微生物酵素と酵素阻害剤

鶴 大典

長崎大学薬学部, 〒852 長崎市文教町 1-14

Microbial Enzymes and Their Inhibitors

Daisuke TSURU

*School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University,
Bunkyo-machi 1-14, Nagasaki 852, Japan*

Several proteolytic enzymes and dehydrogenases of microbial origin were studied with special regard to structure-activity relationship. Enzyme genes of Zn-proteases, subtilisin and pyroglutamyl aminopeptidase from genus *Bacillus*, prolyl endopeptidases from *Flavobacterium* and *Aeromonas*, and of protease II from *E. coli* were cloned, sequenced and overproduced in *E. coli*, their active site structures being elucidated by chemical modification as well as by site-directed mutagenesis. Homology analysis revealed that there is a prolyl endopeptidase family as a new family of serine endopeptidases. In addition, enzymatic properties and the primary structures of glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida* and 7α -hydroxysteroid dehydrogenase from *E. coli* were elucidated. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of their genes indicated that the former enzyme should be classified into a long-chain metallo alcohol dehydrogenase family, and the latter belongs to a member of the short-chain nonmetallo-alcohol dehydrogenase family.

Keywords—*Bacillus amyloliquefaciens*; long-chain alcohol dehydrogenase family; *Pseudomonas putida*; prolyl endopeptidase family; pyroglutamyl peptidase; Zn-protease

1951 年, 大阪市立大学・理工学部にて奉職した私に与えられた最初のテーマは“細菌アミラーゼ及びプロテアーゼの生合成”に関する研究であった。当時, 日本では須田正巳教授(阪大・微研)の successive adaptation (sequential induction) が華々しく登場し, 関東, 関西を問わず, タンパク質の生合成が研究の 1 つの主流になっていた。¹⁾ 漸くわが国にも一, 二の大学で ^{32}P が導入され始めたばかりで, 無細胞系は未だ確立しておらず, triplet code の発見以前の時期でもあり, 当時の我々の研究を今振り返ってみると幼稚と言われても仕方がないが, 当時としてはそれなりの成果を挙げたつもりであり,^{2,3)} 学問の進歩の速さを改めて感じさせられる。なお, ここで材料として用いた α -アミラーゼ生産菌, *Bacillus amyloliquefaciens* 及び類縁菌とは結局, その後, 43 年間の長い付き合いをすることになった。

I. 微生物由来のタンパク質分解酵素

1. *Bacillus* 属細菌のプロテアーゼ群 微生物由来で高度に精製されたプロテアーゼは現在 900 種を超える。そのうち *Bacillus* 属細菌のプロテアーゼだけでも 80 種以上が報告されている。^{4,5)}

本総説は, 平成 5 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

しかし、イオン交換セルローズやセファデックスが導入されるまでは微生物プロテアーゼの精製は困難を極めた。1964 年、我々は CM-cellulose の導入と安定剤としての 4 mM 酢酸 Ca を含む緩衝液を用いることにより *B. amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼを高度に精製して、これが酵素 1 分子当たり 1 ケの Zn を含む金属酵素であることを始めて明らかにした。⁶⁾ さらに、1966 年、糖化型 α -アミラーゼ生産菌、*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) の培養液から中性及びアルカリプロテアーゼをそれぞれ結晶化し、前者は Zn の外に 3–4 ケの Ca を含む金属酵素であり、後者は既に報告されている subtilisin BPN' とは異なるセリンプロテアーゼであることを報告した。^{7–9)}

a) Zn-Proteases——最もよく研究されているのは、1972 年にその一次及び高次構造が報告された thermolysin (TLN: *B. thermoproteolyticus* 由来) である^{10–12)} (Fig. 1). Table I にこれまでに報告された Zn-proteases の活性部位近傍のアミノ酸配列を示す。¹³⁾ TLN の場合 His 142, His 146 及び Glu 166 が Zn に配位し、Glu 143 が触媒残基として機能している。アンジオテンシン変換酵素もこのグループに含まれる。しかし、ザリガニの低分子プロテアーゼ (20 kDa) では 3 ケの His (His 92, 96 及び 102) が Zn に配位し、Glu 93 が触媒部位アミノ酸である。¹⁴⁾ 蛇毒中性プロテアーゼや動物コラゲナーゼはこのグループに含まれる。

B. amyloliquefaciens の Zn-protease (BANP) は 300 残基のアミノ酸からなる分子量 32 kDa のタンパク質¹⁵⁾で、その遺伝子解析によれば 221 アミノ酸残基からなるプレプロ領域が除かれて成熟酵素となる。¹⁶⁾ 構造遺伝子のターミネータ領域は特徴のある安定な stem-loop 構造をとり、これが該菌の高い酵素生産能に関係していると思われる。TLN とは 47% の相同性を示し、活性部位はよく保存され、hydropathy 解析でも両者の二次構造は類似している。¹⁵⁾ BANP をヨード化、あるいはニトロ化¹⁷⁾すると Tyr 21 と Tyr 158 が化学修飾を受けて、カゼイン分解力は消失し、低分子合成基質に対する活性はむしろ増大する。^{17–19)} 一方、メチレンブルー存在下の光酸化によって BANP の 5 ケの His のうち、His 228 のみが酸化され、酵素活性は速やかに消失する。²⁰⁾ 果たして、これらアミノ酸残基が BANP の活性部位に位置するかどうかを知るため、石黒正路、今城清一両博士 (サントリー生医研) の協力のもとに、コンピュータを利用し、TLN の高次構造を参考にして、BANP の三次元構造モデルを構築した。²¹⁾ その結果、両者の高次構造は極めて類似し、アミノ酸残基の付加や欠損は分子の表面でのみ起こっており、Zn に配位する His 143, His 147, Glu 167 と、触媒残基の Glu 144 の外に、化学修飾を受ける Tyr 158 及び His 228 が活性部位に位置することが分かった (Fig. 2). この Tyr 158 と His 228 は四面体反応中間体形成の促進と安定化に関与していると思われる。また、Tyr 158 の化学修飾で低分子基質に対する活性が増大するのは導

Fig. 1. Projection Drawing Illustrating the Backbone Conformation of the Thermolysin (TLN) Molecule¹¹⁾

The open circles correspond to the α -carbon positions. The zinc atom is drawn stippled with its three protein ligands shown by broken lines. The four Ca atoms are shown as solid black circles.

