

博士論文

エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼ“Eryngase”

の構造－機能解析

(Study on structure and function of eryngase, a serine aminopeptidase from
Pleurotus eryngii)

鳥取大学大学院 連合農学研究科

生物資源科学専攻

東海 彰太

2018

目次

略語表.....	4
序論.....	5
第1章 非触媒 β -プロペラドメインの酸化によるエリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの基質特異性への影響	9
第2章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの基質の通り道にあるメチオニン残基は基質認識のカギとなる	15
第3章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの β -プロペラドメイン上の環構造を持つ残基が芳香環基質の認識に関わる	21
第4章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの Met 残基の酸化と変異によるアミノリシス活性への影響	29
結論と考察.....	35
材料と方法.....	42
謝辞.....	46
参考文献.....	47

Supplementary material	53
要旨	60
Abstract	62
学位論文に関する投稿論文	64

略語表

Amp	Ampicillin
ANS	1 8- anilino naphthalene sulfonate
BSA	bovine serum albumin
DTT	Dithiothreitol
D.W.	deionized water
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LB	Luria-Bertani
LC	liquid chromatography
MS	mass spectrometry
OBzl	benzyl ester
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
pNA	<i>p</i> -nitroanilide
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N,N-tetraethylenediamine
Tris	Tris (hydroxy methyl) amino methane

アミノ酸は3文字または1文字で以下の表記に従った。

アミノ酸名	3文字表記	1文字表記	アミノ酸名	3文字表記	1文字表記
グリシン	Gly	G	トレオニン	Thr	T
アラニン	Ala	A	システイン	Cys	C
バリン	Val	V	チロシン	Tyr	Y
ロイシン	Leu	L	アスパラギン	Asn	N
イソロイシン	Ile	I	グルタミン	Gln	Q
メチオニン	Met	M	リジン	Lys	K
トリプトファン	Trp	W	ヒスチジン	His	H
フェニルアラニン	Phe	F	アルギニン	Arg	R
プロリン	Pro	P	アスパラギン酸	Asp	D
セリン	Ser	S	グルタミン酸	Glu	E

序論

プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) family (clan SC, family S9 in the MEROPS peptidase database [1], <http://merops.sanger.ac.uk/>) に属する酵素は自然界に広く分布している [2]。POP family に属する酵素は、アミノ酸配列と生化学的特徴に基づいて、さらに4つのサブファミリー (S9a, S9b, S9c 及び S9d) に分類されている。ヒトが持つ S9a POP は、記憶プロセスの調節に働く神経ペプチドの分解に関与し、アルツハイマー病に関わると考えられている [3]。一方で、S9a に属す oligopeptidase B (OpdB) はトリパノソーマ病を引き起こす *Trypanosoma brucei* と *T. evansi* の病原因子の一つであると考えられている [4,5]。従ってドラッグデザインにおいて、S9 POP の基質認識と触媒部位への基質の取り込みの機構は重要である。

立体構造において、S9 POP は特徴的な付属構造の β -プロペラドメインと触媒三残基 Ser/His/Asp がある α/β hydrolase catalytic domain (触媒ドメイン) から構成されている [6-9]。 β -プロペラドメインは大きな基質が触媒ドメインにある触媒部位への侵入を物理的に阻害する蓋の役割を持つため [7]、多くの S9 POP は、オリゴペプチド以下の大きさの基質を認識し、アミド結合を加水分解する [6,10,11]。前者の付属ドメインは後者の触媒ドメインにある活性部位を覆っており、酵素表面から活性中心までは、二つの通路が存在する (Fig. 1A)。現在、基質取り込みの経路について二つの有力な説があり、一つは β -プロペラドメインの頂

点に空いた穴を通る経路[12]、もう一つは本ドメインの最初と最後の逆平行 β -シートの隙間を通る経路[13,14]が考えられている(Fig. 1B)。また、 β -プロペラドメイン上の最初と最後の逆平行 β -シート間の距離の違いが、基質に対してフィルターとして働くと考えられている。その一方で、基質の侵入は β -プロペラドメインの動的変動[15]や本ドメインのループの配向の変化[16-19]によって調節されているとも考えられている (Fig. 1C)。しかし、上記仮説の証明は困難であり、S9 POP の基質認識や取り込み機構の詳細は未解明のままである。

