



酵素の基質特異性の“なぞ”を探る

—リジン特異的プロテアーゼ—

技術解説

崎山 文夫*

プロテアーゼは、蛋白質を分解する酵素である。ほとんどの酵素は蛋白質であるから、蛋白質が蛋白質を分解するというのは、考えてみると、不思議な現象である。さらに不思議なのは、蛋白質のなかのただ一種類のアミノ酸のところだけで、ペプチド結合を加水分解できるプロテアーゼの存在である。このような単アミノ酸特異的プロテアーゼとしては数種類のものが知られているが、ここでは、リジン特異的酵素であるアクロモバクター・プロテアーゼI (API) を例に、基質特異性の“なぞ”解きの現状を解説する。

APIは、箕面の土壌から分離された *Achromobacter lyticus* がつくる分泌性の酵素で、分子量3万、リジルプロリン結合を含むリジル結合を選択的に加水分解し、ウシ膵臓トリプシンより数倍高い酵素活性を持つ。さらに、蛋白質をpH8.5-10.5で消化でき、蛋白質の変性剤であるSDSや尿素の溶液中でも活性を保てるなど、プロテアーゼとしての性質がユニークである。このようなAPIの優れた特性から、蛋白質の一次構造解析におけるペプチド鎖の断片化に適したプロテアーゼとして、今日では、トリプシン(リジンおよびアルギニン特異的)に代って広く用いられるようになっている¹⁾。

1. 一次構造情報の解析

APIの一次構造は、268個のアミノ酸残基と3本のジスルフィド結合からなる1本鎖のペプチド鎖からできている²⁾(図1)。一次構造は蛋白質の基本となる構造であるので、この情報からリジンに対する特異性に関する手がかりが得

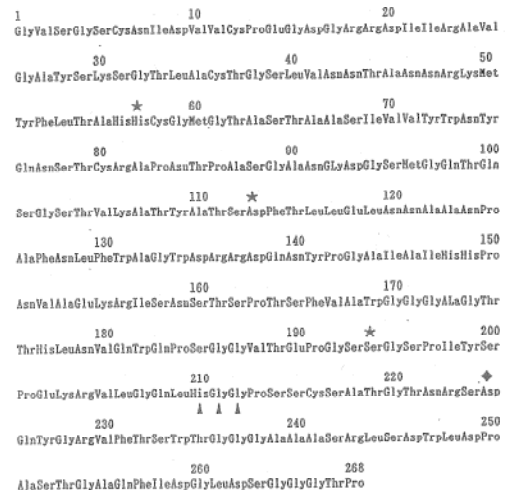


図1 アクロモバクター・プロテアーゼIの一次構造触媒部位(★)、基質特異性決定基(◆)、基質結合サブサイト(▲)を示した。

られるはずである。そのため、まず、コンピューターによる蛋白質構造データベースを検索して、類似のアミノ酸配列をもつ蛋白質を探しだす。しかし、一次構造をきめた段階でデータベースを検索したところ、類似の蛋白質は見いだせなかった。基質特異性が類似した同族のトリプシンでさえ見つからなかった。アミノ酸配列の相同性が低いためである(約16%)。結局、触媒機能の類似性と短い相同配列を手がかりにして、トリプシンの一次構造と比較し、多くの重要な知見を得ることができた。そして活性部位を構成するアミノ酸群の相同性は明確に検知でき、活性部位に関して考察することができた。一次構造情報の解析には、立体構造が分かり、構造と機能の関係の理解が進んでいる類似の蛋白質を探しだすことが、きわめて重要であることを指摘したい。トリプシンとの比較によってわかった内容を次に記そう。

a. 触媒部位

セリンプロテアーゼは、触媒作用に必須な活

* 崎山 文夫 (Fumio SAKIYAMA), 大阪大学蛋白質研究所, 化学構造部門, 蛋白質工学基礎研究センター, 教授, 理学博士, 生物化学

性セリンを持つプロテアーゼの総称である。この活性セリンは、アスパラギン酸 (Asp) - ヒスチジン (His) - セリン (Ser) という、水素結合で結ばれた3つのアミノ酸の組合せ構造に組み込まれ、触媒基 (Hisが黒幕) としてはたらいっている。APIでは194位にそのセリンがあり、触媒部位は Asp 113-His 57-Ser 194 という構成である。これらの各アミノ酸周辺の配列は他の部分に比べると相同性が高く、基質のペプチド結合のカルボニル基より生成するオキシアニオンを安定化させるメカニズムも備わっている。これらの結果から、APIは哺乳類型のセリンプロテアーゼに分類した。

