

大腸菌由来アミノペプチダーゼ N の 結晶構造とその機能解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 小野原 侑子

アミノペプチダーゼ N (APN, EC. 3. 4. 11. 2) は菌類から哺乳類にいたるまで、自然界に幅広く分布している。ヒト体内では CD13 抗原と呼ばれ、ヒトコロナウイルス 229E の受容体や、腫瘍の湿潤・転移に関与することから興味を持たれている。哺乳類 APN は単量体の膜酵素である。活性部位に 1 個の亜鉛イオンを有する金属ペプチダーゼであり、ペプチダーゼファミリー M1 に属する。APN の特徴として非常に幅広い基質特異性を有しており、通常プロテアーゼやペプチダーゼが作用できない Pro 基質にも作用できるユニークな酵素であり、ペプチドのアミノ酸への代謝に重要な役割が考えられる。しかし、その立体構造は不明であった。

一方、生体にはもう一種ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) が存在し、2 個の亜鉛を有する金属酵素で、立体構造が明らかにされている。しかし、細胞内可溶性酵素であり、Leu など疎水性アミノ酸に作用する狭い基質特異性の酵素である。

そのため生理的に重要な APN の反応メカニズムと広い基質認識機構を明らかにするため、比較的取り扱いの容易な大腸菌のアミノペプチダーゼ N (eAPN) の X 線結晶学と酵素学的手法による研究を行った。

第一章 大腸菌由来アミノペプチダーゼ N の結晶構造

大腸菌の酵素遺伝子をクローニングし過剰発現させ、酵素を結晶化して X 線結晶構造解析で立体構造を明らかにした。

[実験方法]

eAPN 遺伝子を挿入した組換えプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、酵素を大量発現し、精製した。さらに精製酵素を用いた結晶化条件の検索を行った結果、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、1. 75M 硫酸アンモニウム、0. 1M MES 緩衝液 (pH6. 4) のリザーバ溶液を用いた 20°C の条件から、約 1 週間の静置で結晶を得た。シンクロトロン放射光を利用した X 線回折データ測定と 2 つの水銀誘導体結晶のデータ測定から、重原子同型置換法によって初期位相を決定し、結晶構造を解明した。さらに阻害剤であるベスタチン、アマスタチン、L-Leu を含む溶液にリガンドフリー型結晶をソーキングすることにより、阻害剤複合体結晶を作成し、これら複合体の結晶構造を明らかにした。さらに精製酵素を用いた eAPN の活性測定から、18 種類の異なる N 末端アミノ酸残基を持つ基質について、Lineweaver-Burk plot から速度論的パラメータを算出した。

[結果および考察]

