils composed of triple helical wound polypeptides. In this study, we crystallized three of the recombinant enzymes (Pz-A, Pz-B, and AM-1), and performed its preliminary X-ray crystallographic analysis. We have determined the entire structure of these aminopeptidases, found a very unique apical domain sharing the interface with a domain containing a main active site and described about the characteristic structure and mechanism for the substrate recognition for proly peptides.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：X線結晶解析 X線溶液散乱 宇宙実験 タンパク質 コラーゲン 基質認識

## 1. 研究開始当初の背景

難分解性動物タンパク質は、動物組織の全タンパク質のうち30%以上を占める。これらは食品加工産業などから産業廃棄物として大量に排出され、日本国内だけでも年間200万トンにも達する。しかし、(1)難分解性であること、(2)そのままでは付加価値のある再利用先の展開がないこと、の二点の理由から、その大部分が焼却処分されているのが現状である。これによる大気中への二酸化炭素の排出量は非常に多く、地球温暖化の一因ともなっている。そのため、難分解性動物タンパク質を焼却処分以外の方法で処分、再利用する方法を考案することは緊急の課題である。

難分解性動物タンパク質およびその分解物は、細胞発生・接着・保護、ガン浸潤、-アミロイド形成などに関わる生体機能分子として、生体内で重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。このように、再生利用の価値が高いことが認知されているにもかかわらず、これまで分解が困難であり分解生成物の調製が難しいことなどの理由から難分解性動物タンパク質の再生利用につながる研究は行われてこなかった。研究代表者は、京都府立大学のグループと共に、独自に単離した新規好熱性細菌を用いて、代表的な難分解性動物タンパク質であるコラーゲンの分解に成功した。本研究課題では、難分解性動物タンパク質を焼却処分するために必然的に排出される二酸化炭素を減少させなければならない、という問題に対する革新的な対応策を提案するものである。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、地球温暖化の主原因となっている二酸化炭素排出量の削減のために、現在は焼却処分されているコラーゲンなどの難分解性動物タンパク質を分解するための革新的な技術を開発することを目的とする。ある種の微生物がコラーゲンモデルペプチドを効率的に分解することに着目し、これらの微生物がもつ特殊なタンパク質群の立体構造を、X線結晶構造解析法を用いて原子レベルで詳細に明らかにすることにより難分解性動物タンパク質の分解機構を解明する。これを解明することにより、各種廃棄物に含まれる難分解性動物タンパク質を焼却することなく分解、再利用することが可能になる。すなわち、難分解性動物タンパク質を焼却することなく分解、さらに再利用する「リサイクル・バイオテクノロジー」を開発する。

## 3. 研究の方法

本研究課題の目的は難分解性動物タンパク

質を効率的に分解する酵素の詳細な立体構造情報から、難分解性動物タンパク質を効率的に分解するための鍵となる構造的基盤を明らかにすることである。これまでに、コラーゲン・ケラチン等難分解性動物タンパク質を分解する酵素を、独自に単離した *Geobacillus collagenovorans* M0-1 株、*Aneurinibacillus* 属細菌 AM-1 株及び *Meiothermus* 属細菌 H328 株の3つの微生物から発見した。まず M0-1 株は、他の真正細菌には見られないコラーゲン分解性プロテアーゼと、コラーゲンが繰り返しもつ特異配列 (Gly-Pro-X) を認識して開裂させる2つの異なる Pz ペプチダーゼを生産する (Pz ペプチダーゼ A 及び B)。これらの酵素学的性質、反応特性、遺伝子構造等については研究協力者らにより詳細に検討され、コラーゲン分解に応用可能であることを示された。次に、AM-1 株は、難分解性動物タンパク質に多く含まれるプロリン残基に対し特異的に強いアミノペプチダーゼ活性を示す酵素タンパク質をもつことが示されている (プロリルアミノペプチダーゼ)。本酵素は、共同研究者らが至適培養条件、酵素反応特性などを明らかにし、コラーゲン分解に寄与する有用性を示している。さらに、H328 株に対しては、実際にトリ羽毛を分解し液化させるタンパク質が存在することを発見した。これを利用して、強力分解反応システムを考案しこれまで報告されている分解例の10倍以上の速度でトリ羽毛が分解されることを明らかにしている。

