解 説

Agrochemistry and Biology Series

カルボキシルエステラーゼ研究の新しいアプローチ

塩 月 孝 博

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所

(平成7年2月20日受理)

New Approaches for Studies on Carboxylesterases

Takahiro SHIOTSUKI

Department of Insect Behavior and Physiology, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi, Tsukuba 305, Japan

はじめに

昆虫の脱皮・変態は低分子ホルモンである幼若ホルモンとエクダイソンの濃度バランスによって起こり、それら低分子ホルモンはさらにペプチドホルモン制御下にある。幼若ホルモンはセスキテルペノイドのエポキシメチルエステルで、エステラーゼとエポキシドヒドロラーゼによって分解される(図1)¹⁾。この幼若ホルモンエステラーゼ(JHE)は昆虫の脱皮後にその高い酵素活性が現れ、役目の終わった幼若ホルモンを速やかに分解するもので基質特異性が非常に高いことが知られている。カリフォルニア大学デイヴィス校昆虫学および環境毒理学科のB.D. Hammock教授らのグループでは、JHEを中心としたカルボキシルエステラーゼの研究を有機化学、生化学、分子生物学といったさまざまな角度から行なっている。まず、彼らはタバコガの一種 *Heliothis virescens* 由来のJHEをコードするcDNAの配列を決定し²⁾、さらにこれをプラスミドに組み込み、昆虫ウイルスであるバキュロウイルスの発現系を利用することで、昆虫細胞培養液中に大量のJHEタンパクの生産を可能とした³⁾。加えて、酵素活性の比較的安定なこのJHEを多種多様なカルボキシルエステラーゼのモデル酵素とし、酵素触媒反応機構やタンパク質間相互作用に関する研究も行なっている。筆者は、この研究室にポストドクとして2年間滞在したので、そのユニークな研究方法と取組み方について紹介したい。

阻害剤の検索と基質の開発

はじめに、このJHEの特異的阻害剤の合成的検索が行なわれた。エステラーゼによるエステルの加水分解では、カルボニル炭素が四面体構造の遷移状態を経ることが知られている。トリフルオロメチルケトンのカルボニル構造はトリフルオロメチル基による電子吸引的性質により、結晶状態でも四面体構造をとることがわかっており⁴⁾、酵素と結合した場合にも同様の構造が示唆されている(図2)。したがって、トリフルオロメチルケトン構造はメチルエステル分解の遷移状態アナログとなる可能性が考えられ、関連化合物が設計・合成された。最初に、幼若ホルモンと同程度の炭素鎖をもつ1,1,1-trifluoromethyl-2-tetradecanone (TFT, 図3)にJHE阻害活性が認められた⁵⁾。構造と酵素阻害活性との関係を調べると、幼若ホルモンに存在するような側鎖や二重結合はとくに必要ではなく、アルキルチオ基をもつトリフルオロメチルアセトンに高い活性が見いだされた。さらに、そのアルキル鎖の長さに最適値が存在することがわかり、3-(*n*-octylthio)-1,1,1-trifluoro-2-propanone (OTFP) がもっとも高い阻害活性を示した⁶⁾。阻害形式は、本来の基質、幼若ホルモンと拮抗するが、酵素のこの阻害剤に対する親和性がきわめて高いためにその阻害は見かけ上不可逆的であった。

JHE酵素活性は、トリチウムでラベルされた幼若ホルモンを基質とし、酵素反応停止後、イソオクタンで未反応基質を抽出することによって、水層に残ったエステル加水分解物の放射活性を液体シンチレーションカウン

図1 幼若ホルモン (JH) の酵素による分解経路

ターで測定する方法で行われてきた⁷⁾。しかし、この操作は煩雑で昆虫血液中の JHE 活性の経時変化を調べたり、酵素タンパクの精製の際のように、速やかに多くの試料の活性測定を行わなければならない場合には適さない。そこで簡便な活性測定法の開発を行なった。幼若ホルモンのメチルエステルをメチルチオエステル構造にすることにより、本来の構造をできるだけ保持したまま、加水分解で遊離する CH_3S^- の Ellman 法による比色定量を可能とした。前述のトリフルオロメチルケトン構造と阻害活性の相関研究から、直鎖カルボン酸や構造の一部にヘテロ原子をもつカルボン酸のメチルチオエステルを設計・合成した(図4)⁸⁾。幼若ホルモンとほぼ同様の長さの直鎖カルボン酸メチルチオエステル等が、JHE

