

論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 加茂 昌之

指導教員 田之倉 優

論文題目

X 線結晶構造解析による金属プロテアーゼの活性発現ならびに熱安定性獲得メカニズムの解明

序論

プロテアーゼは生体内で、発生や細胞内情報伝達、分化、物質の分解や合成などの多くの生理現象に関わっている重要なタンパク質群である。プロテアーゼは触媒残基により幾つかのグループに分けられている。そのなかで金属プロテアーゼは活性部位に金属原子を結合し、触媒反応を行う一群のプロテアーゼである。金属プロテアーゼには、生理的に重要な酵素も数多く含まれている。例えば、ガンの浸潤と転移に重要な役割を果たす MMP ファミリー (Matrix metallo protease) があげられる。金属プロテアーゼファミリーの中で、金属結合配列モチーフとして HEXXH (X は任意のアミノ酸残基) を有する一群のプロテアーゼは Zincin ファミリーと呼ばれる。このモチーフ配列の 2 残基の His は金属結合残基であり、第三番目の金属結合残基の種類によって、いくつかのサブファミリーに分けられている。本論文では ともに微生物由来の金属プロテアーゼであり 3 番目の金属結合残基が Glu である Gluzincin ファミリーの代表的な酵素であるサーモライシン (thermolysin) と 3 番目の金属結合残基が Cys であり、独自のサブファミリーを形成しているペプチドデホルミラーゼ (peptide deformylase) について耐熱性獲得のメカニズムと中性塩による高活性化のメカニズムの解明を目指して X 線結晶構造解析を行った。

1. *Thermus thermophilus* HB8 株由来 ペプチドデホルミラーゼ (*ThPDF*) の結晶構造解析

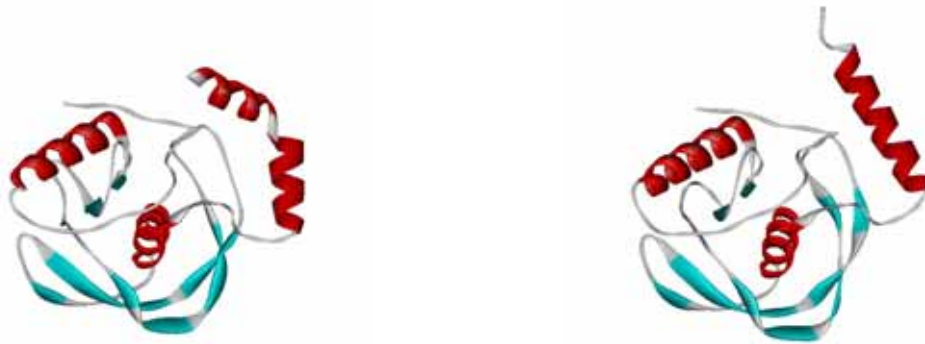
原核生物及び、真核生物の細胞内小器官におけるタンパク質合成は、真核生物の細胞質におけるタンパク質合成とは異なり、開始メチオニンのホルミル化、脱ホルミル化を含むメチオニンサイクルを経て進行する。peptide deformylase (PDF) はリボソームで新たに合成されたタンパク質のホルミルメチオニンのホルミル基を取り除く反応を触媒しており、原核生物にとっては生育に必須の酵素である。リボソームで合成されたタンパク質は、その後様々なプロセッシングを受

ける。メチオニルアミノペプチダーゼによるメチオニンの除去もプロセッシングのひとつである。しかしながら、メチオニルアミノペプチダーゼをはじめとするアミノペプチダーゼはホルミル基が付加したメチオニンを基質とすることはできない。したがって、PDF が欠損すると、ホルミル基の除去が行われず、その後のプロセッシングも正常に進行しないため、細胞は死に至る。ゲノム解析ならびに立体構造解析により、PDF ファミリーには二つのグループが分けられることが明らかとなった。一つめのグループは、大腸菌に代表されるグラム陰性菌に由来する PDF (Type I PDF) であり、もう一つのグループは枯草菌に代表されるグラム陽性菌に由来する PDF (Type II PDF) である。現在までゲノム解析が行われた真正細菌にはすべて、PDF 遺伝子が含まれている。このため、生育環境の違いとタンパク質の立体構造の特徴を比較、解析するには好適な研究対象である。超好熱古細菌には PDF 遺伝子が存在しないため、*Tth*PDF は最も高温で生育する生物種由来の PDF の一つであり、その耐熱性の発現メカニズムを解明することは、今後の新規耐熱性タンパク質の分子設計に大きく貢献することが出来ると期待される。