一方で、いくつかの S9 POP の酵素活性は、チオール反応試薬や塩の影響を受けることが知られている。例えば、*T. brucei* 由来の OpdB の 3 つのシステイン残基は、チオール反応の鍵となっており、還元剤が酵素の立体構造変化に関与し、酵素活性を増強すると考えられている [20]。しかし、*Streptomyces griseus* 由来の OpdB のシステインフリー変異酵素においても一般的なチオール反応試薬によって顕著に活性化されるため、立体構造変化と活性増強の効果はチオール非依存の仕組みに起因する[21]。また、塩も S9 POP の酵素活性に影響し、豚由来 POP の活性が高濃度の塩化ナトリウムによって強化された[22]。POP の触媒の律速段階と考えられている立体構造変化は、pH や塩濃度といったいくつかの要因に影響されるという報告もある [22-24]。さらに、豚由来 OpdB の酵素速度論的解析から、高濃度の NaCl の存在によって基質特異性が変化することが明らかになっている[25]。しかし現在、基質特異性変化に関連する構造変化の詳細は未解明であるため、基質特異性の変化を誘導する要因を特定することで、S9 POP の基質認識機構の新たな知見が期待できる。

我々はこれまでに S9 POP に属すアミノペプチダーゼをエリンギから見出し、Eryngase と命名した[26,27]。そして、本酵素の基質特異性は、過酸化水素を用いた酸化処理によって変化することが観察された。この現象は、本酵素の精製段階で基質に対する反応性が異なるフラクションが発見され、その原因が酸化であるという予測から見出された。具体的には、疎水性クロマトグラフィー精製において、L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対して反応性が異なる 2 種類のフラクション（両基質への活性有り と L-Leu-pNA に対する活性低下のフラクション）が観察され、当時のクルード酵素溶液が古い状態（数週間放置後）であったことから、この特異性変化は本酵素の自然な酸化が原因であると予測された。この変化は、ANS を用いた立体構造変化の検討から、蛍光度の上昇が観察されなかったため (Fig.S1)、立体構造の大きな崩れを伴わない局所的な構造変化に起因すると考えられた。従って本研究では、本酵素の酸化に伴う基質特異性の変化に着目し、この特異性変化の鍵となるアミノ酸残基の特定を試みた。さらに、酸化した Eryngase についてペプチド結合形成反応を触媒するアミノリシス活性への影響を評価した。