b. 基質結合部位

セリンプロテアーゼでは、基質は、分解されるペプチド結合をはさんでN末端側、C末端側を合わせて数個のアミノ酸残基が結合する。これらの各残基専用の結合部位 (サブサイト) には特徴があり、なかでも、酵素の基質特異性と最も密接に関係するのは、加水分解されるペプチド結合に関与する残基が結合する S_1 部位で、トリプシンでは、基質のアルギニンやリジンの側鎖がこの S_1 部位のポケットに入り、Asp 189の負電荷とこれらのアルギニンやリジンの側鎖の正電荷との静電相互作用により結合する。つまり、トリプシンの基質特異性はこのイオン結

合によって決まる (図2)。そこで、APIについてこの重要な Asp 189に対応する酸性アミノ酸を探したが、相当する位置には見当らず、その役割を代替しそうなものとして Glu 190が見いだされた。さらに、トリプシンの S_1 部位の基質結合ポケットを構成するアミノ酸にまで範囲を広げると、Asp 225が見いだされた。この位置には側鎖がないグリシンまたは側鎖の小さいアミノ酸が存在する傾向があり、Asp 225が基質特異性の決定基である可能性が高いと判断した。

S_1 部位のポケット以外の結合サブサイトについては、トリプシンの S_1-S_3 部位の Ser 214-Trp 215-Gly 216 に対応するAPIのアミノ酸群として、2つの候補が見つかった。一つは His 210-Gly 211-Gly 212 であり、セリンプロテアーゼに共通する構成様式、すなわち3つのサブサイトを考慮したもので、他の一つは Ser 214-Ser 215 で、Ser 214の役割 (側鎖の水酸基が触媒部位の Asp 102と水素結合する) を重視したものである。これらの2つの可能性を検討するために、種々の鎖長の合成ペプチド基質を用いて加水分解の受け易さを比較したところ、前者の His 210-Gly 211-Gly 212 が基質サブサイトの P_1-P_3 部位と結合することがわかった。

2. 解析結果の確認

一次構造情報の解析によって得られた知見はあくまで推定や予想の域を出ず、それらを実験によって確認することが必要である。そのための方法として、a) 蛋白質工学の手法を使って機能への寄与が予想されたアミノ酸を適宜置換して機能の変化を検討する、b) 蛋白質の立体構造を解析する、などがある。

a) API遺伝子と大腸菌での発現

APIをコードする遺伝子は1959塩基からできており、653残基のペプチド鎖として合成される。これはさきに決定したAPIの一次構造より385残基も長い (図3)。アミノ酸配列を詳しく見ると、APIの配列は中央部分に位置し、そのN末端側およびC末端側には長いペプチド鎖の延長部分が存在する。API遺伝子ま

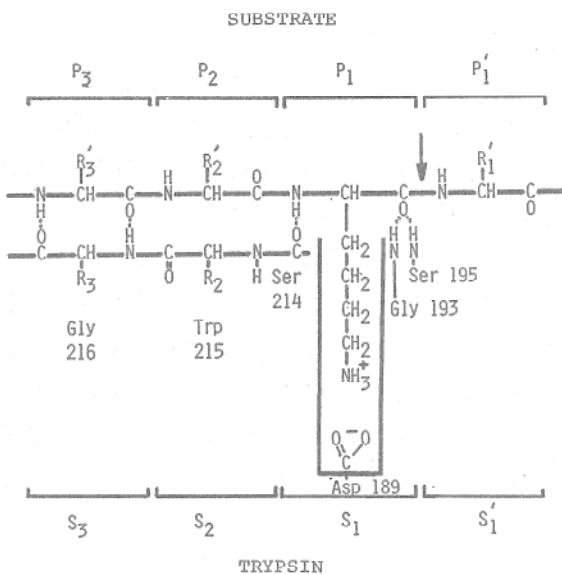


図2 トリプシンの基質結合部位と基質結合の模式図 $S_3 \sim S_1, S'_1$ は酵素側の基質結合サブサイト。これらの4部位に対応して基質側のサブサイト ($P_3 \sim P_1, P'_1$) を示した。点線は水素結合。

