

歯周病菌のプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの構造と機能解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 徐 悦

歯周病は好気性あるいは嫌気性の十数種類の細菌が原因菌として知られている。これらのうち嫌気性の *Porphyromonas gingivalis* には、成人の約 40%が罹患しているといわれている。本菌はエネルギー源として糖を利用することができず、主に外界のペプチドを分解し、利用している。このため菌体外に多くの強力なプロテアーゼやペプチダーゼ群を産生する。我々は、コラーゲンが-(X-Gly-Pro)n-の繰り返し配列を持つことから、プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ(PTP)が、歯肉コラーゲンの分解に関与すると推定した。同菌はジペプチジルアミノペプチダーゼ IV(DPIV)も産生する。DPIV と PTP は、同じプロリルトリペプチダーゼファミリー(POP ファミリー)に属するセリンプロテアーゼである。DPIV は N 末端から 2 番目の残基が Pro であるペプチドに対して活性を示す。一方、PTP は N 末端から 3 番目の残基が Pro であるペプチドに対して活性を示す。DPIV は微生物から哺乳類まで、様々な生物に存在する。特にヒトを含めた哺乳類において、T 細胞の活性化やケモカインのような生理活性ペプチドの分解などの役割を担うことが知られている。またインスリンの生合成や分泌を刺激するグルカゴン様ペプチド I の不活性化に関与している。しかしながら PTP は、現在のところ本菌を含めた 3 種の微生物で知られているのみである。PTP に特異的な阻害剤は、新たな歯周病治療薬となる可能性がある。PTP の立体構造を決定し、基質認識の機構を解明するため、X 線結晶学的な手法と反応速度論的解析で研究した。

第一章 プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの結晶構造

本酵素は、732 残基のサブユニットからなる二量体酵素で、N 末端部分に膜貫通領域を持つ II 型の膜結合酵素である。大腸菌を用いた大量発現系で上清画分に酵素を発現させるため、膜結合領域と考えられる N 末端 39 残基を除去した酵素をクローニングし、発現、精製に成功した。得られた精製酵素を用いて、結晶化条件の検索を行ったところ、酒石酸ナトリウムカリウムを用いた条件で結晶化に成功した。シンクロトロン放射光を用いた 2.1Å 分解能までの X 線回折強度データの収集と二種類の水銀誘導体を用いた多重重原子同型置換法から、PTP の結晶構造を決定した。PTP は図 1 のような同一サブユニットから成る二量体を形成しており、各サブユニットは β -プロペラドメイン(緑)と触媒ドメイン(赤)の二つのドメインで構成される。活性部位は各サブユニットのドメイン境界に存在する。活性部位には catalytic triad の Ser603、Asp678、His710 が存在し、触媒ドメイン上に基質 Pro 残基が結合する疎水性ポケットが存在していた。

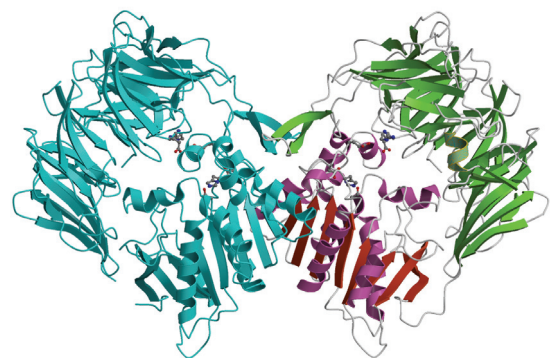


図 1. PTP の結晶構造

第二章 部位特異的変異体 (S603A) を用いた触媒機構の解明

部位特異的変異法により、活性中心の Ser603 を Ala に置換した変異体型酵素(S603A) を作製した。この S603A と基質 Gly-Ala-Pro- β -ナフチルアミド(GAP- β -NA)との複合体結晶を作製し、2.9Å 分解能で複合体構造を決定した。GAP- β -NA のペプチド部分の残余 Fourier 図を活性部位に確認することができた。基質の Pro 残基は触媒ドメイン上の疎水性ポケットに結合し、その N 末端アミノ基は β -プロペラドメインの Glu205 および触媒ドメインの Glu636 と水素結合を形成していた。(図 2)

