

*Streptomyces caespitosus*が 産出する蛋白質分解酵素の構造



研究ノート

原田 繁 春*

Structure of a protease produced by *Streptomyces caespitosus*

1	5	10	15
Thr-Val-Thr-Val-Thr-Tyr-Asp-Pro-Ser-Asn-Ala-Pro-Ser-Phe-Gln-			
16	20	25	30
Gln-Glu-Ile-Ala-Asn-Ala-Ala-Gln-Ile-Trp-Asn-Ser-Ser-Val-Arg-			
31	35	40	45
Asn-Val-Gln-Leu-Arg-Ala-Gly-Gly-Asn-Ala-Asp-Phe-Ser-Tyr-Tyr-			
46	50	55	60
Glu-Gly-Asn-Asp-Ser-Arg-Gly-Ser-Tyr-Ala-Gln-Thr-Asp-Gly-His-			
61	65	70	75
Gly-Arg-Gly-Tyr-Ile-Phe-Leu-Asp-Tyr-Gln-Gln-Asn-Gln-Gln-Tyr-			
76	80	85	90
Asp-Ser-Thr-Arg-Val-Thr-Ala-His-Glu-Thr-Gly-His-Val-Leu-Gly-			
91	95	100	105
Leu-Pro-Asp-His-Tyr-Gln-Gly-Pro-Cys-Ser-Glu-Leu-Met-Ser-Gly-			
106	110	115	120
Gly-Gly-Pro-Gly-Pro-Ser-Cys-Thr-Asn-Pro-Tyr-Pro-Asn-Ala-Gln-			
121	125	130	
Glu-Arg-Ser-Arg-Val-Asn-Ala-Leu-Trp-Ala-Asn-Gly			

図1 *Streptomyces caespitosus* が生産する中性プロテアーゼの一次構造

1. はじめに

Streptomyces caespitosus が菌体外に分泌する蛋白質分解酵素 (SCNP) は活性中心に亜鉛を含み, 中性 pH 付近で活性が最大になるので中性プロテアーゼとも呼ばれている^{1),2)}. 分子量

は約 15,000 と非常に小さく, これまでに一次構造や立体構造のわかっている中性プロテアーゼに比べると半分位しかない. またこれまでに発見されているプロテアーゼには見られない基質特異性を持っている. 本稿では SCNP の一次構造, 立体構造解析を含めた最近の研究について紹介する.

2. 一 次 構 造

SCNP の一次構造はトリプシン消化, 自己消化, endoproteinase Asp-N 消化で得られたペプチド断片のアミノ酸配列をエドマン分解法で



* Shigeharu HARADA
1954年3月19日生
1982年大阪大学大学院理学研究
科博士課程修了
現在, 東京大学薬学部製薬化学科,
助教授, 理学博士, 蛋白質結晶学
TEL 03-3812-2111 (内線 4843)

決め、それらをつなぎ合わせることによって決定した。自己消化で得られたペプチドのアミノ酸配列から SCNP は芳香族アミノ酸、特にチロシンのN末端側を特異的に加水分解することがわかった。図1に示すように SCNP は132個のアミノ酸から構成されており、分子内に1個のジスルフィド結合が存在している。NBRF等の蛋白質一次構造のデータベースに登録されている他のプロテアーゼと一次構造の類似性を調べたところ SCNP と類似のプロテアーゼは見いだされなかった。しかし、82番目のヒスチジンから始まる配列, His-Glu-Thr-Gly-His, はサーモリシンに代表される, 亜鉛を活性中心に持つ金属プロテアーゼの亜鉛に対する配位子の部分に共通に見られる配列, His-Glu-X-X-His (Xは任意のアミノ酸), と一致している^{3,4)}。このように全く一次構造が異なり, 分子進化上, 関連がないと思われる蛋白質の活性中心に共通のアミノ酸配列が存在していることは, 蛋白質が進化し機能を獲得していく過程を考える上で興味深い。

3. 立体構造

SCNPの立体構造を明らかにするためX線結晶構造解析を行なった。結晶はSCNPの溶液にアセトンを加え, 4℃で約3ヶ月静置することによって得られた(図2)⁵⁾。構造解析は重原