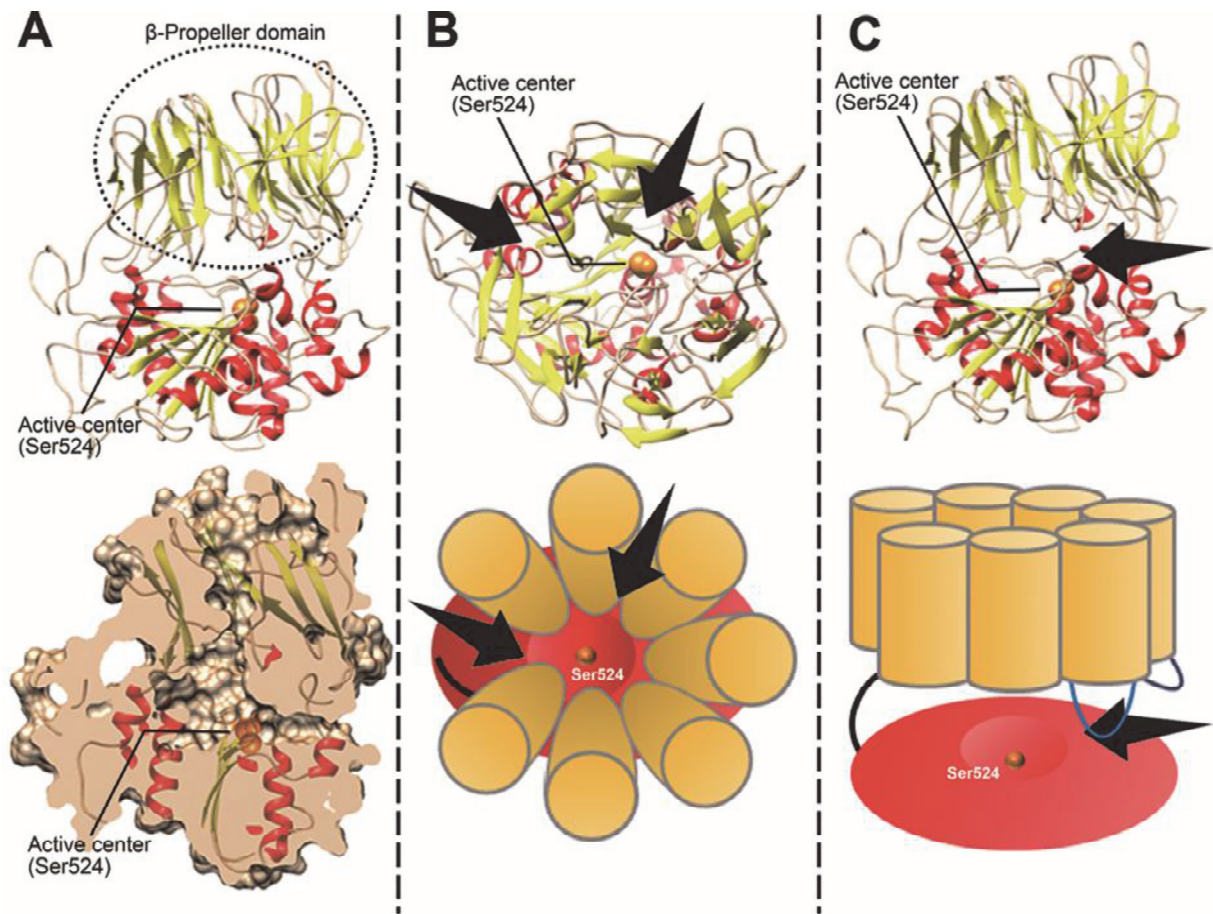


Fig. 1. S9 プロリルオリゴペプチダーゼの基質取り込みの予測された経路。A: eryngase の予測された立体構造。上のパネルは本酵素の全体リボンモデルを示している。活性中心の Ser524 はオレンジの玉で示している。下のパネルは上と同じアングルで縦に切った断面図を示している。 α -ヘリックスと β -シートはそれぞれ赤と黄色で示している。B: 本酵素の β -プロペラドメインを上から見た図。上と下のパネルはリボンモデルと単純化した模式図をそれぞれ示している。予測された基質取り込み経路は、 β -プロペラドメインの側面の隙間と頂上の矢印で示している。C: 本酵素を横から見た図。上と下のパネルはリボンモデルと単純化した模式図をそれぞれ示している。蝶番の反対側にある β -プロペラドメインのループは薄い青と濃い青で示している。予測される基質の取り込み経路を矢印で示している。

第1章 非触媒 β -プロペラドメインの酸化によるエリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの基質特異性への影響

本酵素の基質取り込みの機構はまだ不明であるが、S9 POP の複雑な基質認識機構は、チオール反応試薬[28,29]や pH、塩[30-33]といった化学的処理により、酵素の基質特異性の変化や活性の増強に寄与すると考えられる。従って、化学的処理による顕著な変化は、S9 POP の詳細な基質認識機構への考察を提供すると期待できる。我々は *Pleurotus eryngii* 由来の S9 POP である Eryngase もまた、過酸化水素による酸化処理に伴い基質特異性の変化を示すことを見出した。本章では、我々が酸化により本酵素の基質特異性を変化させる鍵となるアミノ酸残基として Met203 を特定したことを報告する。興味深いことに、本残基は機能の詳細が未解明である非触媒 β -プロペラドメインの表面に位置していた。そこで、基質認識における本残基の役割の解明するため、我々は Met203 の変異解析を行い、構築した変異酵素の基質特異性を評価した。

結果

1.1. 過酸化水素処理に伴う Eryngase の基質特異性の変化

Fig. 2A に示す通り、野生型 Eryngase の L-Phe-pNA に対する pNA 遊離活性は 20 min まで増加し、その後、時間経過に従い徐々に低下したが、一方で L-Leu-pNA に対する活性は 60 min 以内に劇的に低下した。L-Leu-pNA と同様に、L-Pro-pNA と L-Ala-pNA に対する pNA 遊離活性も 1% 過酸化水素処理で 60 min 処理することで著しく低下したが、一方で L-Phe-pNA に対する触媒作用は基本的に影響が観察されなかった。未処理及び酸化処理した Eryngase の L-Phe-pNA/L-Leu-pNA の pNA 遊離活性の割合 (Phe/Leu 比) はそれぞれ 3.1 と 22.8 であり、この結果から比較的短い酸化条件 (1%過酸化水素 1 時間) で本酵素の基質特

