

Bacillus stearothermophilus GAPDHより

切り出されるACEインヒビター



研究ノート

小濱 靖 弘*

循環性レニン-アンジオテンシン系が生体の血圧調節に重要な役割を果たしており、この系を介してのアンジオテンシン変換酵素(ACE)インヒビターの降圧効果が臨床的にも評価されていることは広く知られている^{1,2)}ところが最近、この循環性の他に脳、腎、こう丸、血管壁等の組織にもレニン-アンジオテンシン系が存在し、特に本態性高血圧や高血圧慢性期における組織レニンやACE活性の上昇が高血圧の維持に大きくかかわっていることが明らかにされてきた。一方ではACEが血圧調節とは無関係な機能例えば、免疫、炎症、受精、神経伝達等にも関与している可能性が知られるようになってきた³⁾このように血圧調節のみならず新しい概念でのレニン-アンジオテンシン系が注目されており、組織選択性を示すようなACEやレニンインヒビターの開発が期待される場所である。

最近我々は、脊椎動物筋肉のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)から限定分解により切り出されたオリゴペプチドがACE阻害活性を示すことを見出した^{4,5,6)}解糖系を構成する主要な酵素の1つであるGAPDHは生物界に広く分布し、細胞内に極めて高濃度に存在しており、化学的には分子量約37000の同一サブユニット4ヶからなる4量体である。また種間でのアミノ酸配列においても高い相同性がみられ、脊椎動物GAPDH由来のACEインヒビターのアミノ酸配列(Pro-X-Y-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp)はGAPDH蛋白の補酵素NAD結合ドメインのより外側に位置するペプチドに相当し、蛇毒由来のACEインヒビターとは全く異なっていた。切

断機構には酸に不安定なAspの前後のペプチド結合が関与していた⁷⁾このようなペプチドの切り出しが生体内で実際に行なわれ、血圧調節あるいは何らかの生理的機能にかかわりあっているのかは不明であるが、GAPDHが強く発現される遺伝子であること及び理論的には切り出しできるproteaseが存在することからその可能性に興味をもたれるところである。現在、我々はこの可能性について検討するとともに、より多くの新しいACEインヒビター素材を求め微生物由来のGAPDHについても切り出しを行なっている。ここでは耐熱性で、高純度に標品が得られる*B. stearothermophilus* GAPDHからのACEインヒビターの切り出しとその特徴について述べる。

B. stearothermophilus のGAPDH (250 units/mg)、比較としてブタ筋肉およびパン酵母由来のGAPDH標品、対照として牛血清アルブミン(BSA)を、それぞれ所定時間酸による限定分解を行なった後Sep-pak C₁₈カートリッジに吸着させ、aq. CH₃CNで溶出してくるACE阻害活性を有する画分をFr. Iとした。各標品からのFr. IのACE阻害活性(hippuryl-His-Leuを基質とし、肺ACE標品を用い分光法または蛍光法⁸⁾により測定)を限定分解時間に対してプロットするとFig. 1のようになった。元の標品はいずれも100uMの濃度でもACE阻害を示さなかった。ブタFr. Iでは5分ですでに約10%のACE阻害活性がみられ、120分まで活性はほぼ一定であった。酵母Fr. Iは20分まで活性はなく、60分から活性がみられ、120分では約40%のACE阻害活性を示した。*B. stearothermophilus* のFr. Iも20分まで活性はみられなかったが、60分で66%と強い活性があらわれ120分においても同程度の活性がみられた。阻害

*小濱靖弘(Yasuhiro KOHAMA), 大阪大学薬学部, 薬学科, 助教授, 薬学博士, 微生物薬品化学

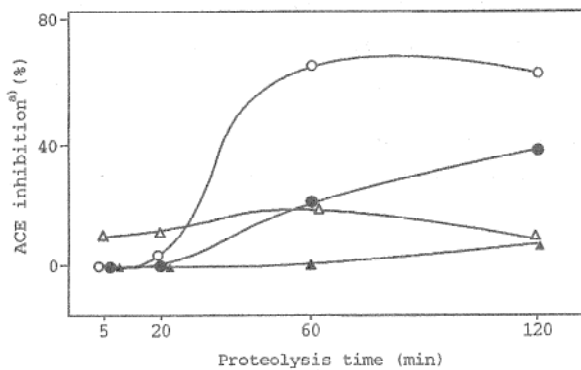


Fig. 1. ACE Inhibition by Fr. I during Proteolysis
 (○) : *B. Stearothermophilus* GAPDH,
 (●) : Yeast GAPDH,
 (△) : Porcine GAPDH, (▲) : BSA.
 a) Fr. I prepared from 6.25 nmol each of untreated proteins at the indicated times was subjected to the assay.