< 結果と考察 >

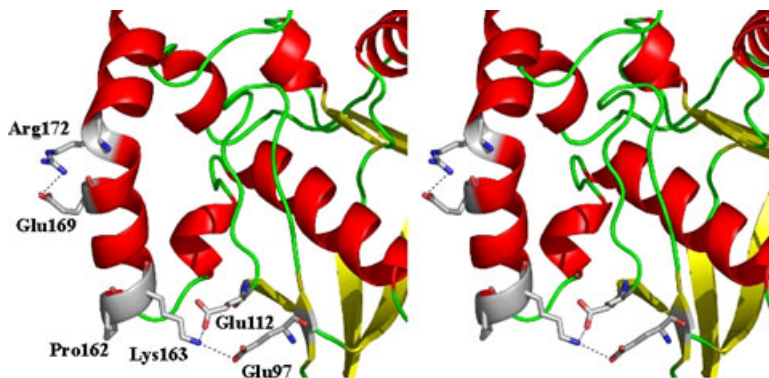
大腸菌で発現し、60 °C、10 分間の熱処理後、3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した *Tth*PDF を用い、結晶化のスクリーニングを行った。タンパク質濃度 20 mg/ml、結晶化条件は 20 % PEG 4,000, 0.2 M sodium acetate, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 で、15 °C、1 週間インキュベートすることにより、良質の結晶を得ることが出来た。放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折実験を行い、1.81 Å 分解能の回折データを得ることが出来た。空間群は $P4_3$ であり、非対称単位中に 2 分子の *Tth*PDF が含まれていた。約 40 % のアミノ酸同一性を有する *Thermotoga maritima* 由来 PDF (*Tma*PDF) の原子座標を用い、分子置換法で位相角を決定した。全体の構造は α/β 構造であり、大腸菌由来 PDF (*Eco*PDF) や *Pseudomonas aeruginosa* 由来 PDF (*Pae*PDF) と共通の特徴を有していたが、C 末端のヘリックスの構造が異なっていた。*Eco*PDF, *Pae*PDF では C 末端のヘリックスは直鎖であるが、*Tth*PDF のヘリックスは屈曲していた。また、モデルとして用いた *Tma*PDF は C 末端部位のヘリックスは揺らぎが大きく構造を決定できていない。酵素活性の温度依存性を測定すると *Eco*PDF は 60 °C 以上で顕著な熱失活を示したが、*Tth*PDF は 80 °C でも、ほぼ 100 % の活性を保持していた。*Tth*PDF の立体構造を他の常温菌由来 PDF と比較すると、溶媒露出表面積、水素結合の数には大きな変化は認められなかったが、イオン結合の数は大きく異なっており、*Tth*PDF はアミノ酸残基あたり *Eco*PDF のほぼ 2 倍のイオン結合を有していた。NMR 測定により *Eco*PDF の C 末端ヘリックスは溶液中では揺らいでおり立体構造を形成していないこと、ならびに、この C 末端ヘリックスを欠失させた変異体のほうが、より高い耐熱性を有していることが報告されている。また、トリプシン消化実験において、

EcoPDF と *ThPDF* は顕著な違いを示す。*EcoPDF* は容易に C 末端ヘリックス部位で切断されるが *ThPDF* は切断に強い抵抗性を示す。*ThPDF* の C 末端ヘリックスはコアドメインとの間でイオン結合ネットワークを形成しており、このイオン結合ネットワークにより *ThPDF* の C 末端ヘリックスが安定化され、分子全体の耐熱性の獲得に貢献していると考えられる。