異性が変化したことが示唆された。

S9 POP の基質特異性の変化は、チオール反応試薬や塩によって引き起こされることが以前に報告されている[13,17]。本研究において、Eryngase の活性はチオール反応試薬や塩によって低下するのみで、基質特異性の変化や活性の増強は観察されなかった (Fig. S2)。

Cys は酸化されやすいアミノ酸残基として知られている。そこで、我々は Eryngase を構成するそれぞれの Cys を Ala に置換した変異酵素を作製し、過酸化水素処理に伴うそれらの変異酵素の基質特異性を評価した。変異酵素の Phe/Leu 比は、野生型酵素に近く (3.1 to 3.6)、変異は Eryngase の基質特異性にあまり影響しないことが示された (Fig. S3A)。さらに、それらの変異酵素は 60 min の 1%過酸化水素処理によって、野生型酵素と似た基質特異性変化を示した (Fig. S3B)。これらの結果から、酸化に伴う基質特異性の変化は、Cys は関与しておらず、他の酸化されやすいアミノ酸残基が関わることを示唆された。

1.2. 酸化部位の特定

酸化された領域は、本酵素を 1%過酸化水素で短時間 (0 と 60 min) もしくは長時間 (480 min) 処理し、トリプシンで切断後、ペプチド断片を MALDI-TOF MS で解析することで特定した。 m/z 2426 の断片が 60 min の過酸化水素処理により減少し、 m/z 2442 の断片が増加した (Fig. 3A)。480 min 処理後、 m/z 2426 の断片は消失し、 m/z 2442 に相当する小さなピークが残った。これらの結果から、 m/z 2426 の断片が酸化されたアミノ酸残基を含み、この分子質量から Leu193-Arg211 の断片が該当することが示唆された。この断片のアミノ酸配列は LVWLQWFHPDMPWEGSELR であり、Eryngase の予測構造上、本酵素の β -プロペラドメインの表面に位置し (Fig. 3B)、活性部位とは遠く離れていた (Fig. 3C)。本領域において、我々は本酵素のアミノ酸配列で 203 番目の残基である Met を見出した。Met は比較的酸化されやすく、メチオニンスルフォキシドに酸化され得る。

我々は m/z 2426 の断片が Leu193-Arg211 に相当するか調べるため、M203A 変異酵素を作製し、そのトリプシン処理断片を MALDI-TOF MS 解析で評価することで確認した。M203A 変異酵素の Leu193-Arg211 に相当する m/z 2368 の断片は、未処理の野生型酵素のトリプシン消化物で観察された m/z 2426 の断片に置き換わる形で、未処理の M203A 変異酵素において観察された(Fig. 3A)。さらに、 m/z 2368 + 16 の断片は酸化処理した M203A 変異酵素のトリプシン消化物では観察されなかった。これらの結果から、 m/z 2426 の断片は Leu193-Arg211 に相当し、Met203 が酸化されたと予測された。

1.3. Met203 の変異に伴う基質特異性への影響

Met203 の Ala への変異に伴う Eryngase の基質特異性への影響は、1%過酸化水素を用いた短い酸化 (1 h) による特異性変化と似ており、Phe/Leu 比は 14.5 を示した (lower panel of Fig. 1B)。さらに、M203A 変異酵素について、1% 過酸化水素で 60 min 処理しても Phe/Leu 比はほとんど影響を受けなかった (Phe/Leu 比は 16.6, Fig. 2B の下側パネル)。M203A 変異酵素の L-Phe-pNA に対する活性は、短い過酸化水素を用いた酸化処理により、活性が上昇することなく時間経過に従って徐々に低下した(Fig. 2B の上側パネル)。これらの結果から、Met203 の酸化が起因して本酵素の基質認識が変化したと考えられた。

酸化される Met203 の構造改変が及ぼす基質特異性への影響は、様々な変異酵素の構築とそれらの両基質に対する触媒能を検討することで評価した。Table 1 に示すように、変異は反応速度と基質親和性の両方に影響した。酸化した野生型酵素の L-Phe-pNA に対する k_{cat} は 4300 s^{-1} であり、未処理の野生型酵素の約 2 倍の値を示した。L-Phe-pNA に対する k_{cat} の著しい減少が、Met203 を Phe に置換した変異酵素でのみ観察された。一方で、Met203 の Phe への変異による L-Phe-pNA に対する K_m への影響は小さかったが、対照的に酸化処理した本酵素の L-Phe-pNA に対する K_m は 6.2 mM であり、野生型酵素の 100 倍の値を示した。