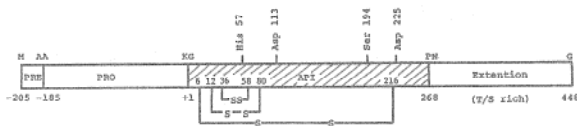


図3 API前駆体の構造
 PRE: プレペプチド(シグナルペプチド),
 PRO: プロペプチド. M: Met, A: Ala,
 K: Lys, G: Gly, P: Pro, N: Asn,
 T: Thr, S: Ser. 数字は, APIのN末端を
 起点とする残基番号.

たはC末端延長部分を欠く遺伝子をプラスミドに組み込み, 大腸菌に移入して発現させたところ, API活性がペリプラズム画分に集積した(*A. lyticus*はグラム陰性菌だが, 大腸菌はAPIを細胞外に分泌しない). C末端に180残基の延長部分をもつAPIも, 天然のAPIと同じ活性と基質特異性を持つので, この延長部分はAPIの基質特異性と関係しない³⁾.

さきに述べたように, APIがリジンに対する特異性を発揮するメカニズムは, マクロにはトリプシンと同じであるが, ミクロには違っていると推定される. そこで, 基質特異性の決定基がGlu 190かAsp 225かを調べるために, API遺伝子に人為的に変異を導入し, Glu 190をGln, Asp, Leuに, Asp 225をAsn, Glu, Leuにそれぞれ置換したAPI(268残基)を大腸

菌につくらせた. その結果, Glu 190の3つの変異体はいずれもペリプラズムに蓄積し, それらの酵素的性質は天然のAPIとほとんど同じであり, Glu 190はAPIの活性とは無関係であった. 一方, Asp 225のGlu, Asn, Leuへの置換体も同様にペリプラズムに分泌されたが, Glu置換体は天然のAPIと同じサイズだが活性が低い酵素として, また, AsnとLeuへの置換体はAPIより長いペプチド鎖をもち, しかも不活性な酵素前駆体として検出された. さらに, Asp 225をGluに置換したAPIを精製して調べたところ, 酵素活性は天然APIの約1%で, 基質結合能は2.5%に低下していた. これらの結果は, 225位がアスパラギン酸やグルタミン酸のように負電荷をもつアミノ酸であれば, APIは活性を保持できるが, 負電荷を持たないAsnやLeuでは活性をもたず, プロペプチドを脱離して活性な酵素を生成できないことを表している(API変異体が活性を持たないと, プロAPIは活性化できない). この結果から, 225位の負電荷が活性発現に必須で, APIでは, Asp 225がリジン特異性を決定すると結論した⁴⁾.

