

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏 名 澤野 頼子

指導教官 田之倉 優

論文題目

パイナップル (*Ananas comosus*) 由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析

プロテアーゼは、そのタンパク質分解という作用を通じて生体内の制御機能と直接関係していることが明らかになっている。一方、プロテアーゼインヒビターは生体内におけるプロテアーゼの活性調節を行う物質の一つとして重要な役割を果たしていると認識されつつある。プロメラインインヒビター (BI) はパイナップルの地下茎に存在し、共存するプロメラインを特に拮抗的に阻害するシステインプロテアーゼインヒビターである。これまでに 7 種の BI アイソフォームタンパク質 (BI-I, II, III, IV, VI, VII, および VIII) が単離されており、いずれもジスルフィド結合で架橋されたヘテロな 2 本鎖 (軽鎖: 10 または 11 残基、重鎖: 40 または 41 残基) から成り、アイソフォーム間のアミノ酸配列相関性は非常に高い。BI のアミノ酸配列およびジスルフィド結合の位置は、BI と同様なシステインプロテアーゼを阻害するシスタチンスーパーファミリー (CSF) とは相関性が低く、むしろ典型的なセリンプロテアーゼインヒビターであるダイズ由来ポーマンバーク型トリプシン・キモトリプシンインヒビター (BBI-I) のものとよく一致した。さらに、NMR により決定された BI-VI の 3 次元立体構造は、3 本のストランドから成る逆平行 β シート構造で構成されるドメインを 2 つ持ち、BBI-I と類似した立体構造を持つことが明らかとなった。よって、BI はシステインプロテアーゼインヒビターでありながら、分子進化的にはポーマ

ンパーク型ファミリーと共通の祖先を持ち、BBI-I と同様に一本鎖として発現された後、プロセッシングを受けて二本鎖構造を持つことが推測された。また、機能的にもシステインプロテアーゼのみならず、セリンプロテアーゼをも阻害することが明らかにされ、BI は全く新しいタイプのシステインプロテアーゼインヒビターであることが示唆されてきた。本研究では、BI の構造と機能の相関を解析することを目的として、BI 遺伝子をクローン化し、大腸菌における大量発現系の構築を行った。さらに組換え型 BI アイソフォームの生化学的解析からその成熟化機構を明らかにした。

1. BI 遺伝子のクローニング

BI-VI タンパク質の重鎖のアミノ酸配列を基に作製した縮重 DNA プライマーを用いて、パイナップル染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、得られた増幅断片をプローブとして、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。*EcoR* I によって消化した場合に強くハイブリダイズした 8.5 kbp の断片をパイナップルゲノミックライブラリーからブランクハイブリダイゼーションによりクローン化した。制限酵素地図の解析により、8.5 kbp の *EcoR* I 断片中で BI 配列を含むと予想された *Sph* I-*Psh*B I 約 1.2 kbp 断片について塩基配列を決定した。この断片は 246 アミノ酸残基からなる推定分子量 27520 のタンパク質をコードする 738 bp の ORF を含んでいた。この ORF は、N 末端側から推定シグナルペプチド配列に続いて、それぞれ軽鎖、重鎖の順で BI-III,-VII, および VI アイソフォームの配列をタンデムにコードしており、BI 遺伝子であると判明した。また、各アイソフォームの軽鎖と重鎖の間には 5 残基 (Thr-Ser-Ser-Ser-Asp) の、重鎖と次のアイソフォームの軽鎖との間には 19 残基のプロペプチド配列がコードされていた。したがって、BI 遺伝子は 246 アミノ酸残基から成る前駆体タンパク質として翻訳された後、シグナルペプチドが除去され、プロペプチド配列部分がプロセッシングされて各成熟型 BI アイソフォームに変換されることが示唆された。また、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションにおいては、いずれの制限酵素で消化した場合にも 1 つの断片のみにプローブが強くハイブリダイズしたことより、BI 遺伝子は染色体上に 1 コピーのみ存在していることが明らかとなり、BI-III,-VII, および VI 以外のアイソフォームは、これとは別な遺伝子にコードされているわけではなく、3 つのいずれかの BI アイソフォームの N 末端あるいは C 末端のアミノ酸残基が、それぞれアミノペプチダーゼ、あるいはカルボキシペプチダーゼの作用によって切断されて生成されることが示唆された。パイナップルにおいては、個々の BI アイソフォームを別々に発現するよりも、このように前駆体タンパク質として発現した後プロセッシングする方法