これらの結果からも、Met203の酸化は、本酵素の特異性変化を引き起こすと考えられた。

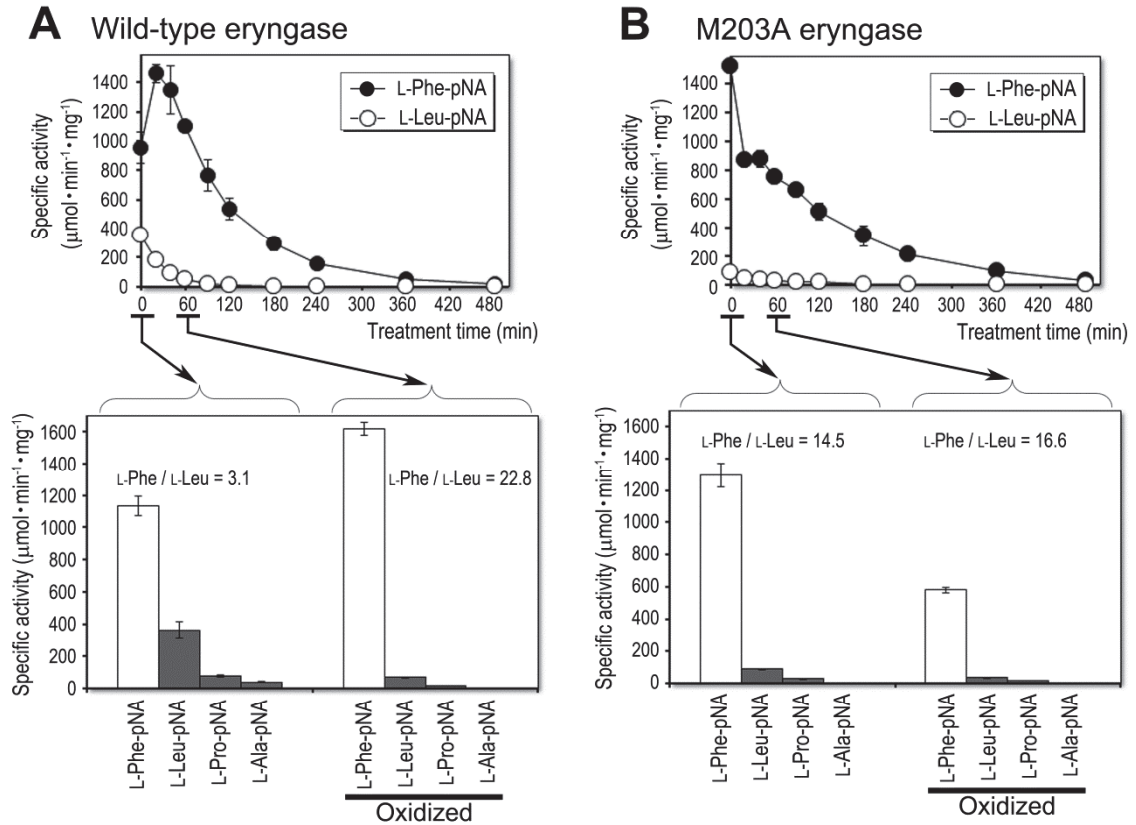


Fig. 2 野生型酵素 (A) と M203A (B) eryngase の pNA 遊離活性。両パネルにおいて、上側のパネルは、L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する活性への酸化の時間依存性を示している。酵素は 1%過酸化水素で処理されている。下側のパネルは酵素のそれぞれの基質に対する比活性を示している。“Oxidized” は 1%過酸化水素を用いて 60 分間 30°C で処理した酵素を示している。L-Phe-pNA/L-Leu-pNA の比率はそれぞれのパネルに示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