活性は元の標品一定量 (6.25nmol) から得られる Fr. I の濃度で検定しているの、収量と比活性を加味したいわゆる総活性を示している。従って、*B. stearothermophilus* の GAPDH から最も大量の ACE 阻害活性が切り出されてくることが認められた。そこで次にこの活性本体を Asahi-pak GS-320 や ODS を用いた HPLC で分離精製した。その結果 2 つの活性ペプチド BG-1 と BG-2 が単離されてきた。アミノ酸配列分析をおこなったところ BG-1 は Gly-Lys-Gln-Ile-Ile-Val-Lys-Ala-Glu-Arg からなるデカペプチドで、GAPDH ペプチド 68-77 に相当していた⁹⁾ $I C_{50}$ 値は $32 \mu M$ であった。一方、 $I C_{50}$ 値 $6 \mu M$ と強い活性を示す BG-2 は Gly-Lys-Met-Val-Lys-Val-Val-Ser-Trp-Tyr と同定され、GAPDH ペプチド 304-313 に相当した。BG-1 は脊椎動物由来の ACE インヒビターと同様 GAPDH 第一ドメインを形成する β - α - β パターンのより外側表面に位置する箇所から切り出されていた。¹⁰⁾ BG-2 は他の種の GAPDH 由来 ACE インヒビターとは全く異なり、GAPDH 第二ドメインを形成する逆平行 β シート部に位置し、しかも隣接するサブユニット間隙に埋れた箇所から切り出されていた。BG-2 のアミノ酸配列は脊椎動物由来の ACE インヒビター及びこれまで報告されている天然物由来のペプチド性 A

CE インヒビター (蛇毒ペプチド、カゼインペプチドなど) とはかなり異なっていた。そこで、生物学的性質を調べたところ、ほとんどの ACE インヒビターとは異なり ACE に対して非拮抗型の阻害様式を示した。さらに肺以外の組織 ACE 標品を調製し反応性をみたところ、やはりこれまでのインヒビターとは異なり BG-2 は組織選択性を有する等興味深い特徴を示すことが分かってきた。このように *B. stearothermophilus* GAPDH がユニークな ACE インヒビターのよい素材であることが認められた。

ACE は本来比較的基質特異性が広い酵素であり、アンジオテンシン I 以外に例えばブラヂキニン、エンケファリン、サブスタンス P や LH-RH を基質としたジペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性に加えトリペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性及びトリペプチジルアミノペプチダーゼ活性を示すことが知られている。¹¹⁾ これらの活性が全て生理的な反応を反映しているのかは今後の問題であるが、新しいタイプの ACE インヒビターの開発をも含め近い将来 レニン-アンジオンシン系の全貌が明らかにされることであろう。

参 考 文 献

- 1) M.A. Ondetti, and D.W. Cushman, *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 283 (1982).
- 2) M.J. Wyvratt and A.A. Patchett, *Med. Res. Rev.*, 5, 483 (1985).
- 3) M.W. Ehlers and R.F. Riordan, *Biochemistry*, 28, 5311 (1989).
- 4) Y. Kohama, S. Matsumoto, H. Oka, T. Teramoto, M. Okabe and T. Mimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332 (1988).
- 5) Y. Kohama, S. Matsumoto, H. Oka, T. Teramoto, M. Okabe and T. Mimura, *Peptide Chemistry*, 1988, 15 (1989).
- 6) Y. Kohama, H. Oka, Y. Yamamoto, T. Teramoto, M. Okabe, T. Mimura, Y. Nagase and M. Satake, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161, 456 (1989).
- 7) A.S. Inglis, *Methods in Enzymology*, Vol. 91, pp. 324-332. Academic Press, New York.

- 8) H.S. Chung and D.W. Cushman, *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 451 (1973).
- 9) P.A.M. Michels, A. Poliszczak, K.A. Osinga, O. Missel, J.V. Beeumen, R.K. Wierenga, P. Borst and F.R. Opperdoes, *EMBO J.*, 5, 1049 (1986).
- 10) G. Biesecker, J.I. Harris, J.C. Thierry, J.E. Walker and A.J. Wonacott, *Nature*, 266, 328 (1977).
- 11) R.A. Skidgel and E.G. Erdos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1025 (1985).