TABLE I. Active Sites of Zn-Containing Endo- and Exo-peptidases

	142	146	166
<i>B. thermo.</i>	V-V-A-H-H-L-T-H-A-V-T		G-A-I-N-E-A-I---S-D
<i>B. cereus</i>	V-I-G-H-H-L-T-H-A-V-T		G-A-L-N-E-A-I---S-D
<i>B. stearo.</i>	V-V-G-H-H-L-T-H-A-V-T		G-A-I-N-E-A-M---S-D
<i>B. caldolyticus</i>	V-V-G-H-H-L-T-H-A-V-T		G-A-I-N-E-A-M---S-D
<i>B. subtilis</i> A	V-T-A-H-H-M-T-H-G-V-T		G-A-L-N-E-S-F---S-D
<i>B. subtilis</i> B	I-V-A-H-H-I-T-H-A-V-T		G-A-L-N-E-S-I---S-D
<i>B. amylolique.</i>	V-T-A-H-H-M-T-H-G-V-T		G-A-L-N-E-S-F---S-D
<i>E. carotovora</i>	V-V-A-H-H-L-T-H-G-I-T		G-A-L-N-E-S-L---S-D
<i>E. chrysanthemi</i>	S-F-T-H-H-I-G-H-A-L-G		Y-W-E-V-E-N-T-G-G-D
<i>L. pneumophila</i>	V-G-G-H-H-V-S-H-G-F-T		G-G-M-N-E-S-F---S-D
<i>Lis. monocytogenes</i>	I-V-G-H-H-L-T-H-A-V-I		G-A-L-N-E-S-F-A---D
<i>P. aeruginosa.</i> E ^{a)}	V-A-A-H-H-V-S-H-G-F-T		G-G-M-N-E-A-F---S-D
<i>P. aeruginosa.</i> A ^{b)}	T-L-T-H-H-I-G-H-T-L-G		I-N-L-N-E-K-A-L-S-D
<i>Ser. piscatorum</i> ^{c)}	T-F-T-H-H-I-G-H-A-L-G		I-L-N-L-E-K-S-F-S-D
<i>St. sanguis</i> ^{d)}	T-Y-T-H-H-M-T-H-D-S-D		G-L-G-P-E-F-F-A-K-G
<i>Str. cacaoi</i>	T-T-V-H-H-A-G-H-S-L-M		S-T-F-R-E-Y-F-L-T-D
<i>Str. sp.</i> C5 ^{e)}	V-T-A-H-H-T-G-H-V-L-G		
<i>Str. lividans</i>	V-T-A-H-H-T-G-H-V-L-G		
<i>Asp. oryzae</i> II	T-T-L-H-H-F-T-H-A-P-G		
<i>V. cholerae</i>	V-S-A-H-H-V-S-H-G-F-T		G-G-I-N-E-A-F---S-D
Rabbit 24.11	V-I-G-H-H-I-T-H-G-F-D		N-T-L-G-E-N-I---A-D
Rat 24.11	V-I-G-H-H-I-T-H-G-F-D		N-T-L-G-E-I-N---A-D
Rat 24.15	T-Y-F-H-H-F-G-H-V-M-H		R-D-F-V-E-A-P-S-Q-M
<i>Sal. typh.</i> SPP	T-L-F-H-H-F-G-H-T-L-H		W-D-A-V-E-L-P-S-Q-F
<i>Sal. typh.</i> DPCP	T-L-F-H-H-F-G-H-G-L-H		R-D-F-V-E-F-P-S-Q-I
Human ACE-N	T-V-H-H-H-M-G-H-I-Q-Y		P-G-F-H-E-A-I-G---D
Human ACE-C	V-A-H-H-H-M-G-H-I-Q-Y		P-G-F-H-E-A-I-G---D
Snake venom HT-2	T-M-A-H-H-L-G-H-N-L-G-M-E-H-D-G-K-D-C-L		
Snake venom HR2a	T-M-T-H-H-I-G-H-N-L-G-M-E-H-D-D-K-D-K-C		
Snake venom H2	T-M-T-H-H-L-G-H-N-L-G-M-E-H-D-D-K-D-K-C		
Crayfish astacin ^{e)}	T-I-I-H-H-L-M-H-A-I-G-F-Y-H-E-H-T-R-M-D		
Mouse 24.18	T-I-E-H-H-I-L-H-A-L-G-F-F-H-E-Q-S-R-T-D		
Human PPH	I-I-E-H-H-I-L-H-A-L-G-F-I-H-E-O-S-R-T-D		
Human MMP-1	V-A-A-H-H-L-G-H-S-L-G-L-S-H-S-T-D-I-G-A		
Human MMP-2	V-A-A-H-H-F-G-H-A-M-G-L-E-H-S-Q-D-P-G-A		
Human MMP-8	V-A-A-H-H-F-G-H-S-L-G-L-A-H-S-S-		
Human MMP-9	V-A-A-H-H-F-G-H-A-L-G-L-D-H-S-H-		
Human MMP-10	V-A-A-H-H-F-G-H-S-L-G-L-F-H-S-A-		
Human MMP-11	V-A-A-H-H-F-G-H-V-L-G-L-Q-H-T-T-		
Human stromelysin	V-A-A-H-H-I-G-H-S-L-G-L-F-H-S-A-N-T-E-A		
Human AP-M	V-I-A-H-H-L-A-H-Q-W-F		L-W-L-N-E-G-F-A-S
Rat AP-M	V-I-A-H-H-L-A-H-Q-W-F		L-W-L-N-E-G-F-A-S
<i>Esch. coli</i> AP-N	V-I-G-H-H-Y-F-H-N-W-T		L-S-L-K-E-G-L-T-V

B., *Bacillus*; *thermo.*, *thermoproteolyticus*; *stearo.*, *stearothermophilus*; *amylolique.*, *amyloliquefaciens*; *E.*, *Erwinia*; *L.*, *Legionella*; *Lis.*, *Listeria*; *P.*, *Pseudomonas*; *Ser.*, *Serratia*; *St.*, *Streptococcus*; *Str.*, *Streptomyces*; *Asp.*, *Aspergillus*; *V.*, *Vibrio*; *Esch.*, *Escherichia*; *Sal. typh.*, *Salmonella typhimurium*; SPP, signal peptide peptidase (oligopeptidase A); DPCP, dipeptidyl carboxypeptidase; PPH, *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid hydrolase; MMP, matrix metallo-protease; AP-M, aminopeptidase M; AP-N, aminopeptidase-N.

a) elastase; b) alkaline protease; c) Dazen; d) Ig A specific protease (Pro-Thr or Pro-Ser bond specific); e) low molecular mass neutral protease (24.21); 24.11, membrane-bound neutral protease (enkephalinase); 24.15, cytosol neutral protease (Pz-peptidase); 24.18, meprin A; ACE-N and C, N and C-domains of angiotensin converting enzyme; H, E, Zn-ligand; E, catalytic glutamic acid. The numbers shown in top indicate amino acid Nos. from amino terminus of thermolysin.

入された官能基が電子吸引基として働き, Tyr 158 のフェノール性 OH 基の酸性度を高めて反応性を上げるためであろう. なお, BANP は TLN や *Pseudomonas elastase* と異なり, Zn-proteases の特異的阻害剤である phosphoramidon や talopeptin で阻害されにくい. その原因を解明するため, 酵素・阻害剤複合体モデルを構築した (Fig. 3). その結果, TLN では Asn 111 と阻害剤の TrpNE1 との間に強い水素結合 (2.2 Å) が形成されるのに反し, BANP では酵素の Phe 130 (TLN

Fig. 2. Stereodrawing Illustrating the Active Site Region of *B. amylosacchariticus* Zn-Protease (BANP)²¹⁾

His 143, His 147, and Glu 167 coordinate to Zn ion, and the distance between Tyr 158 and the Zn ion is 3.7 Å. The distance between His 228 and the Zn ion is 4.3 Å, and that between Tyr 158 and His 228 is 3.3 Å.