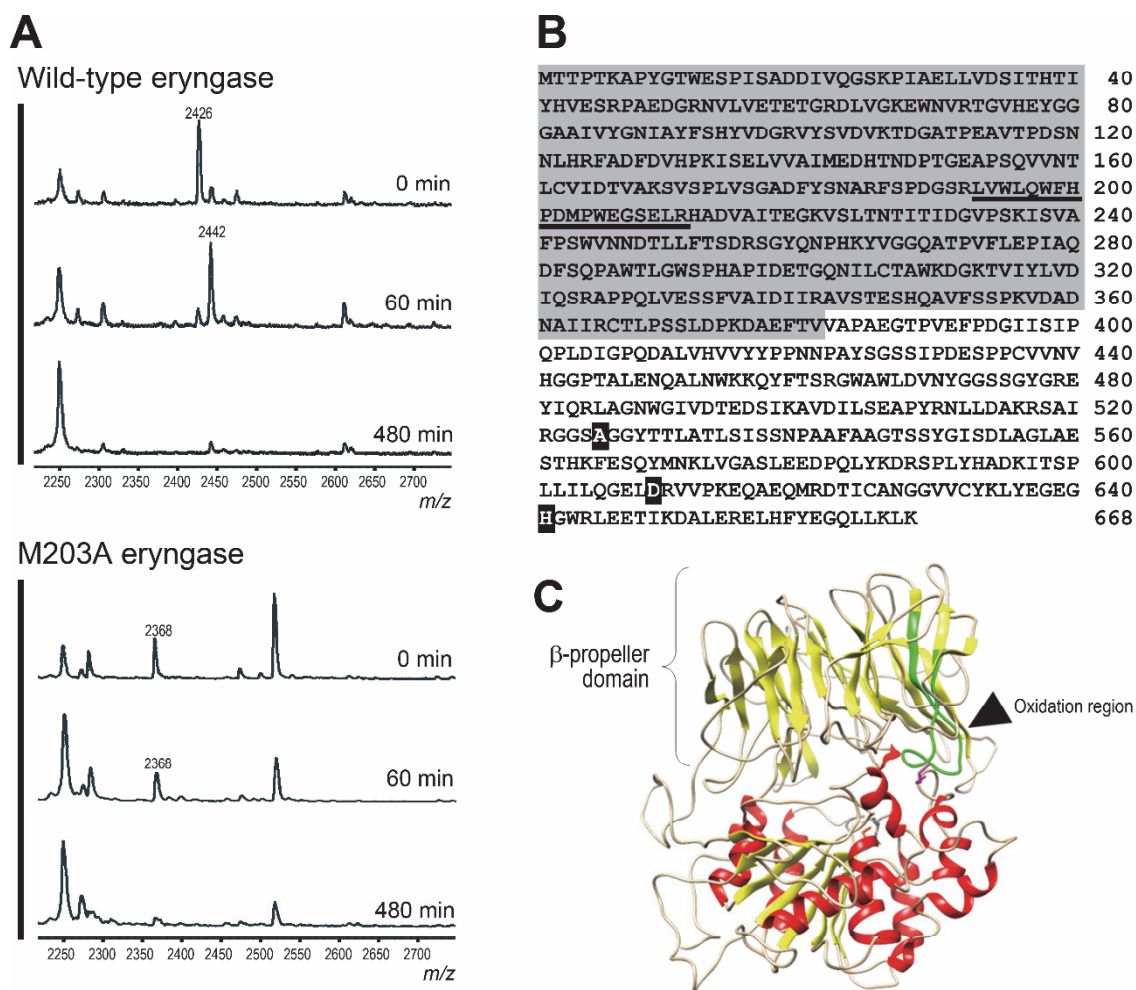


Fig. 3 最初に酸化される領域の特定。A: 1%過酸化水素でそれぞれの時間処理した野生型と M203A 変異酵素のトリプシン消化断の MALDI-TOF MS 解析。B: eryngase のアミノ酸配列。β-プロペラドメインを灰色、触媒三残基を白字の網掛けで示している。Leu193 から Arg211 のβ-プロペラドメインの領域を下線部で示している。C: 本酵素の予測された三次構造。本酵素のアミノ酸配列は Protein Data Bank に 3AZO として登録されている相同性を示す酵素[34]とアライメントし、この情報を本酵素のホモロジーモデルを作成するため SWISS-MODEL Website (<http://swissmodel.expasy.org>) [35]に提出した。特定された最初に酸化される領域を緑で示している。

Table 1 本酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する K_m と k_{cat} 値。