以上のように, APIとトリプシンは塩基性アミノ酸の側鎖を結合するポケットをS₁部位

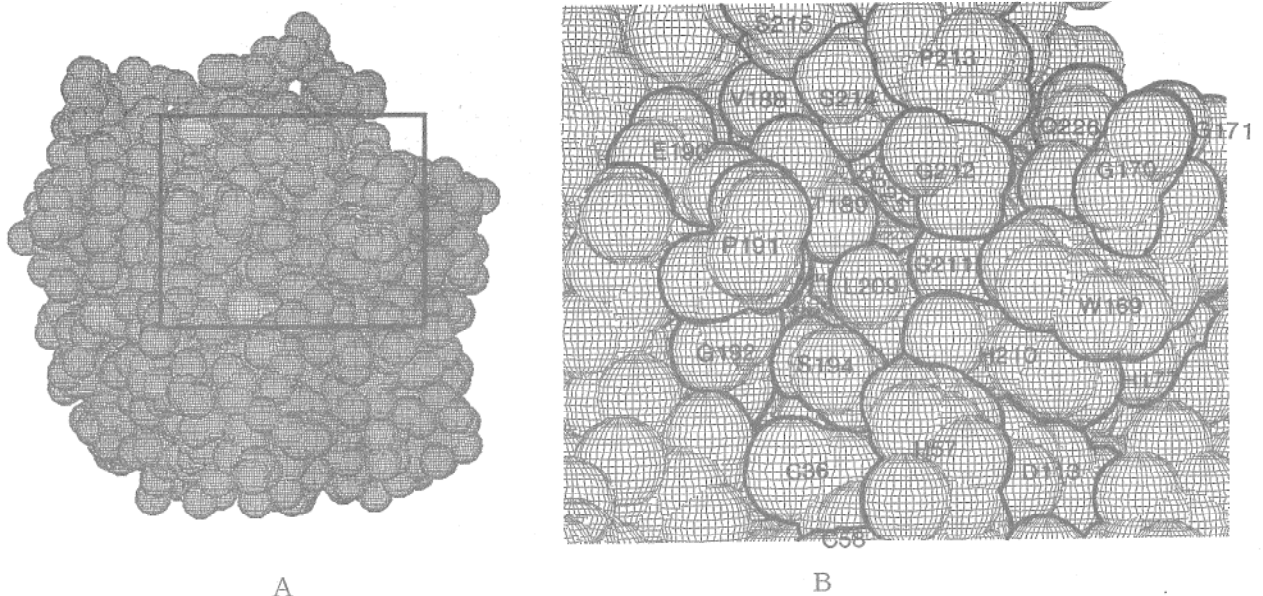


図4 APIの立体構造(A)と活性部位(枠内)の説明(B). 触媒部位(Ser 194-His 57-Asp 113)に接してS₁ポケットがあり, その奥にAsp 225(基質特異性決定基)が見える. S₁部位のHis 210はインドール環と接近して存在する.

に持ち、アスパラギン酸を特異性決定基にしているのは共通しているが、負電荷の場所は189位、225位と違っていることがわかった。そこで、APIと同じようにリジン特異性を持つ *Lysobacter enzymogenes* 由来の酵素との特異性決定基の異同に興味をもたれたので、この酵素を調べたところ、そのアミノ酸配列はAPIとまったく同じであった。すなわち、この酵素の基質特異性も Asp 225により決定されることになり、2つのポピュラーなリジン特異的酵素に関しては、特異性発現のメカニズムは同じであった。同種の他の酵素の特異性の仕組みがどうなっているのか、興味もたれる。

b) 立体構造解析で確認された Asp 225

最近行われたX線結晶解析(分解能2.2Å)によると、APIの全体的な構造はトリプシンと似ており、予想通り、触媒部位は Asp 113-His 57-Ser 194であった⁵⁾(図4)。このように、活性部位の構成は一次構造の比較によって行った予測を支持し、基質結合部位と特異性決定基についても、APIもトリプシンと同じように、S₁部位に側鎖を結合するポケットを持ち、さらに、S₂, S₃の2つのサブサイトが認められ

た。S₁-S₃部位は His 210-Gly 211-Gly 212で構成され、S₁部位のポケットには Asp 225が存在する。トリプシンに比べると、APIのポケットは浅く細めで、リジンは結合できても、少し長めで枝分かれのある側鎖のアルギニンは結合できない(図5)。結局、APIは、S₁部位の細めで浅い結合ポケットによってスリムな側鎖を選びだし、Asp 225の負電荷によってリジンのみをしっかりと結合できる仕組みらしい。これらは前述のアミノ酸置換の実験結果を支持し、Asp 225がAPIの基質特異性を決定するアミノ酸であることを表している。

3. 展 望

酵素の基質特異性の真の“なぜ”解きは、それを任意に変換できるようになったときに完了する。だが、“なぜ”解きが完了した酵素はまだない。酵素の基質特異性の変換は、基礎研究だけでなく、応用研究としても大変魅力的である。モデルがあれば、基質特異性の決定基を消去法により探索できるようになったが、それを効果的に進めるには、立体構造の知識は不可欠である。APIの謎解きも、天然の酵素の立体