の Thr 129 に相当) が複合体形成の立体障害となり, 酵素の Asn 112 と阻害剤の TrpNE1 との間にゆるい結合 (3.8 Å) しか形成し得ないことがその原因の 1 つであると結論された.²¹⁾ なお, Zn-protease に対する特異的阻害剤としては, その外に村尾らによって見出された蛋白性の SMPI (分子量: 13 kDa) があるが, BANP はこの阻害剤によっても阻害されにくい. 酵素・阻害剤複合体の反応を解析した結果, TLN は阻害剤 (SMPI) の反応部位の Cys 64-Val 65 結合のみを切断するのに対し, BANP はこの結合の外, Cys 10-Thr 11 結合など 16 ケ所を切断して SMPI を失活させることが分かった.²²⁾

b) Subtilisins—*Bacillus* 属細菌のアルカリプロテアーゼは subtilisin と総称されている. いずれも分子量約 27 kDa のセリン酵素で *B. amyloliquefaciens* の生産する subtilisin BPN' では Asp 32, His 64 と Ser 221 が catalytic triad (プロトン・リレー系を構成する活性部位アミノ酸残基) を形成している. このグループには, 納豆菌の生産する nattokinase, 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の好アルカリ性プロテアーゼ (pH 12 付近で最大活性を示す), 耐熱性 *Tritirachium album* の proteinase-K, *Thermus aquaticus* の aqualysin, *Thermoactinomyces vulgaris* の thermitase, 酵母の KEX-protease (processing enzyme) や, ヒト肝や赤血球の tripeptidyl peptidase-II などが含まれる.^{4,5,23)}

我々が結晶化した *B. amylosacchariticus* の subtilisin AM は subtilisin BPN' と 70% の相同性を示し, 活性発現に関与するアミノ酸残基はよく保存されている.²⁴⁾ 遺伝子解析によれば, この酵素は 381 アミノ酸残基からなるプレ・プロ体として生合成され, プロセッシングを受けて 275 アミノ酸残基の成熟酵素として分泌される.^{23,24)} なお, 本酵素遺伝子 DNA のプロモータ領域, プレ・プロ領域の後に, 大腸菌の aminopeptidase P (後述) の構造遺伝子を連結し, これをシャトルベクターに挿入して枯草菌を形質転換すると, aminopeptidase P が枯草菌で生成・分泌されることが分かった.²⁵⁾

c) Pyroglutamyl Aminopeptidase (Pyr AP)—Pyr AP はペプチドの N 末端にある Pyr を

Fig. 3. Comparison of CLT-Thermolysin (A) and CLT-BANP (B) Complexes²¹⁾

Dotted lines indicate the inhibitor (CLT). CLT, *N*-(1-carboxy-3-phenylpropyl)-L-leucyl-L-tryptophan.

特異的に遊離する酵素である。²⁶⁾ 1968 年, カルホルニア大学の Doolittle らによって *Pseudomonas fluorescens* 菌体中にその存在が初めて報告された。²⁶⁾ その後, 動物組織, 脳シナプトゾームにも見出され, TRH (thyroliberin) の分解など生理的に重要な機能を持っている。*Pseudomonas* の酵素は極めて不安定で Doolittle らは, 遂にその精製を断念して, 我々に協力を求めてきた。しかし, その活性が低いことと安定性が悪いことのため, 我々も本酵素の精製を断念し, 新しく約 3000 株の細菌について酵素のスクリーニングを行った。その結果, 私が大学卒業後, 最初に取り扱った *B. amyloliquefaciens* の菌体中にこの酵素の最も高い活性を見出し,²⁷⁾ 疎水結合クロマトグラフィーによってその収率よい精製法を確立した。²⁸⁾ また, 当研究室の藤原 (現・微生物薬品化学研究室, 助

教授) は本酵素に対する特異的発色基質 (Pyr- β -naphthylamide) 及び蛍光基質 (Pyr-4-methyl coumaryl-7-amide)²⁹⁾ を開発すると共に、活性部位指向性標識試薬 (Pyr-CH₂Cl, Z-Pyr-CH₂Cl, 及び Z-Pyr-diazomethylketone) を新規に合成して、酵素反応機構を詳細に解析した。³⁰⁾ さらに我々は、最近、この酵素遺伝子のクローニング、塩基配列決定及び高発現に成功した。³¹⁾ この酵素は二量体として存在し、単量体は 215 アミノ酸残基からなる。単量体当たり 2 ケ存在する SH 基のうち、1 ケは PCMB や [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): DTNB] と反応し、酵素は速やかに失活する。もう 1 ケの Cys は尿素処理することによって、始めて DTNB と反応するようになる。²⁸⁾ 部位特異的変異法による解析の結果、内部に埋もれている Cys 68 は活性に関与せず、溶媒に接し得る Cys 144 が活性部位アミノ酸であると結論された。³¹⁾ この酵素はこれまで報告されているチオールプロテアーゼとはほとんど相同性が認められない。大腸菌で発現された酵素は容易に結晶化され、現在、X 線解析が進行中である。なお、動物シナプトゾームに存在する膜結合型 Pyr AP は分子量約 200 kDa の金属酵素とされているが、性質の詳細は不明である。^{13,26)}

2. プロリン特異性ペプチダーゼなど プロリン (Pro) はタンパク質中に存在する唯一のイミノ酸であり、Pro を含むペプチド鎖周辺は一般のペプチダーゼでは切断されにくい。Pro-X 結合を特異的に開裂する prolyl endopeptidase (PEP) は 1971 年、イリノイ大学医学センターの故 Walter 教授らによりヒト子宮に見出された酵素であり、post-proline cleaving enzyme と命名された。³²⁾

TABLE II. Proline Specific Endo- and Exo-peptidases

Enzymes	Specificity	Origins
Prolyl endopeptidase	Y-Pro↓Y (X)	Animal tissues, carrot, mushrooms, <i>A. hydrophila</i> , <i>F. meningosepticum</i> , <i>Xanthomonas</i> sp.
Proline iminopeptidase	Pro↓Y (X)	Pig kidney (?), <i>B. coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. casei</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , shimeji
Aminopeptidase P	X↓Pro-Y	Pig kidney, <i>E. coli</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. typhimurium</i>
Dipeptidyl peptidase IV	X-Pro↓Y	Animal tissues, <i>Bacterioides gingivalis</i> , <i>F. meningosepticum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Str. cremoris</i> , <i>Str. mitis</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>
Imidodipeptidase (Prolidase)	X↓Pro	Pig intestinal mucosa, <i>Arthrobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>S. typhimurium</i>
Iminodipeptidase (Prolinase)	Pro↓X	Porcine kidney cytosol
Carboxypeptidase P (Angiotensinase C)	Y-Pro↓X	Mammalian kidney cortex microsomes
Proline specific dipeptidyl Ccase	Y↓Pro-Pro	<i>Streptomyces</i> sp., ^{a)}
Ig A specific peptidase ^{b)}	Y-Pro↓Thr-Y	<i>Str. sanguis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> type 2, <i>H. influenzae</i> type 2
	Y-Pro↓Ser-Y	<i>N. gonorrhoeae</i> type 1, <i>H. influenzae</i> type 1

a) S. Miyoshi, G. Nomura, M. Suzuki, F. Fukui, H. Tanaka, S. Maruyama, *J. Biochem.*, **112**, 253 (1992). b) Active towards hinge region of proline-rich human IgA 1 immunoglobulin heavy chain. X, amino acid; Y, peptide.

A., *Aeromonas*; *B.*, *Bacillus*; *E.*, *Escherichia*; *F.*, *Flavobacterium*; *H.*, *Haemophilus*; *L.*, *Lactobacillus*; *N.*, *Neisseria*; *S.*, *Salmonella*; *Str.*, *Streptococcus*; *Sacch.*, *Saccharomyces*.

当研究室の芳本は 1976 年, Walter 研究室に留学し, そこで仔羊 PEP と post-proline dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl peptidase IV) を高度に精製し, それら酵素の基質特異性の詳細とセリン酵素としての特徴を明らかにした.³³⁾ PEP は動物組織に広く分布し, 脳やこう丸に高い活性が認められ,³⁴⁾ Pro を含む生理活性ペプチドに作用して, これらを失活させる.³²⁻³⁴⁾ 同様の基質特異性を示す酵素はその後, 微生物, きのこや植物にも見出されたが, その真の生理的役割はよく分からない. その外, これまでに Pro に特異性を示すペプチダーゼが幾つか報告されている (Table II).

