ポストトランスレイショナルモディフィケーション によるプロテアーゼの特異性変換†

竹 内 道 雄

(東京農工大学農学部)

はじめに

酸性カルボキシペプチダーゼ (CPase) は、酸性領域でペプチド、タンパク質のカルボキシル末端 (C末端) のペプチド結合を加水分解し⁽¹⁻³⁾、C末端プロリンを含む⁽⁴⁾すべてのアミノ酸を遊離するプロテアーゼである。

酸性 CPase は、カビ、酵母、動物、植物に広く見出されており⁽⁵⁾、その分子量から2つのグループに大別することができる。すなわち分子量約10万~15万の高分子型酸性 CPase と分子量約5万~8万の低分子型酸性 CPase である。

著者らは、麹菌 *Aspergillus oryzae* が培養法の違いにより酸性 CPase O と命名された高分子型酸性 CPase 1 種類と酸性 CPase O-1、O-2 と命名された2種類の低分子型酸性 CPase を生産することを見出した^(2,3)。これら3種の酸性 CPase は、基質特異性が異なっていた。

本稿では、*A. oryzae* IAM 2640 の生産する酸性 CPase の多様性およびポストトランスレイショナルモディフィケーションによる変換機構についてまとめた。

1. 麹菌酸性 CPase の多様性

A. oryzae は、5% 米糠を培地として pH 4.5 の酸性下で液体培養すると、分子量15.5万の高分子型酸性 CPase O のみを生産した⁽³⁾。この酵素は、SDS-電気泳動で分子量約7.3万の位置に1本のバンドを示すことから、分子量の同じサブユニット2つから成るダイマーであると考えられた。このダイマー形成に S-S 結合は関

与していなかった。

一方、同菌株を小麦麸を培地として麹法で培養すると培地中に分子量約6.3万の酸性 CPase O-1、O-2 の二種が生産された⁽²⁾。酸性 CPase O-1、O-2 の物理化学的性質、酵素化学的性質、免疫学的性質は類似しており、CD-スペクトルも一致していた。しかし、等電点、基質特異性に違いが認められた。麹菌酸性 CPase の物理化学的性質および酵素化学的性質をまとめて表1に示した。

高分子型 CPase O と低分子型 CPase とでは、その性質が明らかに異なっていた。高分子型 CPase O は比較的安定で、とくに低分子型 CPase が完全に阻害されるモノヨード酢酸に対して強い抵抗性を示した。このことは、モノヨード酢酸を使うことにより高分子型と低分子型 CPase 活性を分別測定できることを示している。

高分子型 CPase O と低分子型 CPase では CD-スペクトルが異なっていた。しかし、高分子型 CPase と低分子型 CPase は免疫学的に部分共通抗原を有していた。以上のことから高分子型 CPase と低分子型 CPase では立体構造に違いがあるが、共通部分もかなりあることが示唆された。

2. 麹菌酸性 CPase の基質特異性

酸性 CPase の基質特異性は、基質のC末端から2番目のアミノ酸残基の構造に支配されており、C末端アミノ酸残基に支配されている動物臓器の CPase A、B とは明らかに異なっている⁽¹⁻³⁾。

麹菌酸性 CPase は、C末端から2番目に芳香族アミノ酸残基、疎水性アミノ酸であるロイシンあるいは側鎖にカルボキシル基を持つグルタミン酸がある基質に良く作用し、C末端アミノ酸を遊離した。しかし、C末端から2番目にグリニンとかプロリンがある場合、分解速度は著しく減少した。さらに、C末端に D-アミノ酸が位

† Substrate Specificity Conversion of the Acid Carboxypeptidases from *Aspergillus oryzae* by Posttranslational Modification.

Michio TAKEUCHI (Tokyo University of Agriculture and Technology, Saiwai-cho, 3-5-8, Fuchu, Tokyo 183)

表 1 *Aspergillus oryzae* IAM 2640 の生産する 3 種の酸性カルボキシペプチダーゼの性質

	麴菌酸性カルボキシペプチダーゼ		
	O	O-1	O-2
培養法	液体培養	固体培養	固体培養
分子重			
ゲル濾過	155,000	63,000	63,000
SDS-電気泳動	73,000	61,000	60,000
等電点	4.37	4.08	4.18
E _{1cm, 280nm} ¹	18.8	18.9	18.6
比活性*	0.502	0.394	0.393
作用最適 pH*	3.7	3.7	3.7
pH 安定範囲 (30°C, 5h)	5~6	5~6	5~6
熱安定性 (pH 4.5, 60°C)	安定	不安定	不安定
阻害剤 (阻害%)			
PMSF	40	77	78
モノヨード酢酸	16	100	100