ThPDF : C 末端のヘリックスが屈曲している。

EcoPDF : C 末端のヘリックスは直鎖。



ThPDF の C 末端ヘリックスはイオンペアネットワークにより安定化されている。

2 . NaCl により誘起されるサーモライシンの活性化機構の解明

サーモライシンは、*Bacillus thermoproteolyticus* が産生する金属プロテアーゼであり、酵素活性には 1 分子の亜鉛イオンを、構造の安定化のためには 4 分子のカルシウムイオンを必要とする。サーモライシンの生化学的性質ならびに酵素学的性質は詳しく調べられており、アミノ酸配列、X 線結晶構造解析による立体構造、また、反応機構についても考察が行われている。井上らの研究によりサーモライシンの活性は NaCl などの中性塩の添加により、指数関数的に増大すること、活性化には塩の選択性があり、最も顕著に活性化をおこす中性塩は NaCl であること、活性化は主に陽イオンによって引き起こされており、その活性化の順序は $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ で

あること、この活性化は分子活性 k_{cat} の増加のみに依存し、ミカエリス定数 K_m は変化しないこと、中性塩の添加は活性化のみならず、溶解度の変化も引き起こし、NaCl の添加による溶解度曲線は 2 -2.5 M を頂点としたベル型の曲線を描くこと。NaCl, NaBr の添加により、Trp 残基ならびに Tyr 残基に由来するスペクトル変化が観察され、これらの残基を含む構造変化が生じていること等が明らかとなっている。溶液中でのイオンの物理化学的性質は Hofmeister 系列 ($Li^+ > Na^+ > K^+$) に従うことが知られているが、サーモライシンの活性化はこの系列に従わない。この結果は、サーモライシンの活性化がイオン自身の性質に依存するのではなく、特定のイオンとサーモライシンの分子表面残基との間の相互作用に起因することを示唆している。これらの結果を踏まえて、申請者は NaCl 非存在下、NaCl 存在下の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、その立体構造を詳細に比較することにより、NaCl に誘起される活性化機構のメカニズムを理解することを試みた。

< 結果と考察 >

既報に従い、サーモライシンの結晶を作成し 4 M NaCl 溶液に結晶をさらしたが、溶解度ならびに浸透圧の変化等により、結晶が崩壊してしまいデータの収集には至らなかった。そこで、サーモライシン結晶を含むハンギングドロップ (0 M NaCl) 約 20 μ l で 4.8 M NaCl 溶液 100 μ l を希釈して約 4 M とし、20 で 2 日間インキュベートした後、放射光施設 SPring-8 でデータを収集した。NaCl 非存在下の構造では、活性部位に活性を担う亜鉛イオンのほかにもう一分子亜鉛イオンが存在し His231 に配位していた。また、Tyr157 の側鎖のコンホメーションが 2 種類観察された。一方のコンホメーションでは Tyr157 は Asp150 と水素結合しており、基質ならびに阻害剤の活性部位への接近を阻害しており、不活性型のコンホメーションであると考えられる。しかしながら、他方のコンホメーションでは Tyr157 の側鎖は活性部位へ配向し、活性部位への立体障害は解消され、活性型のコンホメーションであると考えられる。この Tyr157 の構造変化に伴い亜鉛イオンの配位残基である Glu166 のコンホメーションも変化していた。NaCl の添加により 2 番目の亜鉛イオンは解離して Tyr157 のコンホメーションは活性型に固定され Glu166 と水素結合を形成した。Tyr のコンホメーションが活性型に固定されることにより、基質とかさ高い Tyr の側鎖との疎水性相互作用によって遷移状態が安定化され、 k_{cat} が上昇することにより、酵素活性が増大していると考えられる。

References

Kamo, M. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of peptide deformylase from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Cryst.* (2004). D60, 1299-1300