芳本博士が帰国後, 我々の研究室では微生物起源のプロリン特異性プロテアーゼの研究をテーマの 1 つとして取り上げ, まず, 1978 年, *Flavobacterium meningosepticum* 菌体中に PEP を見出し, その諸性質を報告した.³⁵⁾ さらに, 本酵素遺伝子のクローニング, 塩基配列決定と過剰発現に成

```

X-PDP  VDKAPYR--FTEGW-TYSLN-DYFLTRGFASIYVA---GVGTRSSDGFQTSBGDYQQIYSHTAV
RDPIV  SKKYPLLLIDVYAGP--CSQKADAAAF-RLNWTATYLASTENIIVASFDDG--RGSQYQGDKINHA
HDPIV  SKKYPLLLIDVYAGP--CSQKADAAAF-RLNWTATYLASTENIIVASFDDG--RGSQYQGDKINHA
DP-B   SDHYPVFFFAYGGP--NSQQVVKTF-SVGFNEVVASQLNAIIVVVVDG--RGTGFKGQDFRSLV
F-PEP  DGKNPTI-LYSYGGFNIISLQPAFSVVMWAIWMEN-----GG-IYAVPNIIRGGGHEYGKKWEDAG
A-PEP  DGSNPTI-LYGYGGFDVSLTSPFSVSVANWLDL-----GG-IYAVANLRGGGHEYGQAWELAG
P-PEP  DGSEPAF-LYGYGGFNIISITPNYSVSRLLIFVRNM-----GG-VLAVANIRGGGHEYGTHWKKGG
E-P11  KGNPPLL-LYGYGSGYASIDADFSPSRLLSLDDR-----GF-VYAIVEVRGGGELGQQWYEDG
PACYL  KTQVPNVVMPHGGP--ESSFVTAWMLFPAMLCMK-----GFAVLLV-NYRGSTGFGQDSILSL
RACYL  KTQVPNVVMPHGGP--ESSFVTAWMLFPAMLCMK-----GFAVLLV-NYRGSTGFGQDSILSL
3P21   RPKCPWWSGP-TGA--ESSFVTAWMLFPAMLCMK-----GFAVLLV-NYRGSTGFGQDSILSL
      ?                               *

X-PDP  -----IDWINGRA--// //---WANGKVAMTGKSYLGTNAYGAATTGVEGLEVLAEAG
RDPIV  NKRRLGLEVEDEIEAARQFLKMG--FVDSKRVAIWGWSYGGYVTSNVLGSGSG-VFKCGIA-V
HDPIV  NKRRLGLEVEDEIEAARQFSKMG--FVDNKRVAIWGWSYGGYVTSNVLGSGSG-VFKCGIA-V
DP-B   RDRLGDIYHARDQISAAS--LYGSLTFVDPQKISLFCWSYGGYLTTLKTLKDGGRHFKYKMS-V
F-PEP  TKMQKKNVFNDFFIAAGEY-LQKNGYTSKEYM-ALSGRSNGGGLLVGATMTMRPD-LAKVAFPGV
A-PEP  TRMNKQNVFDDFFIAAGEY-LKAGEYTRTDR-LAIRGGSNGGGLLVGAVMTQRPD-LMRVACQAV
P-PEP  ILMKQKNCFFDDFQCAAEY-LIKEGYTSPKRL-TINGGSNGGGLLVATCANQRPD-LFGCVIAQV
E-P11  KFLKKKNTFNDYLDACDA-LLKLGYGSPSLC-YAMGGSAGGMLMGVAINQRPE-LFEGVIAQV
PACYL  PGNVGEHQDVQVQFAVEQVLQEEHFDAGR--ALMGSGHGGFLSCHLIGQYPE-TYSACVVRN
RACYL  PGNVGEHQDVQVQFAVEQVLQEEHFDARR--ALMGSGHGGFLSCHLIGQYPE-TYSACIARN
3P21   PGNVGEHQDVQVQFAVEQVLQEEHFDASV--LMGSGHGGFISCHLIGQYPE-TYRACL--R

X-PDP  I-----SSWYNYRENGLVRSPPG-FPGEDLDVLAALT-YSRNLD--// //---LGKT
RDPIV  APV-----SRW-EYDYSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAEN-----FKQ
HDPIV  APV-----SRW-EYDYSVYTERYMGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAEN-----FKQ
DP-B   APV-----TDW-RFYDYSVYTERYM--ETPQENFDGXYVSSVENVVNTAL-----AQA
F-PEP  GVLD-----MLRYNKFTAGAGWA-YDGTAEDESKEMFE-----YLSKSYSPVENVK-----AGTC
A-PEP  GVLD-----MLRYETFTAGAGWA-YDGTSADESEAMFD-----YLSKSYSPLESVR-----AGVS
P-PEP  GVMD-----MLKFPKTYTIGHAWT-TDYGCS-DSKQEF-----WLIKYSPLENVKLPADDIQ
E-P11  FFVDVVTTL-DESIPLTTFGEF-EHWGNPQDP-QYYE-----YMKSYSPYDNVT-----AQA
PACYL  PVINIA-SMNGSTDIPD--WCMVETGFPYSNSCLPDLNVAEMLDK-SPIKYIP-----QV
RACYL  PVINIA-SMNGSTDIPD--WCMVETGFPYSNSCLPDLNVAEMLDK-SPIKYIP-----QV
3P21   TRDHNA-SMNGSTDILTGAWW--RLASFSSDCLPDLNVAEMLDK-SPIRYSS-----GE
      ?                               *

X-PDP  AVSFAQFDNNYDDDETFKKYSKDFNVFKKDLFEN--// //---LYSTDFEHTVRDMRKVYTYEI
RDPIV  -VEYLLINGTADDNVEFQQSAQIS---KALVDAGVD---FQAHWYTDEDHGIASSTAEQHIY
HDPIV  -VEYLLINGTADDNVEFQQSAQIS---KALVDVGVVD---FQAHWYTDEDHGIASSTAEQHIY
DP-B   -NRFLLMHGTGDDNVEFQNSLKLFL---DLLDLNGVE---NYDVEVFPDSHISIRYENANVIVF
F-PEP  YPSTHVITSDDHDDRVVPAESFKFGSELQ---AKQSCKNPILIRIETNAGHGAGRSTEQVVAE
A-PEP  YPSTLVTTADEDDRVVPAESFKFAATLQ---ADDAGPEPQLIRIETNAGHGAGTPEVAKLIEQ
P-PEP  YPSMLLLTADDEDDRVVPLESLKFIATLQYIVGSRKQNNPILLIEVDTKAGHGAGKPTAKVIEE
E-P11  YPHLLVTTGLEDSQVQYWEPAKWVAKLR---ELKTDDEHLLLLCTDMDSGHG-GKSGRPFKSYF
PACYL  KTFVLLMLGQEDRRVFPKQGMHEYRVLKARNVP-----VRLLLY--PKSTHAL--SEVEVESD
RACYL  KTFVLLMLGQEDRRVFPKQGMHEYRALKARNVP-----VRLLLY--PKSTHAL--SEVEVESD
3P21   DTTV-TDVQGED-AVCLSR-HEYTSSRP-ECA-----VRLLLY--PKSTHAL--SEVEVESD

```

Fig. 4. Alignment of the C-Terminal Regions of the Prolyl Endopeptidase Family³⁸⁾

The asterisks indicate the active site seryl and histidyl residues, and the question marks show putative active site aspartic acid residue. X-PDP, X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*; RDPIV, rat dipeptidyl peptidase IV; HDPIV, human dipeptidyl peptidase IV; DP-B, dipeptidyl peptidase B from yeast; F-PEP, *Flavobacterium* prolyl endopeptidase (PEP); A-PEP, *Aeromonas* PEP; P-PEP, porcine brain PEP; E-P11, protease II from *E. coli*; PACYL, porcine liver acylamino acid releasing enzyme; RACYL, rat liver ACYL; 3P21, human protein 3P21.