同じ POP ファミリーに属する DPIV の立体構造は、すでにヒトおよびブタ由来酵素で報告されている。PTP は、DPIV と同様の二量体を形成し、そのサブユニット構造もよく似ていた。特に両者の触媒ドメインの構造はよく一致していた。PTP とブタ由来 DPIV(PDB ID: 1ORW)間でその相当する残基の C α 位置を最小二乗法によって重ね合わせ、これらの活性部位を比較した。活性中心である Ser603, Asp678, His710 の位置は、DPIV の対応する残基(Ser630*, Asp708*, His740*)とよく一致していた。また基質 Pro 残基を結合する疎水性ポケットを構成する触媒ドメインの残基の位置もよく一致していた。一方、活性部位の β -プロペラドメイン由来部分に明確な違いがあった。

DPIV では、基質の N 末端アミノ基は β -プロペラドメインの Glu205*, Glu206*と水素結合を形成する。この 2 つの Glu 残基を含む領域はヘリックス構造である。PTP は基質の N 末端アミノ基を Glu205 と触媒ドメインの Glu636 と水素結合で認識すると考えられる。DPIV のヘリックス構造に対応する PTP の領域は、DPIV の Glu205*に相当する残基を含めた 3 残基が欠損しており、ループ構造であった。さらにループ上の Glu205 は、Glu206*の位置から約 2.0Å 活性中心の Ser から遠い位置に存在していた。Glu636 に相当する DPIV の残基は Asp683*である。DPIV の Asp683*は Glu205*, Glu206*に覆われており、活性部位表面に露出していない。一方 PTP では、ループ構造をとり、これが活性部位から遠ざかることで、DPIV で内部に埋もれていた触媒ドメインの酸性残基を活性部位表面へと露出させた。

DPIV の活性部位には、Arg125*が存在する。しかしながら、PTP ではこれに相当する残基は存在しない。これは DPIV のプロペラブレードより、PTP の相当領域が短いからである。この結果 PTP の活性部位には、ちょうど基質 N 末端残基の側鎖の位置に、これを収めるに十分な空間(S3 ポケット)が存在する。このような β -プロペラドメインの構造の違いによって、PTP は DPIV よりさらに 1 残基長い基質を選択的に認識できると考えられる。

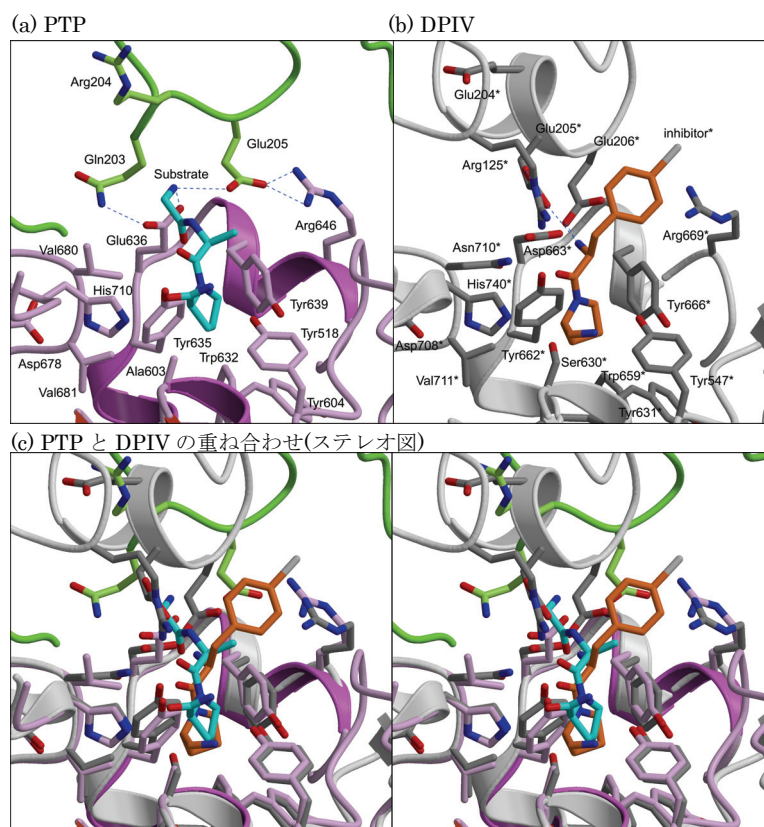


図 2. 活性部位構造

第三章 特異的阻害剤の開発と阻害剤複合体の X 線結晶構造解析

PTP の新規阻害剤として H-Ala-Ile-pyrrolidin-2-yl boronic acid (図 3) をハーレ大学の Demuth 教授との共同研究で開発した。この新規阻害剤は PTP に対して、88.1 nM と極めて低い K_i 値を示した。阻害剤を含むタンパク質溶液を用いて、野生型酵素と同条件で結晶化に成功した。X 線結晶学的手法による構造解析から活性部位に阻害剤の存在を Fourier 図で確認した。さらなる精密化から 2.2Å 分解能で複合体構造を決定した。活性中心の Ser603 と阻害剤のホウ酸基間の共有結合で活性部位に結合していた。さらに阻害剤ピロリジン環が活性部位の疎水性ポケットにしっかりと固定されていた。阻害剤の N 末端アミノ基は、S603A-基質複合体と同様に Glu205 と Glu636 と水素結合を形成していた。(図 4)