そこで、本研究においてはこれらのタンパク質群の詳細な立体構造情報を得ることにより、コラーゲンをはじめとした難分解性タンパク質の分解機構を明らかにするために、以下の方法を用いることとした。

### (1) PzA、PzB 並びに AM-1 の X 線結晶構造解析

#### 結晶性の改善

原子レベルでの反応機構を明らかにするためには分解能が高い立体構造を取得する必要がある。そのために塩の種類の変更、結晶化条件のさらなる最適化を行う。また、タンパク質構造補強のため、基質あるいはアナログなどの添加を試みる。結晶化は基本的には蒸気拡散法で行うが、カウンターディフュージョン法、あるいは宇宙での結晶化を積極的に利用する。

#### 構造決定とモデルの精密化

フーリエ解析によって電子密度図を描き、立体構造モデルを構築する。その後、得られたモデルの精密化を行う。次いで、基質複合体の電子密度から、基質結合部位を決定する。

#### 基質複合体の立体構造解析

基質複合体の構造解析を行う。また、AM-1

の2つのドメインを別々に発現させたタンパク質を作成し、それぞれのドメインの機能が本当に現在考えているもので正しいのかどうかを検証する。この別々に発現させたタンパク質は、表面プラズモン共鳴をはじめとする各種相互作用実験に用いる。

#### (2)立体構造に基づいた基質認識部位の同定

基質認識に関わると考えられる残基を変異させたタンパク質の作成

基質あるいは基質アナログとの複合体の立体構造に基づいて、基質との相互作用部位や反応機構に関わると推定されるアミノ酸残基を変異させた変異体を作成した。これにより基質認識部位を明らかにするとともに、アミノ酸変異により活性がどのように変化するかを解析を行った。

#### 変異体タンパク質の立体構造決定

上記で作成したさまざまな変異体について活性を精査し、必要なものについてはX線結晶構造解析を行った。この際、立体構造が変化している可能性があるため、必要に応じMAD法で用いるためのセレノメチオニン置換タンパク質の結晶も同時に作成し、効率的に位相決定から立体構造決定にすすめることができた。

#### (3)X線小角散乱実験による基質認識機構の解明

KEK PF BL-10C ビームラインを用いたSAXS実験とその結果の解釈

AM-1の2つのドメインは、一方はペプチダーゼドメイン、もう一方はペプチダーゼ活性をassociateするドメインだと推定している。そこで、基質アナログ存在下と非存在下における、X線溶液散乱実験の結果から、基質の有無によるドメインのオリエンテーションの変化を観測した。

PzBについては、SDS-PAGEではモノマーの位置にバンドが出るが、ゲルろ過では三量体の位置にピークが現れる。PzB結晶を用いた予備的回折実験の結果では、空間群はP3121あるいはP3221のどちらかである。しかしVM値からの推定では非対称最小単位に一分子と考えられ、三量体というゲルろ過の結果と矛盾すると考えられる結果が得られた。溶液中では実際にはどのような状態で存在するのか、など興味は尽きない。そこでX線小角散乱実験により、一般的に求められる静的な構造のみならずPzB自身のダイナミックな動き、具体的にいえば、基質導入後に生じる速度論的な変化を明らかにする。さらに、基質の存在および非存在によりどのような構造変化が起きるのかについて観測を行った。

## 4. 研究成果

京都府立大学のグループと共同で単離した、*Geobacillus collagenovorans* MO-1株から2種類(Pz-A、Pz-B)、*Aneurinibacillus* 属細菌 AM-1 株から1種類(AM-1)の計3種類の、難分解性動物タンパク質分解酵素について、結晶が得られ、それぞれ2付近の分解能のX線回折強度データが得られていたが、今回、宇宙航空研究開発機構(JAXA)と共同で、国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」でのタンパク質結晶化実験を実施したところ、3種類すべてのタンパク質において非常に良質の結晶が得られた。