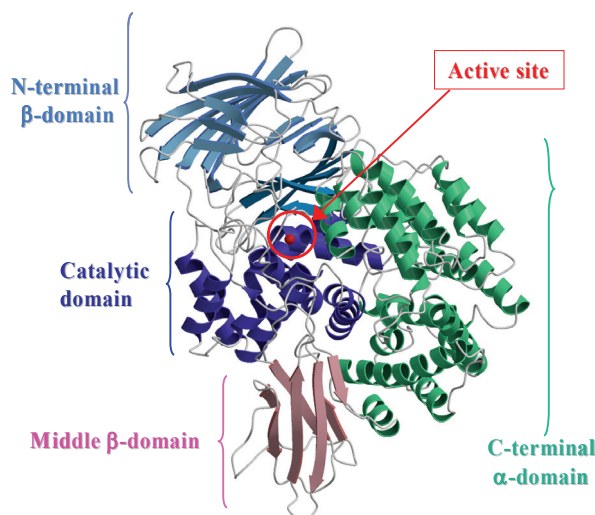


図 1 eAPN の全体構造

1. 5Å 分解能で eAPN の立体構造を明らかにすることに成功した (図 1)。eAPN は、N 末端 β ドメイン、触媒ドメイン、ミドル β ドメイン、C 末端 α ドメインの 4 つのドメインから構成されていた。eAPN の全体構造は、同じペプチダーゼファミリー M1 のロイコトリエン A4 ヒドロラーゼ (LTA4H)、トリコーンインターラクティングファクター F3 (TIF3) の全体構造とよく似ていた。特に N 末端 β ドメインと触媒ドメインの構造の類似性は顕著であり、3 酵素とも触媒ドメインは、エキソペプチダーゼであるサーモライシンの構造とよく似ていた。活性部位は、N 末端 β、触媒、C 末端 α ドメインによって形成されたタンパク質内部の大きな空洞に存在していた。eAPN のこの空洞は、C 末端ドメインの中心にある小さな穴を除いて、閉じられており、基質はこの小さな穴を通して活性部位へ侵入するのではないかと推定した。活性中心である亜鉛イオンには、触媒ドメインの His297、His301、Glu320 と 1 個の水分子 (Wat1) が配位していた (図 2)。この Wat1 が求核攻撃を行う水分子と考えられる。さらに Wat1 は Glu298 と水素結合を形成していた。この Glu298 は触媒塩基として働く。

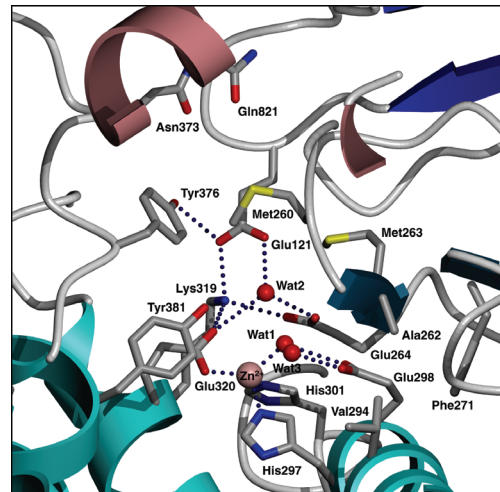


図 2 野生型 eAPN の活性部位

ベスタチン、アマスタチン、L-Leu との複合体構造において、これら N 末端アミノ基は、Glu121 と Glu264 と水素結合を形成していた。この 2 つの Glu 残基が基質の N 末端を認識し、本酵素のアミノペプチダーゼ活性に重要な残基である。eAPN は N 末端 Pro を加水分解できるものの、2 番目が Pro である X-Pro に対して活性を示さない。結晶構造から、イミノ酸である Pro の特異な構造は S1 サイト間と立体障害を生じるため適合できないことが明らかとなった。

第二章 大腸菌アミノペプチダーゼ N の幅広い基質特異性とその機構

eAPN の構造解析で、リガンドフリー型酵素と阻害剤複合体を重ね合わせた結果、活性部位を構成するほとんどの残基のコンホメーションは一致したが、唯一、Met260 のコンホメーションが大きく異なっていた。この Met260 は、活性部位の N 末端残基を収容する疎水ポケットの S1 サイトに存在する。eAPN は Met260 のコンホメーション変化を通じて、基質 N 末端側鎖に適合するように S1 サイトの大きさを変化させ、幅広く基質を認識するのではないかと推定し、Met260 に焦点を当て研究した。

[実験方法]

部位特異的変異導入は LA-PCR を用いた ODA 法によって行った。M260A 変異体を大量発現、精製し、精製酵素を用いた活性測定から、基質、阻害剤に対する速度論パラメータを算出し、野生型酵素との比較を行った。また、M260A 変異体のリガンドフリー型および L-Arg との複合体結晶を作製し、これら結晶構造を明らかにした。

[結果および考察]

速度論解析の結果、活性測定に用いた N 末端アミノ酸基質 18 種類 (Cys、Gln を除いた必須アミノ酸) のうち、eAPN は酸性アミノ酸 (Glu、Asp) を除く 16 種類の基質に対して活性を示した。特に塩基性アミノ酸を持つ基質に対して、高い活性を示した。また Leu 基質では、高い生産物阻害が生じることが判明した。