* Z-Glu-Tyr を基質として測定

置すると全く作用することができなかった⁽⁴⁾。

高分子型 CPase O と低分子型 CPase O-1, O-2 は、低分子合成基質に対しては上記のような類似した特異性を示したが、詳細に見るとその特異性は微妙に異なっていた^(2,3)。この違いは、アミノ酸 8 残基から成るアンジオテンシンを基質に用いた解析でさらに明確になった。すなわち C 末端から 2 番目にプロリンが位置するアンジオテンシンに対して、低分子型 CPase O-1 の k_{cat} 値は、CPase O-2 のそれよりも 10 倍以上も高い値を示した。高分子型 CPase O では、低分子型 CPase O-1, O-2 の中間の値を示した。しかし K_m 値に大きな差は認めら

れなかった。同様にブラジキニン、Z-Glu-Tyr に対しても、その特異性の違いは、 K_m よりも k_{cat} に支配されていることが示された。(表 2)

以上の結果を考え合わせると、3 つの CPase は、基質を加水分解したあと基質結合部位の構造変化に違いがあるために、その特異性が異なると考えられた。

一方、蛍光基質であるペプチジル-4-メチルクマリナー 7-アミドを用いて調べたところ、高分子型 CPase O は、7-アミノ-4-メチルクマリナーを遊離したが、低分子型 CPase O-1, O-2 は全く作用することができなかった⁽⁸⁾。このことから、高分子型 CPase と低分子型 CPase では、基質結合部位にも大きな違いがあるものと考えられた。

3. ポストトランスレイショナルモディフィケーションによる変換

A. oryzae は、pH 4.5 の酸性下で米糠を培地として液体培養すると高分子型 CPase O のみを生産することを前に述べた。この培養濾液の pH は 5.5 付近で麴菌酸性 CPase の安定な pH であった。一方、小麦麩を用いた麴法で培養すると低分子型 CPase O-1, O-2 が得られるが、この培養抽出液の pH は 6.8~7.4 と麴菌酸性 CPase の安定 pH 領域よりやや高い値を示した。以上の結果から、培地中の pH の違いにより麴菌酸性 CPase の多様性が生じているものと考えられた。そこで、液体培地の初発 pH を 6 として培地中の pH と生産される CPase の関係について調べた。その結果、培地中の pH の上昇とともに低分子型 CPase の生成指標であるモノヨード酢酸による阻害率が上昇し、ゲル濾過によっても

表 2 *Aspergillus oryzae* 酸性カルボキシペプチダーゼの pH 3.7 におけるアンジオテンシン、ブラジキニン、Z-Glu-Tyr に対する加水分解の反応動力学パラメーター

基 質	カルボキシペプチダーゼ								
	O			O-1			O-2		
	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
サブサイト -P ₂ -P ₁ '-P ₁ '	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹ ·mM ⁻¹)	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹ ·mM ⁻¹)
アンジオテンシン									
-His ⁸ -Pro ⁷ -Phe ⁹	0.34	0.1	3.4	1.7	0.2	8.5	0.15	0.09	1.7
ブラジキニン									
-Pro ⁷ -Phe ⁸ -Arg ⁹	14.7	0.06	245	19	0.05	380	24	0.07	367
合成基質									
Z-Glu-Tyr	86	0.48	179	53	0.5	106	51	0.5	102

* サブサイトの名称は Schechter と Berger の命名法に従った。

↓ 切断点を示す。

低分子型 CPase が生産されていることが確認された。この低分子型 CPase は、1 種のみが生産されており、等電点は 4.06 を示した。また、C 末端から 2 番目にプロリンがある基質に対して C 末端アミノ酸を速く遊離した。以上の結果から、まず高分子型が生産され培地中の pH の上昇とともにポストトランスレイショナルモディフィケーションが起こり低分子型 CPase O-1 が生成していると考えられた。

高分子型 CPase のサブユニット分子量は 7.3 万、一方、低分子型 CPase の分子量は約 6.3 万である。このことから高分子型から低分子型への変換はプロテアーゼによる限定分解によるものと推定された。高分子型 CPase は、pH 5 付近では各種のプロテアーゼに対して抵抗性を示したが、pH 8 で変性した高分子型 CPase は限定分解を受けた。なお高分子型 CPase は pH 8 では可逆的に変性した。限定分解産物を電気泳動により調べたところ、トリプシンにより低分子型と同じ分子量のフラグメントが生じていた⁽⁹⁾。高分子型と低分子型 CPase では、N 末端アミノ酸配列が異なっていた(竹内ら、準備中)。以上のことから、高分子型 CPase O の N 末端側の分子量約 1 万のフラグメントが同じ麹菌の生産するトリプシン様酵素で除去され、低分子型 CPase に変換しているものと考えられた。一方、低分子型 CPase O-1 と O-2 は、ゲル濾過で約 6.3 万の分子量を示したが、SDS-電気泳動では、O-1 に比べ O-2 のほうが分子量にして約 1000 小さいことが明らかになった。両酵素の N 末端アミノ酸配列は同じであることから O-1 から O-2 への変換は、C 末端付近のプロセッシング、おそらくは自己消化により C 末端アミノ酸数残基除去され起こっているものと考えられた。

