

プロリン特異性ペプチダーゼの研究と食品加工への応用

伊藤 潔

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究の目的

タンパク質の塩酸加水分解により作られたアミノ酸混液は調味料として用いられ、多くの食品に添加され幅広く利用されてきた。しかし、塩酸加水分解物中にジクロロプロパノールやその誘導体が生じることから、最近、その人体への影響が重大な問題となってきた。これは、タンパク質原料中に存在する脂質のグリセロールが塩酸と反応し、1,3-ジクロロプロパノールや3-モノクロロプロパンジオールを生じるためである。これに対し、タンパク質分解酵素を利用すると、このような物質の生成の心配が無いため、安全な方法として注目される。食品加工へのプロテアーゼの利用は古くからあり、プロテアーゼやペプチダーゼの作用によるペプチドへの分解の基礎研究も多い。しかしながら、酵素分解では完全分解に至らない点が問題で、実用化には至っていない。これは、タンパク質の構成成分であるプロリン残基の周辺には、一般にプロテアーゼ、ペプチダーゼが作用できない(しにくい)ことによるものである。本研究は、タンパク質の酵素的完全分解システムを実用化するための基礎として、特にプロリン特異性アミノペプチダーゼに着目して、それら酵素の基質認識、及び反応機構の詳細を明らかにするものである。プロリン特異性ペプチダーゼの効果的な利用により、実用可能な酵素的タンパク質完全分解システムを構築することが可能になると期待できる。

方法

プロリン特異性アミノペプチダーゼとして、*Serratia marcescens* 由来のプロリルアミノペプチダーゼ (PAP)、*Porphyromonas gingivalis* 由来のプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ (PTP)、及び *Escherichia coli* 中で N 末端のプロリン残基遊離に関わるアミノペプチダーゼ N (APN) を用いた。PAP と APN は野生型の酵素として、PTP は N 末端の膜結合領域を欠失させた酵素 (PTP Δ 39) として、*E. coli* 中で発現させ、すべて可溶性の酵素として精製した(1-3)。精製酵素は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化した。シンクロトロン放射光を利用して X 線回折データの収集を行ない、各酵素の結晶構造を決定した(4-6)。

結果

(1) プロリルアミノペプチダーゼ: 阻害剤との複合体の結晶構造解析から、N 末端のプロリン残基を認識する疎水ポケットの存在が明らかになった。興味深いことに、基質プロリン側鎖の 4 位の位置の奥に更に空間があり、ヒドロキシル基のみならず O-アセチル基までが入ることが明らかになった。

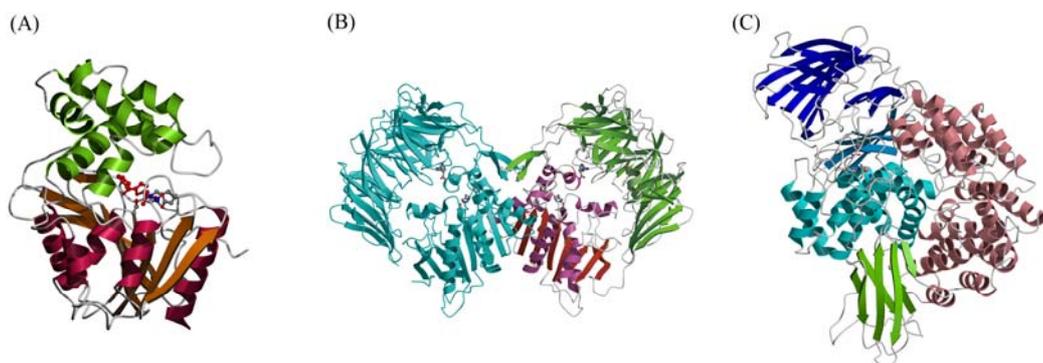
(2) プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ: プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) ファミリーで共通している β -プロペラドメインと触媒ドメインがよく保存さ

れた2量体構造をしていることがわかった。触媒ドメインの catalytic triad も POP ファミリーと同様に位置し、プロリンを認識する疎水ポケットが存在していた。PTPの活性部位周辺は、同じPOPファミリーに属し、N末端から2番目のプロリンを認識してジペプチドを遊離するジペプチジルアミノペプチダーゼIV (DPIV) より大きく開いていた。8枚の羽根からなる β -プロペラドメインの1、2枚目の羽根がゆがむことにより側面に大きな空洞ができ、基質はここから入ると考えられる。また、 β -プロペラドメインの4枚目の羽根から内部へ向うループ上にGlu205が存在し、Glu636と共に基質のN末端アミノ基とイオン結合すると考えられた。DPIVではヘリックス構造をとるこの領域が、ループとなることでDPIVよりも1残基長い基質を認識できると考えられた。

(3) アミノペプチダーゼN: アミノペプチダーゼN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る単量体構造をしていた。このうち、触媒ドメインはサーモライシンと高い相同性を示した。活性部位は酵素内部の空洞に存在しており、C末端 α -ドメインが活性部位領域を覆うように配置されていた。基質は、C末端 α -ドメインに存在していた活性部位空洞への穴を経由するか、C末端 α -ドメインが動くことによってできる、触媒ドメインとの間の経路を通して活性部位へと運ばれると考えられる。活性部位には触媒塩基であるGlu298、基質N末端認識を行なう、Glu121とGlu264、反応中間体を安定化すると考えられるTyr381が存在していた。また、リガンドフリー型と、ベスタチン複合体型・アマスタチン複合体型の活性部位残基を重ね合わせたところ、Met260側鎖の配座が変化し、これに伴い基質N末端側鎖に合わせるようにポケットの大きさが変化していた。この変化がアミノペプチダーゼNの幅広い基質特異性に寄与していると考えられた。

結論

本研究の結果、2つのプロリン特異性アミノペプチダーゼとプロリンを含む幅広い基質特異性を有するアミノペプチダーゼNの結晶構造を明らかにし、プロリン認識機構を立体構造から考察できるようになった。これらの成果は、タンパク質の酵素的完全分解を達成する上で障害となっていたプロリン残基周辺の分解を酵素的に効率的に行なうための重要な開発基盤となる。



3種類の酵素の結晶構造のリボンモデル

(A) PAP, (B) PTP, and (C) APN

文献

1. Inoue, T., Ito, K., Tosaka, T., Hatakeyama S., Tanaka, N., Nakamura, K. T., and Yoshimoto, T. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 147-154
2. Onohara, Y., Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., Nakashima, K., Ito, T., and Yoshimoto, T. (2006) *Acta Cryst.* **F62**, 699-702
3. Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., and Yoshimoto, T. (2005) *Acta Cryst.* **F61**, 1046–1048
4. Nakajima, Y., Ito, K., Sakata, M., Xu, Y., Nakashima, K., Matsubara, F., Hatakeyama, S., and Yoshimoto, T. (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 1599-1606
5. Ito, K., Nakajima, Y., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., Matsubara, F., Kabashima, T., Nakayama, K., and Yoshimoto, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, **362**, 228-240
6. Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., and Yoshimoto, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, in press