<i>F. meningosepticum</i>	PEP	-D-D-R-V-V-P-A-E-S-
<i>A. hydrophila</i>	PEP	-D-D-R-V-V-P-A-E-S-
pig	PEP	-D-D-R-V-V-P-L-E-S-
<i>L. lactis</i>	X-PDP	-D-D-E-T-F-K-K-Y-S-
rat	DP-IV	-D-D-N-V-H-F-Q-Q-S-
human	DP-IV	-D-D-N-V-H-F-Q-Q-S-
yeast	DP-B	-D-D-N-V-H-F-Q-N-S-
<i>N. gonorrhoeae</i>	IgA1 peptidase	-D-D-Y-D-A-K-D-N-S-
<i>H. influenzae</i>	IgA1 peptidase	-D-D-K-Q-V-D-P-N-S-
<i>S. sanguis</i>	IgA1 peptidase	-D-D-T-R-Q-P-W-T-S-
human	prolidase	-E-E-D-V-V-V-I-D-S-
<i>E. coli</i>	prolidase	-E-E-A-F-R-S-G-M-S-
<i>B. coagulans</i>	proline iminopeptidase	-E-E-N-G-T---T-D-S-

Fig. 5. Sequence Homology Found in Several Proline Specific Peptidases³⁸⁾

N., *Neisseria*; *H.*, *Haemophilus*; *S.*, *Streptococcus*; other abbreviations: see Fig. 4.

功した.³⁸⁾ Ser 556, His 675 及び Asp 531 (又は Asp 640) が catalytic triad を形成している.³⁷⁾ この酵素は 705 アミノ酸残基からなるプロ体として生合成され, その N 末端領域 20 残基は塩基性アミノ酸とそれに続く疎水性アミノ酸からなり, シグナルペプチドとしての特徴を持っている. 大腸菌で発現された成熟酵素では 20 番目の Ala が N 末端アミノ酸であり, 一方, *Flavobacterium* で生成される成熟酵素では, Gln 21 が閉環した Pyr を N 末端としている.

その後, *Aeromonas hydrophila* の PEP 遺伝子も我々によってクローニングされたが, この酵素は *Flavobacterium* の PEP と 56%, ブタ脳 PEP と 41% の相同性を持つ.³⁸⁾ 丁度その頃, 我々は大腸菌の protease II の遺伝子のクローニングについても報告したが, 興味あることに, 本酵素は塩基性アミノ酸に特異性を示すにもかかわらず, 上述の微生物や動物起源の PEP とかなりの相同性を持つことが分かった.³⁹⁾ 活性部位と思われる C 末端領域では, 特に相同性が高い (Fig. 4).³⁸⁾ セリンプロテアーゼの活性部位セリン周辺に見られる Gly-X-Ser-X-Gly の共通配列もこれら酵素のすべてで観察される. しかし, それ以外では, その他のセリンプロテアーゼ (trypsin や subtilisin families など) とは全く相同性が認められない. これらの結果から我々はセリンプロテアーゼの新しいファミリーとして prolyl endopeptidase family の存在を提唱した.³⁸⁻³⁹⁾ アシルアミノ酸遊離酵素, dipeptidyl peptidase IV (Table II) やヒト 3P21 タンパク質もこのグループに含まれる.^{38,40)} なお, Pro に特異性を示すペプチダーゼに共通したアミノ酸配列として Asp-Asp-(X)₆-Ser (又は Glu-Glu-(X)₆-Ser) のモチーフが見られる (Fig. 5) が, この配列が何を意味するかは現在のところ, 分からない.

この外, プロリン特異性ペプチダーゼとして, 当研究室では, 大腸菌の aminopeptidase P (金属酵素),⁴¹⁾ *B. coagulans* の proline iminopeptidase (チオール酵素)⁴²⁾ の諸性質と遺伝子解析を報告しているが, これら酵素のアミノ酸配列にはこれまで報告されているタンパク質とほとんど相同性がない.

II. Prolyl Endopeptidase (PEP) 阻害剤

オランダの Wied 教授は vasopressin やその代謝産物 (Pyr-Asn-Cys(Cys)-Pro-Arg-Gly-NH₂ など) が学習獲得や記憶の保持に関係すると報告した.^{43,44)} もし, この仮設が正しいならば上記ペプチドを容易に分解する脳の PEP を阻害すれば記憶の保持に有効かも知れない. PEP 阻害剤は広く動物組織に分布するが, その活性はあまり強くない.⁴⁵⁾ そこで古川淳博士 (当時長崎大・薬・薬品合成化学教授, 現・名誉教授) に依頼して, 約 100 種の基質類似体を化学合成し, そのうち, Z-

thiopropylthiazolidine や Z-thiopropylthioprolinal が nm オーダーで PEP を強く阻害することを見出した。^{46,47)} これらを含めて幾つかの PEP 阻害剤はスコポリン誘発性実験的健忘ラットに対して抗健忘作用を示す。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 現在, PEP 阻害剤の幾つかについては臨床試験が進められている. 芳本はこれらの研究“プロリン特異性ペプチダーゼとそのインヒビターに関する研究”により平成3年3月, 栄えある日本薬学会奨励賞を受賞した.

III. 微生物起源の Dehydrogenases

1. 大腸菌由来 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase (7 α -HSDH) 動物において脂質の消化・吸収に機能する胆汁酸は, 極めて閉鎖的な腸肝循環を繰り返し, 血液中にはごく微量しか存在しない. しかし, 劇症肝炎や肝外閉塞性黄疸では血中濃度が著しく増大し, また肝硬変や原発性肝癌でもかなり増大することが知られている. 一次胆汁酸 (コール酸及びケノデオキシコール酸) はコレステロールから生合成され, 腸内細菌によって 3 α -,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholanate を経てデオキシコール酸 (二次胆汁酸) に変換される. この反応の第一段階に関与する酵素, 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase (7 α -HSDH) は大腸菌及び *Bacteroides fragilis* にその存在が報告されているが, 酵素の構造と機能の相関についてはほとんど知られていない. 我々は大腸菌 HB101 株の 7 α -HSDH 遺伝子のクローニング, 塩基配列決定並びに過剰発現に成功して, その性質を明らかにした.⁵¹⁾ 本酵素は 255 アミノ酸残基からなる分子量 26778 のタンパク質で 4 量体 (分子量 120 kDa) として存在する. NAD⁺ 依存性であり, N-bromosuccinimide や diethyl pyrocarbonate で阻害される. 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は short-chain non-metallo-alcohol dehydrogenase family に属する脱水素酵素群と高い相同性を示す. N 末端近くに NAD⁺ 結合部位に共通して見られる Gly-X-Gly-(X)₁₋₃-Gly のモチーフがある (Fig. 6). 阻害実験より Trp と His の重要性が示唆されたため, ただ 1 ヶ存在する Trp 238 を Leu に置換した変異酵素を調整したところ, 酵素活性は完全に消失した. しかし, この Trp は他の脱水素酵素では保存されておらず, その機能は現在のところ分からない. なお, この酵素の遺伝子は大腸菌クロモゾームの 1748,578 から 1750,378 kbp (36.36 分) に位置する.⁵²⁾ 現在, この酵素の X-線結晶構造解析は三井幸雄教授 (長岡技術科学大学) の研究室で進められている.