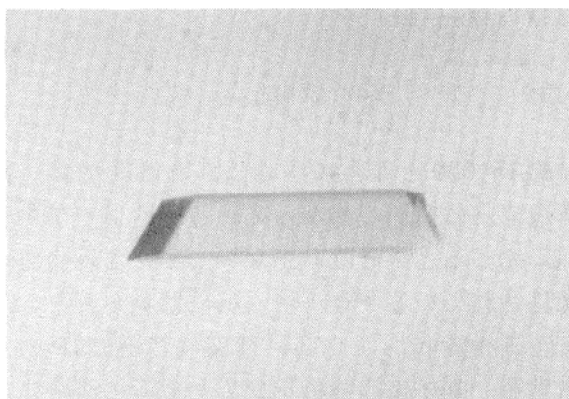


図2 SCNPの結晶

子同形置換法で行ない, 最終的に2.5Å分解能の電子密度図を得ることができた(図3)。この電子密度図と一次構造をもとにしてコンピューターグラフィックスで作成したSCNPの立体

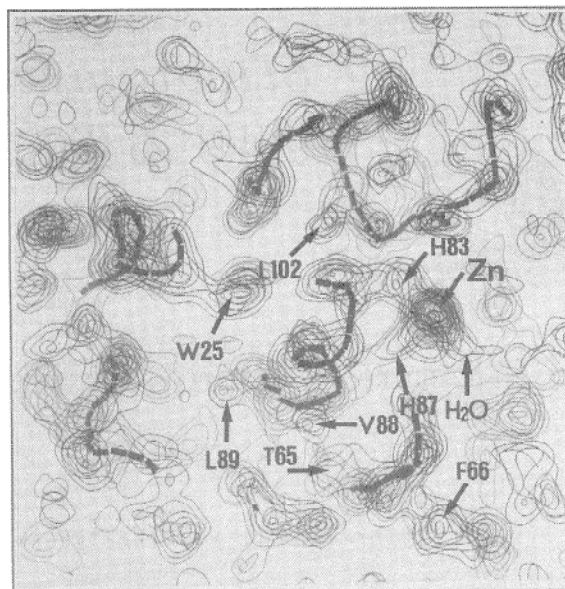


図3 活性中心に存在する亜鉛付近の電子密度図

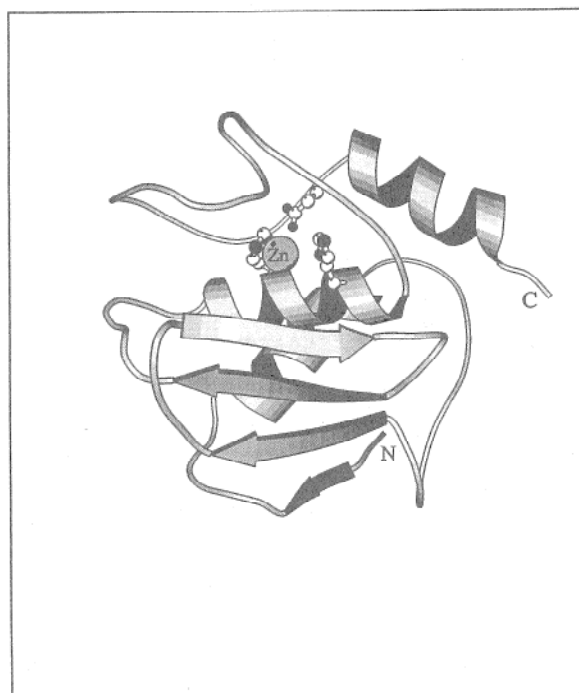


図4 SCNPの分子構造の模式図

構造の模式図を図4に示す。図3に見られるようにSCNPの活性中心に存在している亜鉛原子には, 先に述べた, His-Glu-Thr-Gly-His中の2つのヒスチジンの側鎖と水が配位している。また, 図には示されていないが Asp93の側鎖が3番目の配位子として亜鉛に配位しており, 亜鉛は4面体配位構造をとっている。これはサーモリシン等, 他の亜鉛プロテアーゼに見

られる構造上の特長と一致している。しかし、SCNPの立体構造は図4に示すように3本の α -ヘリックスと4本の β -鎖からなる β -シートからできており、他の亜鉛プロテアーゼとは異なった立体構造をとっている。