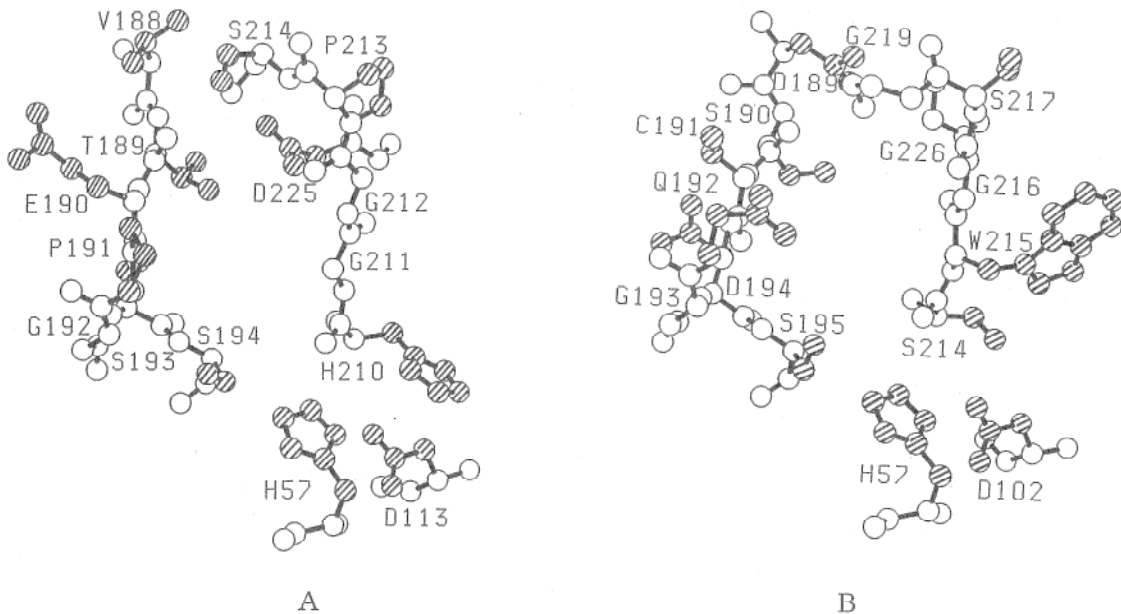


図5 API(A)とトリプシン(B)の活性部位の比較。これらの酵素の活性部位は、主鎖(○)の配置はよく似ており、側鎖(◐)の配置も触媒部位(D113-H57-S194とD102-H57-S195)はほとんど同じである。基質特異性決定基の配置がAPI(D225)とトリプシン(D189)でまったく異なっているのが特徴的である。D: Asp, H: His, S: Ser.

構造解析が終って人工変異体の立体構造解析の準備も整い、本格的な謎解きを始める準備ができた。他のセリンプロテアーゼでも、基質と酵素の静電相互作用を強めたり、弱めたりして基質特異性を広げたり⁶⁾、基質結合部位の弾力性を高めて新しい特異性を作りだした例⁷⁾がある。しかし、トリプシンの Asp 189 をリジンに変えて酸性アミノ酸特異的にする試みは成功しなかった⁸⁾。アミノ酸を一つ置換すれば基質特異性が変わると考えるのは、あまりにも単純すぎるのかも知れない。また、酵素が違えば、基質特異性の仕組みも違う可能性もある。結局、先端技術の総力を結集して酵素の個性を熟知する努力を続けながら謎解き研究を地道に行うのが、近道なのだろう。

文 献

- 1) 網沢 進, 正木武治, 広瀬正明, 副島正美, 崎山文夫: 蛋白質・核酸・酵素, 31, 629 (1986)
- 2) S. Tsunasawa, T. Masaki, M. Hirose, M. Soejima and F. Sakiyama: J. Biol. Chem., 264, 3832 (1989)
- 3) T. Ohara, K. Makino, H. Shinagawa, A. Nakata, S. Norioka and F. Sakiyama: J. Biol. Chem., 264, 20625 (1989)
- 4) S. Norioka, T. Ohara and F. Sakiyama: Abst. 4th Symp. of Protein Society (San Diego), M86 (1990)
- 5) 佐志一道, 北川康行, 松浦良樹, 勝部幸輝, 乗岡茂巳, 崎山文夫, 正木武治, 副島正美: 生化学, 62, 798 (1990)
- 6) J. A. Wells, D. B. Powers, R. R. Bott, T. P. Graycar: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1219 (1987)
- 7) R. Bone, J. L. Silen and D. A. Agard: Nature, 339, 191 (1989)
- 8) L. Graf, C. S. Craik, A. Patthy, S. Rocznik, R. J. Fletterick and W. J. Rutter: Biochemistry, 26, 2616 (1987)