2. *Pseudomonas putida* 由来 Formaldehyde Dehydrogenase 酵素を用いた生体成分の臨床分析法は反応が室温で進行することや, 高い特異性と高度の検出感度並びに自動化が容易であるなどの利点があるために, 最近, 急速な進展をみせている. 血清クレアチニン (CRN) やクレアチンの酵素分析法も漸く確立されつつあるが, なお, 若干の問題を残している.^{53,54)} 我々は 1976 年来, 血清 CRN の酵素分析法を開発するため, CRN 代謝活性を持つ微生物を検索してきた.⁵⁵⁾ *Pseudomonas putida* は CRN を適応的に代謝してギ酸に変換する (Fig. 7).⁵⁴⁾ CRN 代謝に関与する creatinine amidohydrolase (creatininase),⁵⁶⁾ creatine amidinohydrolase (creatinase),⁵⁷⁾ sarcosine dehydrogenase,⁵⁸⁾ sarcosine oxidase,⁵⁹⁾ formaldehyde dehydrogenase⁶⁰⁻⁶³⁾ はそれぞれ我々の研究室で高度に精製され, その性質が明らかにされている.

Formaldehyde dehydrogenase (FDH) はその活性発現に NAD⁺ のほか, グルタチオン (GSH) を必要とするのが一般であり, class III alcohol dehydrogenase family に分類されている. しかし, *P. putida* の FDH は GSH を必要としない.⁶⁰⁾ この酵素は分子量 150 kDa の 4 量体として存在し, サブユニット当たり 2 ヶの Zn を含み, その 1 ヶは活性発現に, 他の 1 ヶは構造保持に関係している. また, この酵素は PCMB や DTNB 処理によって速やかに失活する.⁶³⁾ 最近, 我々はこの GSH-independent FDH のクローニング, 塩基配列決定及び過剰発現に成功した.⁶⁴⁾ 本酵素のサブユニットは 399 アミノ酸残基からなる分子量 42121 のタンパク質で, long-chain alcohol dehydrogenase family に属する酵素群と約 20% の相同性を示す (Fig. 8).

Fig. 7. Enzymatic Analysis of Creatinine and Creatine

A, creatinine deiminase (*Clostridium paraputrificum*, *Corynebacterium lilium*, *Bacillus* sp.); B, creatininase (*Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas putida*); C, creatinase (*Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *P. putida*); D, sarcosine dehydrogenase (*Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *P. putida*, rat liver mitochondria), sarcosine oxidase (*A. ureafaciens*, *Corynebacterium*); E, formaldehyde dehydrogenase, glutathione-independent (*P. putida*), formaldehyde dehydrogenase, glutathione-dependent (calf liver et al., *Kloeckera* sp., Baker's yeast); CPK, creatine phosphokinase (rabbit muscle et al.); LDH, lactate dehydrogenase (porcine liver et al., lactic acid bacteria); NTB, nitrotetrazolium blue; PMS, phenazine methosulfate.

NAD^+ 結合部位と推定される Gly-X-Gly-X-X-Gly を含めて、ほとんどの Gly はよく保存されている。また X-線解析によって、その高次構造と活性部位が明らかになっているウマ肝 alcohol dehydrogenase において Zn に配位すると報告されている Cys 46, His 67 や Cys 174 などは *Pseudomonas putida* の FDH でも保存されている。他の酵素には存在しない Cys 257 が GSH に代わって基質に結合する可能性が考えられるが、この問題は部位特異性変異法によって現在、解析中である。

おわりに

その外、我々の研究室では、くものすかび (*Rhizopus chinensis*) の酸性プロテアーゼ (Aspartic proteinase), 不完全菌, *Scytalidium lignicolum* のペプスタチン非感受性酸性プロテアーゼの構造・活性相関についても検討し、15 種の微生物酵素について遺伝子のクローニングと高発現を報告した。また、*Pseudomonas* 溶菌酵素, *Staphylococcus* 溶菌酵素, ヒト白血球リゾチームや、微生物由来デキストラン分解酵素などについても研究してきた。また、CPT-11 (抗癌剤) 変換酵素, かびの β -galactosidase, 腸内細菌の生産する salicylurate 水解酵素や β -glucuronidase などについても報告してきたが、これらについては紙面の都合もあってここでは割愛する。

追記 最近、金属プロテアーゼを thermolysin, astacin, serratin, matrix 及び snake venom metalloprotease families の 5 種に分類することが提唱されている。後 4 者では 3 ケの His と 1 ケの Tyr が Zn-ligands であると推定されている。⁶⁵⁾ しかし、その外に、金属プロテアーゼのグループとして insulinase family を加えるべきであろう。^{66, 67)}