により分解された。さらに阻害剤検索のときと同様に、カルボニルの β 位にアルキルチオ基をもつ酢酸メチルチオエステルが良い成績を示し、非酵素的分解が小さく、酵素の基質に対する親和性が高かった。それらのなかで methyl *n*-heptylthioacetothioate (MHTAT) が速度論的にもっとも優れた基質の性質を示した。また、この酵素反応を、0.3 ml にスケールダウンすることで、マイクロタイタープレート上で多試料 (96 サンプル、実際には3連あるいは4連で行なうので32あるいは24サンプル) を数分内に測定することが可能となった。この新規基質を用いてタバコスズメガ終齢幼虫の血液に存在する JHE 活性を経時的に測定すると、トリチウムラベル幼若ホルモン III を基質として用いた場合の結果によく一致した⁹⁾。

アフィニティークロマトグラフィーによる精製

次に、酵素の親和性がきわめて高かった OTFP の類似構造をリガンドにもつアフィニティークロマトグラフィーによる JHE の精製を行なった。セファロース樹脂の水酸基を、ジグリシジルエーテルでエポキシ活性化した後、3-(4-mercaptobutyl)-1,1,1-trifluoro-2-propanone (MBTFP, 図5) の SH 基と反応させたアフィニティーゲルをまず得た。この系は JHE に対する特異性が高く、昆虫血液中からの精製において有効であった¹⁰⁾。しかし、この場合、酵素に対する親和性がきわめて高いため溶出されにくく、もっとも阻害活性の高い OTFP によってかろうじて溶出されるものであった。しかし、得られた酵素-阻害剤複合体の酵素活性回復が容易でなかったため、酵素に対する親和性を制御したり

図2 (a) JH エステラーゼによる JH 加水分解反応機構と、(b) トリフルオロメチルケトンによる JH エステラーゼの阻害

図 3 JH III とトリフルオロメチルケトン阻害剤の構造

図 4 JH III とメチルチオエステル骨格をもつ新規合成基質の構造

図 5 アフィニティーリガンドとゲルの構造

ガンドの設計を行なった。その方法として分子全体の長さは変えず、MBTFP から フッ素が一つ少ないもの (MBFP), B構造の一部に芳香環をもつもの (MPTFP), スルフィドをメチレンに変換したもの (8-mercapto-1, 1,1-trifluoro-2-octanone, MTFO) を合成し、アフィニティーゲルをそれぞれ調製した。そのなかで、フッ素が少ない MBDFP ゲルは予想に反して MBTFP ゲルと同様に酵素に対する高い親和性を示し、芳香環をもつ MPTFP ゲルは逆に酵素を吸着しなかった。それらの中間の性質を示したのが、スルフィドをもたない MTFO ゲルであった。このゲルを用いて溶出条件を検討した結果、非イオン系界面活性剤オクチルグルコシド存在下、OTFP より炭素鎖の短い、すなわち、阻害活性が低いトリフルオロメチルケトンでの溶出が可能となり、続く透析によって界面活性剤と阻害剤を同時に除去することができ、酵素活性の回復した精製酵素が得られた¹¹⁾。得られた酵素の精製比および精製度はいずれも DEAE-イオン交換クロマトグラフィーで精製したものよりも高かった。この精製方法により、クローニングされた酵素を大量に発現した昆虫細胞培養液から、ミリグラム単位の活性をもつ精製酵素を得ることに成功した。

活性中心と糖鎖結合部位の検索

トリプシン等のセリンプロテアーゼは、Ser-His-Asp の触媒官能基系を活性中心にもつことが知られている。エステラーゼでもその活性中心にセリンを含む同様の触媒官能基系の存在が考えられていたが、明確には証明されていなかった。そこでクローニングされた酵素の活性中心を遺伝子側から検索した。H. virescens の JHE のアミノ酸配列を、セリンを活性中心にもつエステラーゼやリパーゼなどと比較すると、Ser (201), His (446), Glu (332), Asp (173), Arg (57) などの前後に類似の共通配列が認められた。これらの各残基を性質の異なる残基へ塩基置換により部位特異的変異を行ない変異型遺伝子を得、前述のパキウイルスを用いた発現系により JHE ミュータントを得た。酵素活性を比較すると、Ser (201)→Gly (201 番目のセリンをグリシンに変換したミュータントのことを示す), His (446)→Arg, Glu (332)→Gln, Asp (173)→Asn の各ミュータントの活性は検出限界以下で、Arg (57)→His ではわずかに活性が認められた¹²⁾。これらの残基は、いずれも触媒反応やタンパクの高次構造形成に関与しているものと考えられ、最近の他の研究をあわせ考えると JHE の Ser (201)-His (446)-Glu (332) がセリンプロテアーゼの Ser-His-Asp に相当するものと推測された(図 6)。次に、