これらをSPring-8 BL44XU 大阪大学蛋白質研究所超分子構造解析ビームラインにおいて、X線回折データ測定を行ったところ、Pz-A及びPz-Bでは1.5、AM-1では1.3

と従来に比較し、格段に良質のデータが得られた。そのデータを解析した結果、タンパク質Pz-B結晶について地上実験では、2.0Å分解能が最高分解能であり、阻害剤近辺が見えていなかったが、それらの残基の側鎖について、宇宙実験で得られたデータ(1.6)から、コンホメーションの確認ができた。また、酵素AM-1について阻害剤との複合体で、1.38分解能のデータセットを取得した。このことにより、阻害剤がAM-1を阻害する機構について原子レベルで明らかにすることができた。このように、従来温度因子が高く見えていなかったループの領域等についても詳細な立体構造データを取得することができ、基質認識機構について新たな知見が得られた。

概ね順調に研究は進捗し、基質阻害剤については2種類新しいものが発見出来、現在結晶化をすすめているところである。ソーキング法での複合体形成を試みたが、結晶が破壊されるため共結晶化実験をすすめているが、上記結果から新しい結合様式のもの解析できることが期待される。

以上述べたようにほぼ順調に研究は進捗しているが、本研究を進めるなかで、新たに1種類のジペプチドのみを分解するペプチダーゼを4種類目のタンパク質として単離することに成功し、現在のところ正式には命名していないが、便宜上r-Dipタンパク質と呼称している。これについても、結晶化ロボットを用いて網羅的な結晶化実験に供した結果、微小ながら結晶が得られており、現在結晶化条件の最適化をすすめているところである。

## 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)

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Pz peptidase B from *Geobacillus collagenovorans* MO-1: Nakano, H., Hosokawa, A., Tagawa, R., Inaka, K., Ohta, K., Nakatsu, T., Kato, H., Watanabe, K., *Acta Crystallographica*, F68, 757–759 (2012)  
DOI: 10.1107/S1744309112018969  
査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

日本農芸化学会 2014 年度大会(2014 年 3 月 27 日～30 日) 明治大学 生田キャンパス(神奈川県川崎市)  
既存プロリダーゼとは異なる Gly-Pro 分解性システインペプチダーゼの生化学的解析と結晶化  
河野 良輔、坂本 琢馬、中野 博明、渡部 邦彦

第 51 回日本生物物理学会年会(2013 年 10 月 28 日～30 日) 国立京都国際会館(京都市)  
Study of a peptidase-associated domain of an aminopeptidase from thermophilic *Aneurinibacillus* sp. AM-1  
Ryuji Tagawa, Hiroaki Nakano, Kunihiro Watanabe

〔図書〕(計 1 件)

タンパク質結晶の最前線 (2013) シーエムシー出版(担当部分 p.84-91)  
杉山成、高野和文、喜多俊介、前仲勝実、福原秀雄、清水義宏、禾晃和、三原恵美子、高木淳一、秋葉宏樹、津本浩平、原利明、山口宏、吉川洋史、丸山美帆子、中野博明、渡部邦彦、松森信明、村上聡、名倉淑子、小笠原諭、田辺幹雄、橘勝、小島謙一、西澤典彦、松村浩由、塚本勝男、馬場清喜、熊坂崇、水野伸宏、溝端栄一、鈴木守、南後恵理子、田中里枝、井上豪、岩田想、濡木理、玉田太郎、川口充康、長野哲雄、多田幸雄、松岳大輔、中迫雅由、野村祐介、坂本泰一、川上勝、菅原道泰、国島直樹、仁田雅弘、三宅隆弘、澤匡明、安達宏昭

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 博明 (Nakano Hiroaki)  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号：10378789