[1] FDH	1	30	60	90
	-SGNRGVVYLGSQKVEVQKIDYPMQDPRGKKIEHGVLKVSTNI	SGS	QHMVRGR--TTAQVGLVLSEITSEVIEKERDLEN--LQIGLVSVPFNV	
[2] Horse E	1	30	60	90
[3] Human-I α	-STAGKVIKCAAVLWEEKPFSEIEVE	APKKAHVRIKIVATGICRS	DHVSGT--LVTPLEVIASHEAAGISIESIEGVIT--VRPCKVIPLFTP	
[4] Human-II	-STAGKVIKCAAAIWEAGKPLCIEEVE	APKKAHVRIQIIATSLCHT	DHVSGT--NVTPLEVILSHEAAGISIESIEPGITN--VKPCKVIPLAIP	
[5] Human-III	---ANEVIKCAAAVAWEAGKPLSIEEIE	APKKAHVRIKIIATAVHT	AYTLSGA-DPEGCFVILSHEAAGISIESIEPGITN--VKPCKVIPLYAP	
[6] Quail	-STAGKVIKCAAVLWEANKPFSLEEVE	APKKAHVRIKIVATGICRS	DHVVTGA--LAMPFVILSHEAAGISIESIEGVIT--LKPCKVIPLFVP	
[7] Frog	-ATAGKVIKCAAVCWGPKQPLSIEEIE	APKKAHVRIKIVATGICRS	DHVISGA-LSDMKFVILSHEAAGISIESIEGVIT--FKPCKVIPLFVP	
[8] Cod-I	-ATGVKVIKCAAAVAWEANKPLVIEEIE	APKKAHVRIKIIATGVHT	LYHLFEG-KHKDGFVILSHEAAGISIESIEGVIT--FQPCKVIPLFIS	
[9] Potato	STTVGVIRKCAAAVAWEAGKPLVMEVD	APKKAHVRLKILYTSLEHT	VYFWEAK-GQNPVFRILSHEAAGISIESIEGVIT--LAPCKVPLVFTG	
[10] Yeast 1	---SIPETQKGVIFYESHGKLEHKDIP	PKKKAHVRLINVKYSGVHT	LHAMHGDWPLPVKLPLVGSHEAAGISIESIEGVIT--LAPCKVPLVFTG	
[11] <i>Aspergillus</i>	---MSVPEVQAAQVVEKAGTPPVYKQVP	PKKKAHVRLILVKMYSGVHT	LHAMKGDWPLPSKMLIGSHEAAGISIESIEGVIT--LAPCKVPLVFTG	
		+	+	+
[1] FDH	120	150	180	
	-AECRSKEMHTGVLTNPARAGG-----	AYGYVDMGDWTGGQAEY	L-LVPYADFNLLKLPDRDK-AMEKIRDLTCL-SDILP	GYHGAVTAG-VG
[2] Horse E	120	150	180	
[3] Human-I α	-QCKRVEKHPGNEFLKNDLSMPRG----	TMQDGTSRFTCRGKPIHHF	LGTSTESQVTVVDEISVAKIDAAAPLEKVCILIGGFS	GYGSAVVKAVVT
[4] Human-II	-QCKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	LGISTESQVTVVDENAVAKIDAAAPLEKVCILIGGFS	GYGSAVNVAVVT
[5] Human-III	-LCKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	FGTSTESQVTVVSDINLAKIDDDANLRCVCLIGGFS	GYGAANNKAVVT
[6] Quail	-QCKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	MGTSTESQVTVVADISVAKIDPLAPLQKVCILIGGFS	GYGAANNKAVVT
[7] Frog	-QCKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	IGTSTESQVTVVHETAAAKIDDAAPLEKVCILIGGFS	GYGSAVVKAVVT
[8] Cod-I	-QCKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	ISTSTESQVTVVDEISVAKIDDAAPLEKVCILIGGFS	GYGSAVNVAVVT
[9] Potato	-ECKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	LGTSTESQVTVVQIAVAKIDPSAPLQKVCILIGGFS	GYGAANNKAVVT
[10] Yeast 1	-ECKRVEKHPGNEFLKNDVSNPQG----	TLQDGTSRFTCRGKPIHHF	VGTSTESQVTVVHGVCAVAKIDPLAPLQKVCILIGGFS	GYGSAVNVAVVT
[11] <i>Aspergillus</i>	GSEYAEVYELGNESENPHADLSG-----	Y	THDGSQQVATADAVQAANIPQGTDAQVAPILAGI	IVYKALKS-ANLM
	GSEYAEVYELGNESENPHADLSG-----	Y	TVDGTQQVATIGKAAASKIPDNVPLDAAAPILAGI	IVYKLGKE-SCAR
		+		
[1] FDH	210	240	270	
	PESTVYVIAEA-EPVELAAASARILLAAVIVIGLNP	PARLAHAKAQE-FE	IADLSLDTPLHEQIAA--LL	EEPEVDCAVDAVG-FEARGHGHEGAKHEA
[2] Horse E	210	240	270	
[3] Human-I α	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[4] Human-II	QESTCEVFEL-EGVELSAINGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CINPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[5] Human-III	QESTCEVFEL-EGVELSAVINGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CINPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[6] Quail	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[7] Frog	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[8] Cod-I	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[9] Potato	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[10] Yeast 1	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
[11] <i>Aspergillus</i>	QESTCEVFEL-EGVELSVIMGCKAAEASIIIGV	LNDKFAKAKEEATE	CYNPDQYKKPIQEVLTMSNG--VDVSFEVIGRLD	TMVATLSCCQEAYE
		+	+	+
[1] FDH	300	330	360	
	PATVLNLSMQVTRVAGKIGIPGLVYTPDPAVEPAKIGLSIR	FLGLWA	KSHSFHTGQTPVMKYNRLM	QAINMWRINIAEVVGVQVISLDDARVAMAR
[2] Horse E	300	330	360	
[3] Human-I α	VSVIVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[4] Human-II	TSVIVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[5] Human-III	SCTFIEVAAGSGKLTIFPEELIGRTINGTFF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[6] Quail	VSVIVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[7] Frog	VSVIVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[8] Cod-I	KTIVIVELAPSSAVMSFDPMLIFSGRTWKSVM	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[9] Potato	VSVIVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[10] Yeast 1	VAVLVVPPDSQNLNMPMLLSGRTWKGAIF	EGFKSKDSVPKLVADFMA	KKFALDPLITHVLPFEKINEGFDLLRSE-SISTILTF	
[11] <i>Aspergillus</i>	TTVLVVPAGAKCCSDVFNQVVK---	SISIVSYVGNRADREALDFFA	R--GLVKSPIKVVGLSTLPEIYKMEKEQIVGVVVDTSK	
	SVVAIVELPANAFKAPVFTTVVR---	MINIKESYVGNRADREALDFFA	R--GLIKAPFKKAPLDQLPQIFELMGQEKIAGI	IVVLEIPE
		+		

Fig. 8. Alignment of Amino Acid Sequence of *P. putida* Formaldehyde Dehydrogenase with Those Belonging to the Long-chain Alcohol Dehydrogenase Family⁽⁶⁴⁾

Black background residues are conserved in all enzymes belonging to the family. + at the bottom of sequences indicate the strictly conserved amino acid. Horse E, horse liver ethanol active alcohol dehydrogenase; Human I α to III, human liver alcohol dehydrogenase isozymes.

謝辞 これらの研究は大阪市立大学・理学部及び長崎大学・薬学部において多くの研究者との共同研究の成果であり、その間、25 年間、研究を共にしてきた芳本 忠助教授を始め、藤原邦雄、大串 伸、伊藤 潔博士及び大学院の諸氏に深甚なる謝意を申し上げる。また、本研究の一部は村尾澤夫（現熊本工業大学教授）、石黒正路、今城清一（サントリー生医研）、小久保利雄、稲岡哲哉（チバ・ガイギー国際研）、古川 淳、北川常広、金戸 洋（長崎大・薬）の諸博士の協力によるものであることを付記して謝意に代えます。また、本研究の機会を与えられ、終始ご指導を頂いた恩師故福本寿一郎先生、山本武彦教授（大阪市大名誉教授）に厚く御礼申し上げますと共に、本総説を発表する機会を与えて頂いた本誌編集委員の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) 福本寿一郎, 鶴 大典, 科学と工業, **34**, 184, 205, 402 (1960).
- 2) J. Fukumoto, T. Yamamoto, D. Tsuru, *Nature* (London), **180**, 438 (1957).
- 3) D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 288, 295 (1962); *idem, ibid.*, **27**, 279 (1963).
- 4) D. Tsuru, T. Yoshimoto, Microbial Proteases in "Handbook of Microbiology," 2nd Ed., Vol. III, ed. by A. L. Laskin, CRC press, Florida, 1987, pp. 239—283.
- 5) 鶴 大典, 船津 勝, 編, "蛋白質分解酵素 I, II (生物化学実験法 31, 32)," 学会出版センター, 1993.
- 6) D. Tsuru, J. D. McConn, K. Yasunobu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 376 (1964); *idem, J. Biol. Chem.*, **239**, 3706 (1964); *idem, ibid.*, **240**, 2415 (1965).
- 7) D. Tsuru, H. Kira, T. Yamamoto, J. Fukumoto, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 651, 856, 1164, 1261 (1966).
- 8) D. Tsuru, H. Kira, T. Yamamoto, J. Fukumoto, *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 330 (1967).
- 9) D. Tsuru, T. Yoshimoto, H. Kira, J. Fukumoto, *Int. J. Prot. Res.*, **2**, 75 (1970).
- 10) K. Titani, M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, *Nature* (London), *New Biol.*, **238**, 35 (1972).
- 11) B. W. Matthews, J. N. Jansonius, D. M. Colman, B. P. Schoenborn, D. Durpourgue, *Nature* (London), *New Biol.*, **238**, 37 (1972).
- 12) H. M. Holden, D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Biochemistry*, **26**, 8542 (1987).
- 13) 鶴 大典, 入江昌親, 新田康則, 編著, "酵素: ヒドロラーゼ, タンパク質化学 4," 広川書店, 東京, 近刊.
- 14) W. Bode, F. X. Gomis-Ruth, R. Huber, R. Zwilling, W. Stocker, *Nature* (London), **358**, 164 (1992).
- 15) R. Kobayashi, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2737 (1989).
- 16) T. Yoshimoto, H. Oyama, T. Takeshita, D. Tsuru, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 370 (1990).
- 17) D. Tsuru, T. Yoshida, T. Hirose, T. Yoshimoto, J. Fukumoto, *Int. J. Prot. Res.*, **2**, 257 (1970).
- 18) R. Kobayashi, A. Kanatani, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **106**, 1110 (1989).
- 19) S. Morikawa, A. Kanatani, R. Kobayashi, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2751 (1991).
- 20) S. Morikawa, A. Kanatani, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2099 (1991).