図6 *H. virescens* の JH エステラーゼの活性中心にあると想定される触媒官能基系

この活性中心の重要残基に関しては、化学修飾による探索も試みた。セリン残基のほかに、トリプトファン、ヒスチジン残基を選択的に修飾する化合物群が JHE 活性を強く阻害した。デンキウナギのアセチルコリンエステラーゼの結晶構造解析から、活性中心近傍に存在するトリプトファン残基は、基質結合に関与しているものと考えられており、JHE でも同様の可能性が示唆された。また、ヒスチジン残基修飾剤による阻害は、活性中心で酵素触媒反応に同残基が関わっていることを支持するものである。

この JHE は糖鎖をもっており、分子の親水性が高いため結晶性が悪い性質をもつ。これは、たとえば、X 線解析を行なう場合の障害となるので、糖鎖を切断するか糖鎖をもたないような調製法が求められる。一方、JHE は室温でも長期間安定で、凍結-解凍の繰り返しにも酵素活性低下の程度が小さいので、前述のメチルチオエステルを基質とした比色定量法を用いることにより、ウシ粘膜アルカリフォスファターゼや西洋ワサビペルオキシダーゼのように、抗体標識酵素として利用できる可能性が高い。この場合、耐溶媒性が高いものほど良いが、この場合も糖鎖がないほうが好ましい。一般に Asn-Xaa-Ser/Thr 配列をもつアスパラギンが窒素を介して糖鎖と結合することが知られている。そこで、JHE の分子中にこの配列をもつ四つのすべてのアスパラギンを部位特異的塩基置換法によりグルタミン、あるいは、リシンに変換したミュータントを設計し発現させた¹⁸⁾。発現速度は小さかったが、糖鎖に親和性をもつタンパク、コンカナバリン A に吸着せず、得られたミュータントに糖鎖がないことを確認した。酵素活性に与える pH の影響を調べると、このミュータントでもとくに安定性は低下していなかった。続いて耐溶媒性を評価する目的で、

異なるエタノール濃度条件下で酵素活性を調べた。元の糖鎖をもつ酵素では、エタノール濃度が 10% を超えると酵素活性が著しく低下したのに対し、糖鎖をもたないミュータントでは逆に大きく活性が増大し、17% の高濃度でもコントロールと同程度の活性を示した。

哺乳動物のカルボキシルエステラーゼ

昆虫 JHE を対象とした研究手法は、哺乳動物のカルボキシルエステラーゼ研究にも応用可能と考えられた。それはトリフルオロメチルケトン阻害剤が哺乳動物のエステラーゼ類の多くを阻害するからである¹⁴⁾。カルボキシルエステラーゼ活性測定は、*p*-ニトロフェニルアセテートや 1-ナフチルアセテートを基質とするのが一般的である。これらは大きなアルコールと小さな酸のエステルであるので、小さなアルコールと大きな酸の組合せである JHE 基質として開発された前述のメチルチオエステル類のマウス肝カルボキシルエステラーゼによる分解を調べた¹⁵⁾。酸部分の構造の違いによる基質選択性が JHE の場合と異なるのは当然であるが、そのうちいくつかは *p*-ニトロフェニルアセテートや 1-ナフチルアセテートよりも非酵素的分解が小さく、かつ、酵素に対する親和性が高いなど速度論的に優れた性質を示した。これらは、広くカルボキシルエステラーゼ研究に有用な基質となるであろう。

昆虫 JHE のアイソザイムは少なく、たとえば前述の *H. virescens* では単一であるのに対し、哺乳動物の肝カルボキシルエステラーゼは 15 以上のアイソザイムが存在する。個々の役割の解明を含め、生化学的、分子生物学的研究にはまず各アイソザイムの分離・精製が必要であり、現在、主要なアイソザイムはゲルろ過やイオン交換クロマトグラフィーによって行なわれている¹⁹⁾。そこで、JHE 精製に用いたアフィニティークロマトグラフィーのマウス肝カルボキシルエステラーゼ精製への応用を試みた。まず、溶出に用いる化合物、トリフルオロメチルケトンの阻害活性と阻害された酵素の透析による活性回復を調べた結果、JHE と同様に炭素鎖の長さと阻害活性に比例関係が認められた。調製したアフィニティークロマトゲルの一つを用いると一部のタンパクが結合し、特異的阻害剤で溶出された。しかし、JHE に比べ精製後の酵素の安定性が小さかったため、得られた画分に活性回復が認められなかった¹⁷⁾。精製後の酵素タンパクの安定化が確立されれば、数種の異なったリガンドをもつアフィニティークロマトグラフィーの使い分けによりアイソザイムの分離・精製が可能となるであろう。さらに、このアフィニティークロマトグラフィーを用いた精