更に、野生型酵素と M260A 変異体の基質に対する速度論パラメータを比較した結果、

いくつかの基質に対して、その活性に大きな変化が見られた。最も注目すべき点は、野生型 eAPN で見られた Pro 基質に対する活性が、M260A 変異体で消失したことである。M260A 変異体の結晶構造解析の結果、260 番目の残基が Ala であることを除いて、その全体構造および活性部位構造は野生型酵素とよく一致していた。すなわち、M260A 変異体の活性の変化は Met260 側鎖の消失によって引き起こされた結果であると考えられる (図 3)。

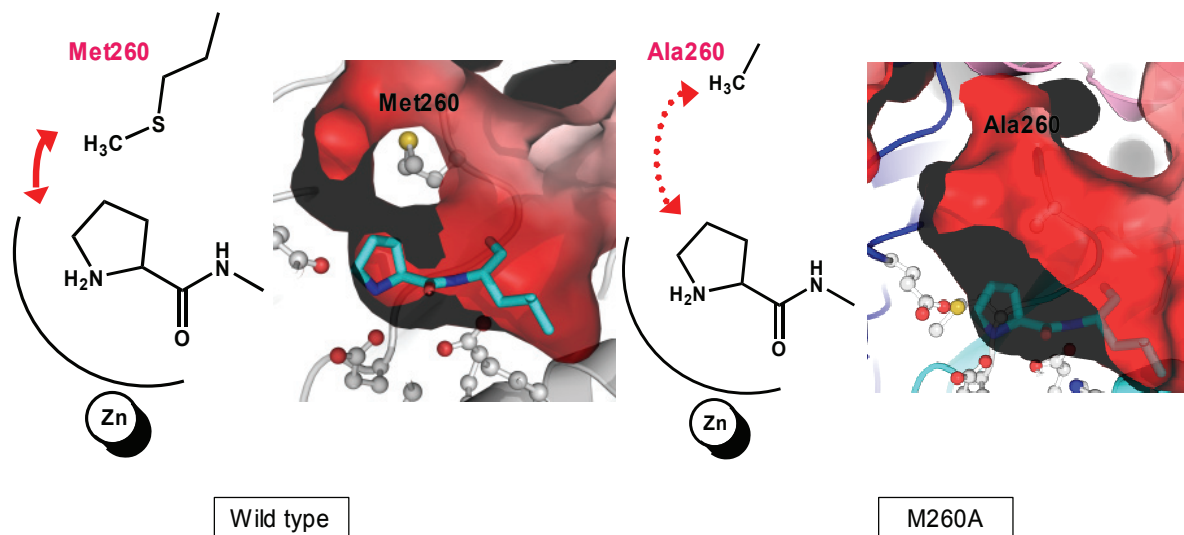


図 3 野生型酵素と M260A 変異体の S1 ポケット表面図

N 末端 Pro を持つ基質が活性部位に結合する場合、Pro の C4 位と Glu121 間に立体障害が生じると推定される。しかしながら、野生型酵素では、S1 サイトの大きさが Pro に適したサイズとなり、Pro と Met260 間の疎水性相互作用が形成され、Pro 基質を活性部位に結合することができると考えられる。M260A-L-Arg 複合体構造から、S1 サイトの大きなポケットそのものが、これら塩基性アミノ酸との高い親和性を有することが強く示唆された。このポケットに存在する Met260 が消失したことによって、L-Arg や L-Lys が活性部位に結合しやすくなり、その結果、阻害活性が上昇したと結論づけた。

[総括]

大腸菌アミノペプチダーゼ N の立体構造を初めて明らかにすることに成功した。酵素は、N 末端 β ドメイン、触媒ドメイン、ミドル β ドメイン、C 末端 α ドメインの 4 つのドメインから構成されていた。また、酵素の非常に広い基質特異性における、疎水ポケットと Met260 の役割を明らかにした。

[基礎となった学術論文]

- (1) Onohara, Y., Nakajima, Y., Ito, K., Yue, Xu., Nakashima, K., Ito, T., and Yoshimoto, T. :Crystallization and preliminary X-ray characterization of aminopeptidase N from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. F* 62,699-701 (2006).
- (2) Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., and Yoshimoto, T. : Crystal structure of aminopeptidase N (Proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli* and conformational change of Methionine 260 involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 281,33664-33676 (2006).