以上の結果を総合すると麹菌酸性 CPase の多様性は、図 1 のような経路でポストトランスレイショナルモディフィケーションが起こり生じていると考えられた。

麹菌の酸性 CPase は、本来 1 種類の高分子型 CPase のみしか生産されないが、これがポストトランスレイショナルモディフィケーションにより変換し、見かけ上 3 つの CPase となり、特異性の異なる栄養獲得酵素として機能しているものと考えられた。

おわりに

酸性 CPase は、酸性領域でペプチド、タンパク質の C 末端から逐次アミノ酸を遊離することから、ペプチド、タンパク質の C 末端付近の構造決定^(10,11)、苦味ペ

図 1 麹菌酸性カルボキシペプチダーゼのポストトランスレイショナルモディフィケーションによる変換の模式図

高分子型の麹菌酸性 CPase が生産され、培地中の pH の上昇とともに可逆的に変性し、変性した酵素が麹菌の生産するトリプシン様プロテアーゼにより限定分解を受け、N 末端側の分子量約 10,000 の低分子フラグメントがはずれ、まず、低分子型酸性 CPase O-1 ができる。次いで、低分子型酸性 CPase O-1 の自己消化により C 末端付近のプロセッシングが起こり低分子型酸性 CPase O-2 が生成する。

チドの疎水性 C 末端アミノ酸除去による脱苦味⁽¹²⁾、起炎ペプチド プラジキニンの分解による消炎⁽¹³⁾などの利用が考えられている。また、トランスペプチディン反応を利用してブタインスリンのヒト型への変換⁽¹⁴⁾、タンパク質の一次構造決定への利用⁽¹⁵⁾などについても報告されている。酸性 CPase のポストトランスレイショナルモディフィケーションによる基質特異性変換機構の解明は、この酵素の利用範囲をさらに広げるものと考えられる。

基質特異性の変換は、酵素と基質の相互作用を解明するうえで興味ある問題である。反応部位とは異なった位置でのプロテアーゼによるポストトランスレイショナルモディフィケーションが立体構造を変化させ特異性を変換する麹菌酸性 CPase は、タンパク質工学的材料としても興味深いものとする。

- (1) E. Ichishima : *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 274 (1972).
- (2) M. Takeuchi, T. Ushijima and E. Ichishima : *Curr. Microbiol.*, **7**, 19 (1982).
- (3) M. Takeuchi and E. Ichishima : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 633 (1986).
- (4) E. Ichishima, M. Takeuchi, R. Yasuda, Y. Suzuki and S. Kobayashi : *J. Biochem.*, **81**, 1733 (1977).
- (5) 一島英治 : 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 874 (1972).
- (6) S. Yokoyama, A. Oobayashi, O. Tanabe, S. Sugawara, E. Araki and E. Ichishima : *Appl. Microbiol.*, **27**, 953 (1974).
- (7) E. Ichishima, A. Yamane, T. Nitta, M. Kinoshita, S. Nikkuni, T. Oka and S. Yokoyama : *Appl. Microbiol.*, **26**, 327 (1973).
- (8) M. Takeuchi and E. Ichishima : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1177 (1989).
- (9) 竹内道雄, 一島英治 : 日本農芸化学会昭和59年度大会講演要旨集, 1984, p. 206.
- (10) E. Ichishima and T. Arai : *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 444 (1973).
- (11) M. Takeuchi and E. Ichishima : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1403 (1986).
- (12) H. Umetsu, H. Matsuoka and E. Ichishima : *Agric. Food Chem.*, **31**, 50 (1983).
- (13) S. Yokoyama, A. Oobayashi, O. Tanabe, K. Ohta, Y. Shibata and E. Ichishima : *Experientia*, **31**, 1122 (1975).
- (14) K. Breddam and J. T. Johansen : *Carlsberg Res. Commun.*, **49**, 463 (1984).
- (15) C. Carles, J.-C. Huet and B. Ribadeau-Dumas : *FEBS Lett.*, **229**, 265 (1988).