

論文の内容の要旨

論文題目 非典型的細胞内プロテアーゼの性状解析
 (Characterization of non-typical intracellular proteases)
氏名 西井 亘

1. 序

プロテアーゼ研究の歴史は古く、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼの 4 種に分類される典型的プロテアーゼについての知見は多い。しかし近年、これらとは異なる非典型的な触媒機構をもつプロテアーゼが次々と見つかり、細胞内で重要な役割を担っていることが明らかになってきた。本研究では、非典型的細胞内プロテアーゼのもつ独特な基質分解機構とその意義について検討した。

2. ATP 依存性プロテアーゼ Lon および HslVU による細胞分裂阻害蛋白質 SulA の分解機構

ATP 依存性プロテアーゼは、ATP の加水分解と共役して蛋白質を分解する酵素の総称であり、細胞内で異常蛋白質や細胞機能調節蛋白質を分解している。本研究では、その特異な基質分解機構の詳細解明を目的とし、大腸菌 ATP 依存性プロテアーゼ Lon および HslVU による細胞分裂阻害蛋白質 SulA の分解機構を *in vitro* で解析した。なお、Lon のプロテアーゼ活性中心は Ser と Lys からなるユニークなものであり、HslVU のそれは N 末端 Thr が構成している。

ATP 存在下、Lon は SulA (189 残基) の 27 ヶ所のペプチド結合を切断した。その内の 6 ヶ所、すなわち Leu67-Thr68, Leu57-Gly58, Ala80-Ser81, Leu158-Ser159, Leu73-Ser74, Leu94-Ser95 は、他よりも優先的に切断された。これらの位置は、SulA の細胞分裂阻害活性に重要な部位と極めてよく一致している。このことは、SulA の機能を迅速かつ徹底的に抑制することに大きく貢献すると考えられる。6 ヶ所の優先切断部位においては、P1 部位に Leu, P'1 部位に Ser, P2-P5 部位に Gln が 1-2 個存在しており、明らかな一次構造上のコンセンサスがみられる。このコンセンサス配列が、SulA の機能的に重要な部位を優先切断するための標識として働くとすれば非常に興味深い。

ATP 非存在下では、Lon による SulA の分解は非常に遅いが、部分的な加水分解は幾つかの部位においてみられた。この際の主要な切断部位は SulA の N, C 両末端に位置しており、

ATP 存在下の主要切断部位とは異なっている。SulA の両末端領域は細胞分裂阻害活性に不要であると報告されており、このような部位が分解されても SulA の生理機能は損なわれまいと考えられる。

Lon による SulA の分解において、反応中間産物は観察されなかった。すなわち Lon は最終的な分解産物のみ酵素外部に放出する、プロセッシブ分解を行っていると考えられ、部分的な分解産物が基質蛋白質の機能を保持していたとしても、機能が完全に失われるまでは酵素に捕捉されていることになる。

Lon による SulA 切断のアミノ酸特異性については、前述のコンセンサス配列を除けば、P1 部位が疎水性アミノ酸で占められていることが注目される。疎水性残基は通常分子の内部に埋もれていることが多いが、Lon はその様な部位を好んで切断することで、基質の構造を効果的に破壊していると考えられる。

一方、HslVU も ATP 存在下で SulA をプロセッシブ分解することが示された。分解速度は Lon のそれと比べずっと遅いが、HslVU により切断される 39 ヶ所のペプチド結合の内 7 ヶ所、すなわち Ala80-Ser81, Ala150-Ser151, Leu54-Gln55, Ile163-His164, Leu67-Thr68, Leu49-Leu50, Leu65-Trp66 は他よりも優先的に切断されることが示された。これらは Lon による優先切断部位の近傍に位置しており、やはり SulA の機能部位とよく対応している。なお、ATP 非存在下では、Lon の場合と異なり、HslVU による SulA の分解は全く観察されなかった。

HslVU による SulA 切断のアミノ酸特異性については、P1 部位に特に Leu が多くみられることが特徴である。この様な疎水性残基を好んで切断する傾向は Lon の場合と同様であるが、面白いことに SulA における両酵素の切断部位は殆ど異なっている。

以上のように、Lon および HslVU による SulA の分解機構は、分解速度や切断部位などの点では互いと異なるが、以下の重要な共通点が存在する。第一に、基質の機能的に重要な部位を優先的に切断すること、第二に基質をプロセッシブ分解すること、第三に ATP 非存在下では基質を分解しないか、しても機能が損なわれない部位に限られること、第四に疎水性残基の後で切断することである。これらは基質の機能を確実に消滅させる上で、極めて周到かつ徹底的な戦略であるといえる。

3. セリン・カルボキシシルプロテアーゼ physarolisin I, II の性状

真性粘菌は細胞分化のモデル生物として有用であり、生活環の中で様々な形態に変化する。その過程にある種の酸性プロテアーゼが関与することが示唆されている。この酵素は、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤のペプスタチンや EPNP (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane) には非感受性であり、またペプチド結合の切断特異