製法を遅延性神経毒性に関与する脳のエステラーゼ精製への応用を試みた例もある^{18,19)}。

おわりに

以上, JHE を中心とした最近のカルボキシルエステラーゼ研究例を紹介した。近年めざましい分子生物学の研究手法を取り入れ, 同時に生物有機化学の観点から取り組むことでエステラーゼのタンパク質化学においては新しい展開がもたらされた。しかし, さまざまなカルボキシルエステラーゼの生理的な意義については JHE 以外ではそれほどよくわかっておらず, 今後明らかにされなければならない。とくに哺乳動物に数多く存在するアイソザイムの役割を各々について明らかにすることは, 医薬や農薬開発においても重要な知見を与えるものである。さらに, 生物種間やアイソザイム間での基質特異性, あるいは, アミノ酸 (とそれをコードする塩基) 配列などの比較研究は, カルボキシルエステラーゼの分子進化のメカニズム解明等に大きく寄与するものと考えられる。

引用文献

- 1) B.D. Hammock: "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology," ed. by G.A. Kerkut & L.I. Gilbert, Vol. 7, Pergamon Press, New York, pp. 431-472, 1985
- 2) T.N. Hanzlik, Y.A.I. Abdel-Aal, L.G. Harshman & B.D. Hammock: *J. Biol. Chem.* **264**, 12419 (1989)
- 3) B.D. Hammock, B.C. Bonning, R.D. Possee, T.N. Hanzlik & S. Maeda: *Nature* **344**, 458 (1990)
- 4) M.M. Olmstead, W.K. Musker & B.D. Hammock: *Acta Crystallogr.* **C43**, 1726 (1987)
- 5) B.D. Hammock, K.D. Wing, J. McLaughlin, V.M. Lovell & T.C. Sparks: *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 76 (1982)
- 6) B.D. Hammock, Y.A.I. Abdel-Aal, C.A. Mullin, T.N. Hanzlik & R.M. Roe: *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**, 209 (1984)
- 7) B.D. Hammock & T.C. Sparks: *Anal. Biochem.* **82**, 573 (1977)
- 8) B.F. McCutchen, T. Uematsu, A. Szekacs, T.L. Huang, T. Shiotsuki, A. Lucas & B.D. Hammock: *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 231 (1993)
- 9) B.F. McCutchen, A. Szekacs, T.L. Huang, T. Shiotsuki & B.D. Hammock: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 119 (1995)
- 10) Y.A.I. Abdel-Aal & B.D. Hammock: *Science* **233**, 1073 (1986)
- 11) T. Shiotsuki, T.L. Huang, T. Uematsu, B.C. Bonning, V.K. Ward & B.D. Hammock: *Protein Express. Purif.* **5**, 296 (1994)
- 12) V.K. Ward, B.C. Bonning, T.L. Huang, T. Shiotsuki, V.N. Griffeth & B.D. Hammock: *Int. J. Biochem.* **24**, 1933 (1992)
- 13) V.K. Ward, P.G. Schneider, T. Shiotsuki, S.B. Kreissig, P.V. Choudary & B.D. Hammock: *Insect Biochem. Mol. Biol.* (submitted)
- 14) M-B.A. Ashour & B.D. Hammock: *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1869 (1987)
- 15) T.L. Huang, T. Uematsu, T. Shiotsuki, B. Borhan & B.D. Hammock: Abstr.; 207th Am. Chem. Soc. Natl. Meet., San Diego, MEDI-269, 1994
- 16) M. Hosokawa, T. Maki & T. Sato: *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 219 (1990)
- 17) T. Shiotsuki, T.L. Huang & B.D. Hammock: *J. Pesticide Sci.* **19**, 321 (1994)
- 18) T.C. Thomas, A. Szekacs, S. Rojas & B.D. Hammock: *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2587 (1990)
- 19) T.C. Thomas, A. Szekacs, B.D. Hammock, B.W. Wilson & M.G. McNamee: *Chem. -Biol. Interactions* **87**, 347 (1993)