この 2 つの Glu の役割を明らかにするために、E205A、E205Q および E636A 変異体遺伝子を作成した。E205A 変異体は野生型酵素と同じ系で不溶画分に発現した。一方、E205Q 変異体は可溶画分に発現することに成功した。E205Q 変異体の PTP 活性は消失していた。E636A 変異体酵素の発現、精製に成功した。E636A 変異体の PTP 活性は k_{cat}/K_m 値で野生型酵素の 0.3% と低く、新規阻害剤の K_i 値は 48.8 μ M と野生型酵素の 554 倍高かった。E636A 変異体とその阻害剤複合体構造を 2.0Å、1.95Å 分解能で決定した。その全体構造、活性部位構造は野生型酵素とよく一致していた。ただし、E636A-阻害剤複合体では野生型酵素阻害剤複合体の Glu636 側鎖の位置に水分子が見つかり、この水分子が Glu636 に代わって阻害剤 N 末端アミノ基と水素結合を形成していた。以上から、これら 2 つの Glu が基質認識と触媒機構に重要な残基であることが判明した。

まとめ

1. 2.1Å 分解能で PTP の結晶構造を明らかにした。
2. 基質複合体、阻害剤複合体の X 線結晶構造解析から、 β -プロペラドメインの構造の違いから、DPIV と異なる基質 N 末端 3 残基の認識機構を明らかにした。
3. Glu205, Glu636 変異体の解析から、これら 2 つのグルタミン酸が基質認識と触媒機構に極めて重要であることが判明した。

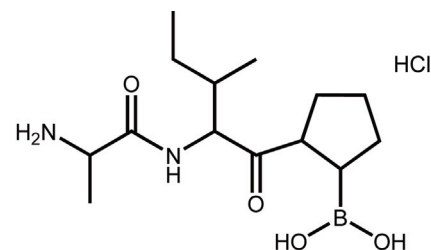
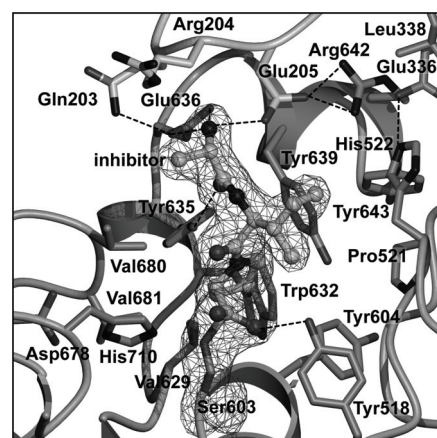


図 3. 阻害剤
(H-Ala-Ile-pyrrolidin-2-yl
boronic acid)

(a) PTP-阻害剤複合体



(b) E636A 変異体-阻害剤複合体

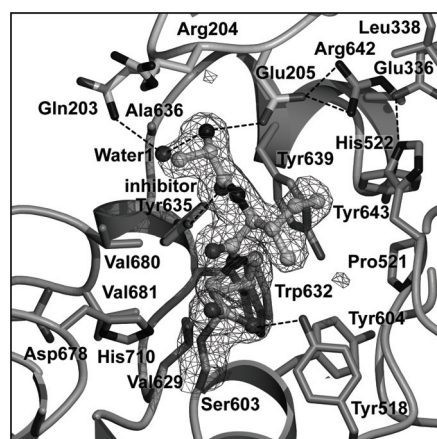


図 4. 阻害剤複合体の活性部位

- 文献
1. Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., et al. *Acta Crystallog. F*, (2005) **61**, 1046-1048
 2. Ito, K., Nakajima, Y., Xu, Y., et al. *J. Mol. Biol.* (2006) **362**, 228-240
 3. Xu, Y., Nakajima, Y., Ito, K. et al. *J. Mol. Biol.* (2008) **375**, 708-719