4. 酵素反応機構の解明

言うまでもなくX線結晶構造解析は結晶に波長の決まったX線を照射し、回折強度データを測定することによって立体構造を解明する方法である。しかしデータ測定には数時間から数ヶ月の時間を要するので、得られる立体構造は結晶中の分子の構造を空間的、時間的に平均した姿である。ところで、もし構造解析に必要なデータを酵素反応速度に匹敵するミリ秒程度で測定

することができたなら、酵素反応が進行するにつれて蛋白質や基質の構造が変化する様子を実際に目のあたりにすることができる。近年、シンクロトン放射光から得られる非常に強力な白色X線(単波長ではなく、いろいろな波長のX線が混じっている)の利用によってそのようなことが可能になりつつある(蛋白質の動的構造解析)⁶⁾。図5は動的構造解析を概念的に示したものである。最初にcage化合物(□で示した保護基をつけて酵素反応が進行しないようにした基質)と酵素の複合体結晶を調製する。次にレーザー光を照射すると保護基がはずれ結晶中で酵素反応が一斉に開始する。と同時にデータ測定をミリ秒オーダーで次々に行なうと酵素反応が始まってから終了するまでの様子をX線結晶構造解析法で見ることができる。筑波の高エネルギー物理学研究所放射光実験施設に設置されているラウエカメラを使って予備実験をしたところ、SCNPの場合10ミリ秒の白色X線の照射で構造解析に必要なデータを測定できることがわかった。今後、SCNPを対象とした動的構造解析に適したcage化合物の開発を行ない、SCNPの酵素反応機構の解明を進めていく予定である。

文 献

- 1) 横手保治, 川崎和徳, 中島潤一, 野口祐一, 農芸化学会誌, 43, 125(1969).
- 2) 横手保治, 野口祐一, 農芸化学会誌, 43, 132(1969).
- 3) B. L. Vallee and D. S. Auld, *Biochemistry*, 29, 5647(1990).
- 4) B. L. Vallee and D. S. Auld, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 220(1990).
- 5) S. Harada, K. Kitadokoro, T. Kinoshita, Y. Kai and N. Kasai, *J. Biochem.* 110, 46(1991).
- 6) J. Hajdu and L. N. Johnson, *Biochemistry*, 29, 1669(1990).

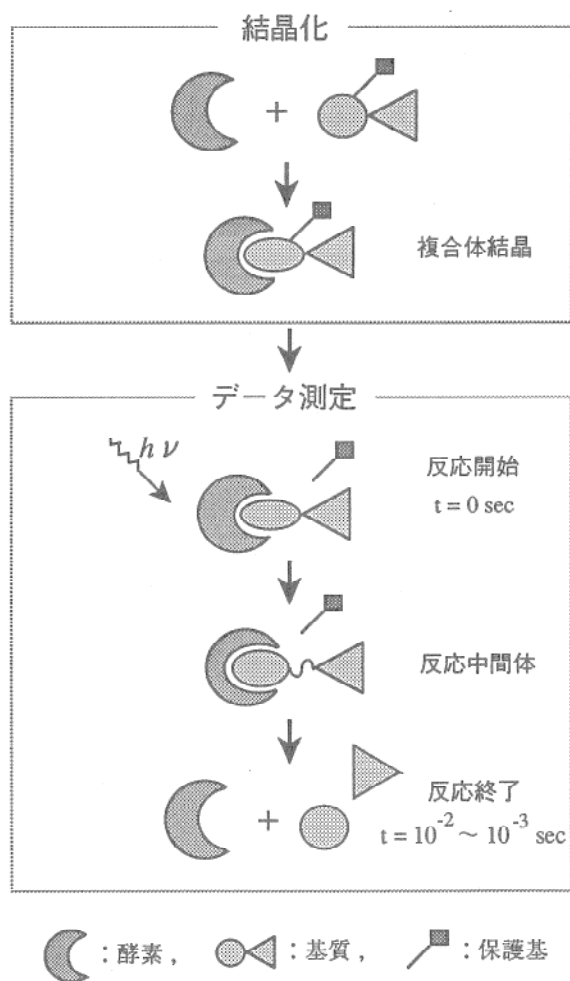


図5 動的解析のための概念図