Substrate	L-Phe-pNA			L-Leu-pNA		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
Wild-type	1900	0.063	30000	570	0.12	4900
Oxidized	4300	6.2	700	6.4	0.72	8.9
M203A	1600	0.2	8200	230	1.9	120
M203S	2100	0.15	14000	170	1.0	160
M203L	1100	0.076	14000	260	0.19	1400
M203F	14	0.054	260	3.4	0.16	22
M203D	820	0.18	4500	12	0.78	15
M203K	880	0.18	4900	26	0.37	71

第2章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの基質の通り道にあるメチオニン残基は基質認識の鍵となる

我々は非触媒 β -プロペラドメインのループ上にある Met203 を本活性変化の鍵となる残基として特定した[36]。Met203 は S9 POP の推定上の基質の通り道の一つに位置していた。S9 POP の全体構造は互いに似通っているため、Met203 を介する基質の通り道は基質を酵素内に取り込む共通する経路である可能性がある。しかし、Eryngase を構成する Met203 や他の酸化しやすい残基が基質特異性に与える詳細な機構は未解明である。本章では、我々は酸化で基質特異性を変化させる他の鍵となる残基として Met570 を新たに特定したことを報告する。Met570 は Met203 と同じ推定上の基質の通り道に位置する。我々は非触媒 β -プロペラドメインと触媒ドメイン間の協調作用を解明するため、Met203 と Met570 を変異させることで、Eryngase の基質特異性の比較解析を行った。

結果

2.1. Met 残基の変異に伴う Eryngase の基質特異性への影響

Met は酸化されやすく、酸化されることでメチオニンスルフォキシドに側鎖構造が変化する。Eryngase のアミノ酸配列中には、開始 Met を除いて 4 つの Met 残基(Met142, Met203, Met570, and Met620)が存在する (Fig. 4)。その中で、Met203 が酸化に伴う基質特異性の変化の鍵となる残基として特定された。そこで、本酵素の他の Met 残基がどのように基質特異性に関わるか評価するために、我々はそれぞれ Met を Ala に変えた変異酵素の作製を試みたが、M620A は得られず、その代わりに M620T が発現された。従って、我々は L-Phe-pNA と L-Leu-pNA の比活性の比率である Phe/Leu 比を指標として M142A、M570A 及び M620T 変異酵素の基質特異性を野生型、酸化型及び M203A 変異酵素と比較した。

全ての変異酵素は L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対して様々な比活性を示した(Fig. 3)。M142A と M620T 変異酵素の Phe/Leu 比はそれぞれ 2.8 と 5.4 であり、野生型酵素の Phe/Leu 比 3.1 と似通っていた。この結果から、これらの変異酵素は Eryngase の基質特異性に与える影響は少ないと示唆された。一方で、M570A 変異酵素の Phe/Leu 比は野生型酵素よりも高い 15.6 を示し、M203A と酸化型 Eryngases (それぞれ 14.5 と 22.8) と近い値を示した (Fig. 3)。これらの結果から、Met570 は本酵素の基質認識における Met203 と密接に関わることが示唆され、Met570 が酸化に伴う基質特異性の変化に関わると予想された。