が、必要な際に効率よくインヒビターを供給できるという理由で、進化的に選択されてきたのであろうと考えられる。

2. BI 遺伝子の*E. coli*における発現、精製

明らかにした塩基配列に基づき、軽鎖と重鎖の間に 5 残基のプロ配列を含む、プロ型 BI-VI (軽鎖-プロ配列-重鎖) の*E. coli*における発現系を構築した。プロ型 BI-VI は T7 プロモータ制御下で His-tag 融合タンパク質として BL21(DE3)株にて発現させ、26.5°Cで 16 時間誘導させた場合に可溶性画分に大量に発現が認められた。菌体破碎液上清を Ni-NTA agarose、Mono Q クロマトグラフィーに供した後、プロテアーゼによる His-tag の除去、逆相 HPLC による精製を行い、SDS-PAGE 上で単一のバンドを得た。精製されたプロ型 BI-VI タンパク質は、天然型 BI-VI ($K_i = 0.23 \mu\text{M}$) よりやや弱いプロメライン阻害活性 ($K_i = 0.31 \mu\text{M}$) を示した。この結果から、パイナップル植物体内において、5 残基のプロ配列を含む 1 本鎖型 BI アイソフォームも弱いプロメライン阻害活性を示すが、標的プロテアーゼ (プロメライン) あるいはその他のプロテアーゼによってプロセシングを受け、2 本鎖型 BI アイソフォームに変換されることにより、完全な阻害活性を示すことが示唆された。また、円偏光二色性(CD)スペクトル解析、および、 ^1H - ^1H 二次元核磁気共鳴 (NMR) スペクトル解析により、プロ型 BI-VI は天然型 BI-VI と同一のフォールディングをとっていることが示された。一方、5 残基のプロ配列を含まない組換えタンパク質 (BI-VI^{LH}) は*E. coli*の不溶性画分にのみ生産され、リフォールディングによっても活性を示さなかったことより、このプロ配列は BI の正しいフォールディングを助ける役割を担っているものと考えられた。

3. プロ型 BI タンパク質の成熟化機構の解析

1本鎖のプロ型BIがどのようにプロセシングされて成熟型の2本鎖BIに変換されるかを明らかにするために、プロ型BI-VI (軽鎖C末端がArg残基) およびプロ型BI-VIのR11Q変異体 (BI-VIIと同様に軽鎖C末端がGln残基) について、プロメラインによるプロセシング部位の同定を試みた。各BIに1/20量 (モル比) のプロメラインをpH 4.5、30°Cの条件下で反応させ、DTTにより還元した後、Tricine-SDS-PAGEを行った結果、反応1時間後以降、プロセシングを受けたと思われるタンパク質のバンドが検出された。経時的に反応を行い、得られた分解断片についてN末端配列分析を行ったところ、プロメラインによって軽鎖とプロ配列の間のArg-Thr結合 (BI-VIの場合) あるいはGln-Thr結合 (R11Q変異体の場合)

が切断された後、徐々にプロ配列中のThr-Ser-Ser-Ser配列がプロセシングされていくことが明らかになった。しかし、87時間の反応後もプロ配列と重鎖N末端の間のAsp-Glu結合の切断は観察されなかった。よって、パイナップル体内において、プロ型BIアイソフォームは軽鎖とプロ配列の間をプロメラインによって、さらにプロ配列と重鎖の間を何らかの別のプロテアーゼによってプロセシングされることにより、成熟型2本鎖BIアイソフォームに変換されることが示唆された。

4. プロ型 BI-VI の立体構造解析

BI とプロテアーゼとの相互作用機構を解明することを目的として、プロ配列を含めたプロ型 BI-VI の NMR による立体構造解析を試みた。3 mM プロ型 BI-VI を用いて軽水中 (10% D₂O/90% H₂O, pH 3.9) での NOESY、DQF-COSY、および TOCSY スペクトル、および重水中 (100% D₂O, pD 3.9) での NOESY および TOCSY スペクトルを測定し、連鎖帰属および各残基の側鎖の同定を行い、全配列中で 75% の残基が帰属できた。しかし、水の影響で見えないピークが多数あり、また軽鎖と重鎖の間のプロ配列部分のアミノ酸残基のピークが重なっていたため、非標識サンプルでの完全な帰属は難しく、より精度の高い構造情報を得るためにはアミノ酸残基を ¹⁵N 標識あるいは ¹³C/¹⁵N 二重標識したタンパク質試料による NMR 測定が必要であると考えられた。そこで、標識試料を得るため M9 最少培地による発現を試みたが、プロ型 BI-VI は通常の M9 最少培地 (M9 salt、およびビタミン類、各種金属塩、各種アミノ酸混合物、窒素源として NH₄Cl、炭素源として glucose などを含む) では様々な培養条件の検討によっても発現が認められなかった。しかし、¹³C/¹⁵N 標識 C.H.L. (chlorella hydrolyzed label) 培地 (藻類加水分解物を含む培地) を用いることによって、発現に成功した。この培地により発現させ、精製した 1 mM ¹³C/¹⁵N 標識プロ型 BI-VI を用いて軽水中 (10% D₂O/90% H₂O, pH 3.9) での NMR 測定 (¹⁵N-¹H HSQC, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, および HNCO スペクトル) を行い、Sparky プログラムにより主鎖および一部側鎖 (¹H^N, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹³C^β) の帰属を行い、全配列中で 96% の残基を帰属することができた。

さらに、側鎖の帰属を進め、精密な立体構造情報を得るとともに、標的プロテアーゼ共存下での立体構造を解析することにより、その相互作用機構および阻害機構を解明することができると考えられる。さらに、ここから得られた知見により、様々なプロテアーゼに対する特異的なあるいは幅広い活性を持つなどの効果的な阻害剤の開発が期待される。