- 21) D. Tsuru, J. Imajo, S. Morikawa, T. Yoshimoto, M. Ishiguro, *J. Biochem.*, **113**, 101 (1993).
- 22) D. Tsuru, Y. Fujita, S. Morikawa, K. Ito, T. Yoshimoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1275 (1992).
- 23) 鶴 大典, 微生物, **5**, 322 (1989); *idem*, 農化, **65**, 52 (1993).
- 24) T. Yoshimoto, H. Oyama, T. Honda, T. Takeshita, T. Kamiyama, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **103**, 1060 (1988).
- 25) H. Oyama, T. Yoshimoto, T. Takeshita, D. Tsuru, *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 289 (1989).
- 26) 鶴 大典, 蛋白質 核酸 酵素, **25**, 490 (1980); *idem*, *ibid.*, **28**, 1349 (1983).
- 27) D. Tsuru, K. Fujiwara, K. Kado, *J. Biochem.*, **84**, 467 (1978).
- 28) D. Tsuru, K. Nakamura, T. Yoshimoto, K. Fujiwara, *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 117 (1984).
- 29) K. Fujiwara, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **83**, 1154 (1978).
- 30) K. Fujiwara, E. Matsumoto, T. Kitagawa, D. Tsuru, *Biochim. Biophys. Acta*, **655**, 10 (1981); *idem*, *ibid.*, **702**, 149 (1982); *idem*, *J. Biochem.*, **90**, 433 (1981).
- 31) T. Yoshimoto, T. Shimoda, C. Kabashima, K. Ito, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **113**, 67 (1993).
- 32) R. Walter, H. Shlank, J. D. Glass, T. L. Schwartz, T. D. Kerenyi, *Science*, **173**, 827 (1971).
- 33) T. Yoshimoto, R. C. Orlowski, and R. Walter, *Biochemistry*, **16**, 2942 (1977); *idem*, *ibid.*, **17**, 4139 (1978).
- 34) T. Yoshimoto, K. Ogita, R. Walter, M. Koida, D. Tsuru, *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 184 (1979).
- 35) T. Yoshimoto, R. Walter, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2417 (1978); *idem*, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4786 (1980).
- 36) T. Yoshimoto, K. Kanatani, T. Inaoka, T. Kokubo, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **110**, 873 (1991).
- 37) 大隈豊美, 稲岡哲也, 十亀弘子, 菊地武司, 阿部美子, 滝本 京, 芳本 忠, 小久保利雄, 鶴 大典, 第 43 回タンパク質構造討論会, **65**, 1992.
- 38) A. Kanatani, T. Yoshimoto, A. Kitazono, T. Kokubo, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **113**, 790 (1993).
- 39) A. Kanatani, T. Masuda, T. Shimoda, F. Misoka, S-L. Xu, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **110**, 315 (1991); *idem*, *J. Bacteriol.*, **174**, 7881 (1992).
- 40) A. J. Barrett, N. D. Rawling, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **373**, 353 (1992).
- 41) T. Yoshimoto, H. Tone, T. Honda, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **104**, 93 (1988); *idem*, *ibid.*, **105**, 412 (1989).
- 42) A. Kitazono, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *J. Bacteriol.*, **174**, 7917 (1992).
- 43) D. de Wied, B. Bohus, *Nature (London)*, **212**, 1484 (1966).
- 44) P. H. Burbach, G. L. Kovacs, D. de Wied, J. W. Van Nispen, H. M. Greven, *Science*, **221**, 1310 (1983).
- 45) T. Yoshimoto, K. Tsukumo, N. Takatsuka, D. Tsuru, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 734 (1982).

- 46) D. Tsuru, T. Yoshimoto, N. Koriyama, S. Furukawa, *J. Biochem.*, **104**, 730 (1988).
- 47) T. Yoshimoto, D. Tsuru, N. Yamamoto, R. Ikezawa, S. Furukawa, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 37 (1991).
- 48) T. Yoshimoto, F. Matsubara, K. Kado, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **98**, 975 (1985); *idem*, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 730 (1987).
- 49) 芳本 忠, 鶴 大典, 化学と生物, **25**, 554 (1987).
- 50) 鶴 大典, 芳本 忠, バイオインダストリー, **4**, 788 (1987); *idem*, バイオサイエンスとインダストリー, **46**, 3816 (1988).
- 51) T. Yoshimoto, H. Higashi, A. Kanatani, S-L. Xu, H. Nagai, H. Oyama, K. Kurazono, D. Tsuru, *J. Bacteriol.*, **173**, 2173 (1991).
- 52) T. Yoshimoto, H. Nagai, K. Ito, D. Tsuru, *J. Bacteriol.*, **175**, 5730 (1993).
- 53) 鶴 大典, *Amino Acids, Nucleic Acids*, **35**, 31 (1977); *idem*, 臨床検査, **22**, 1331 (1978).
- 54) 鶴 大典, “酵素—バイオテクノロジーへの指針—,” 左右田健次編, 朝倉書店, 1985, pp. 94—110.
- 55) D. Tsuru, I. Oka, T. Yoshimoto, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1011 (1976); *idem*, *Amino Acids, Nucleic Acids*, **35**, 31 (1977).
- 56) K. Rikitake, I. Oka, M. Ando, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **86**, 1109 (1979).
- 57) T. Yoshimoto, I. Oka, D. Tsuru, *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 508 (1976).
- 58) I. Oka, T. Yoshimoto, K. Rikitake, S. Ogushi, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1197 (1979).
- 59) S. Ogushi, K. Nagao, S. Emi, M. Ando, D. Tsuru, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1445 (1988).
- 60) M. Ando, T. Yoshimoto, S. Ogushi, K. Rikitake, S. Shibata, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **85**, 1165 (1979).
- 61) S. Ogushi, M. Ando, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 597 (1984).
- 62) S. Ogushi, M. Ando, D. Tsuru, *J. Biochem.*, **96**, 1587 (1984).
- 63) S. Ogushi, M. Ando, D. Tsuru, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2503 (1986).
- 64) K. Ito, M. Takahashi, T. Yoshimoto, D. Tsuru, *J. Bacteriol.*, in press.
- 65) W. Jiang, J. S. Bond, *FEBS Lett.*, **312**, 110 (1992).
- 66) A. B. Becker, R. A. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3835 (1992).
- 67) A. B. Becker, R. A. Roth, *Biochem. J.*, **292**, 137 (1993).