性も独特であるなど、非典型的な性質を多数持つ。本研究では、本酵素の分子的性状を解明することを目的として、cDNA クローニングと性状解析を行った。その結果、575 残基からなるプレプロ酵素の一次構造が推定され、最近同定された新しいプロテアーゼファミリーであるセリン-カルボキシルプロテアーゼに相同性をもつことが示された。セリン-カルボキシルプロテアーゼは、Ser, Glu, Asp からなるユニークな触媒中心をもつが、本酵素でもこれらの残基は保存されている。そこで本酵素を *physarolisin I* と命名した。*physarolisin I* は、以下のユニークな性状を持っている。第一に、ホモログ酵素が全て一本鎖構造をとるのに対し、本酵素は二本鎖構造である。両鎖の間にはホモログ酵素にはみられない挿入配列が存在し、分子の外部に突出していることがホモロジーモデリングより推定された。第二に、本酵素はアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の DAN (diazooacetyl-D,L-norleucine methyl ester) に阻害される。DAN は Ca^{2+} 結合部位を構成すると予想される Asp529 に結合することが示され、Thr531 と Lys544 の間の溝で安定化されることが予想された。第三に、相同性の最も高いヒト CLN2 と異なり tripeptidylpeptidase 活性がなく、基質特異性が独特である。

一方、データベースより、同じ真性粘菌由来の *php* 遺伝子産物が *physarolisin I* のホモログであることがわかった。*php* 遺伝子は、通常真核生物で転写される遺伝子が S 期の序盤で複製されるのに対し、S 期の終盤で複製される特異な遺伝子である。組換え型 *php* 遺伝子産物を大腸菌で大量調製し性状を解析したところ、酸性条件下で endopeptidase 活性を示した。そこで本酵素を *physarolisin II* と命名した。*physarolisin II* は以下のユニークな性状を持っている。第一に、本酵素は 16-22 °C で活性が最大となる低温適合酵素の一種である。また、活性をもつ低温では急速な自己分解がおきる。一方、37 °C では本酵素は殆ど活性をもたないが、20 °C の時と CD スペクトルに変化がない。第二に、本酵素はホモログ酵素のフォールディングに必須であるプロペプチドを欠いている。第三に、本酵素は蛋白性基質を分解せず、ペプチド基質に対する切断特異性も *physarolisin I* 等と大きく異なっている。

以上のように、*physarolisin I* と II は、それぞれホモログ酵素とは異なる際立った特徴をもち、それらと生理機能との関連は非常に興味深い。

4. イソプレニル化蛋白質特異的プロテアーゼの性状

Ras をはじめ膜におけるシグナル伝達に関与する蛋白質には C 末端に CAAX モチーフをもつものが多く存在し、一連の翻訳後修飾を受けることが知られている。その過程を触媒する酵素の一つであるプロテアーゼは、イソプレニル化した CAAX 配列に特異的に作用する異色のプロテアーゼであり、基質蛋白質の局在や分子間相互作用に重要な役割を担っている。本研究では、このイソプレニル化蛋白質特異的プロテアーゼの性状を解明することを目的とした。まず酵素活性を測定するため、蛍光基質 Dansyl-KSKTKC(farnesyl)VIM を用

いる新規の簡便な方法を開発した。この活性測定法を用い、ウシ脳ミクロソームから酵素を 104 倍に部分精製した。部分精製酵素は、ファルネシル化された CAAX 配列に特異的であり、基質ペプチドに対する親和性は、 K_m が $1 \mu\text{M}$ と極めて高かった。また、C 末端の AAX 配列をトリペプチドとして切り離す endopeptidase 活性を示した。酵素活性は、*o*-phenanthroline および ZnCl_2 により阻害されたが、他の阻害剤による影響は殆ど受けなかった。*o*-phenanthroline は金属キレーターであり、通常メタロプロテアーゼの阻害剤としてはたらくが、本酵素はキレーター作用のない *m*-および *p*-phenanthroline でも阻害される。これらのことから、本酵素は既知のプロテアーゼファミリーには属さない新規の触媒機構をもつことが予想される。

本研究では酵素を完全精製し 1 次構造を決定するまでには到らなかったが、近年、遺伝学的手法により、*S. cerevisiae* において Ras の分解に *rce1* 遺伝子が関与することが報告された。本研究で解析したイソプレニル化蛋白質特異的プロテアーゼの実体は *rce1* 遺伝子産物であると考えられるが、その一次構造には既知のプロテアーゼとの相同性が全くなく、どのような分子機構で基質を分解するのか非常に興味深い。

5. 総括

非典型的プロテアーゼは、あらゆる生物種に普遍的に存在する典型的プロテアーゼと異なり、進化の過程で後天的に獲得したプロテアーゼであると考えられる。本研究では、細胞内における非典型的プロテアーゼの独特な性状が、高等生物の複雑な細胞機能と密接に関わることを明らかにした。