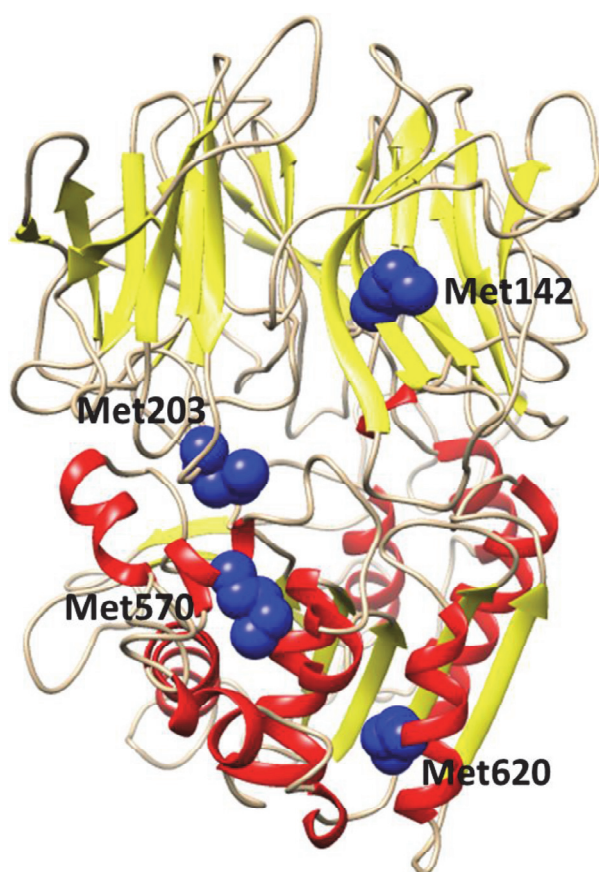


Fig. 4 eryngase の全体構造中の 4 つの Met 残基。Met 残基は青い玉で示している。Met142 と Met203 は β -プロペラドメインに位置し、Met570 と Met620 は触媒ドメインに位置する。

2.2. 酸化に伴う変異酵素の基質特異性変化

L-Phe-pNA に対する野生型 Eryngase の pNA 遊離活性は酸化処理に伴いわずかに上昇したが、一方で L-Leu-pNA に対しては著しく活性が低下した。この時、Phe/Leu 比は未処理の約 3 から酸化処理で 20 以上に変化した。一方で、M203A の Phe/Leu 比は基本的に酸化処理で変化しなかった(約 15)。

我々は次に酸化した変異酵素の基質特異性を検討した。M142A と M620T の L-Phe-pNA に対する pNA 遊離活性はどちらも増加あるいは変化が観察されなかったが、一方で、それらの L-Leu-pNA に対する活性は 1%過酸化水素で 60 min 処理することで著しく低下し(Fig. 5)、野生型酵素と比較して Phe/Leu 比が著しく増加した。M142A と M620T とは対照的に、M570A の L-Leu-pNA に対する活性において著しい低下が観察されたが(Fig. 5)、Phe/Leu 比は未処理 15.6 から酸化処理 37.3 で 2~4 倍に増加したのみであった。これは Met203 で得られた結果と似通っている。従って、Met570 を新たに基質特異性に関わる残基として、さらなる構造解析を行った。

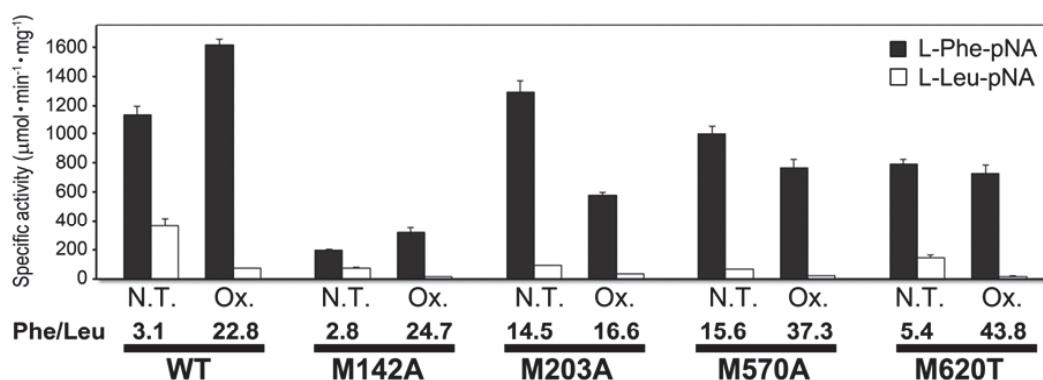


Fig. 5 野生型酵素と変異酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する pNA 遊離活性。N.T., 未処理, Ox., 酸化処理。それぞれ 1%過酸化水素で 30 °C60 分間処理する前 (N.T.)と後 (Ox.)の酵素を検討した。Phe/Leu 比はそれぞれのパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

2.3. Met570 の構造改変による基質特異性への影響

我々は M570X のいくつかの変異酵素を構築することで、Met570 の構造改変による基質特異性への影響を評価した。全ての変異酵素の芳香族アミノアシル-pNA に対する pNA 遊離活性は維持されていたが、一方で、L-Leu-pNA や L-Met-pNA といった非芳香族アミノアシル-pNA に対する活性は低下した(Fig. 6)。さらに、全ての変異酵素は M570A に似た高い Phe/Leu 比を示した。特に高い比率が M570F (70.1)と M570K (176.2)で観察されたため、570番目の位置に嵩高いもしくは正電荷の残基が導入されることがアルキル鎖の pNA 基質の認識に強く影響することが示唆された。

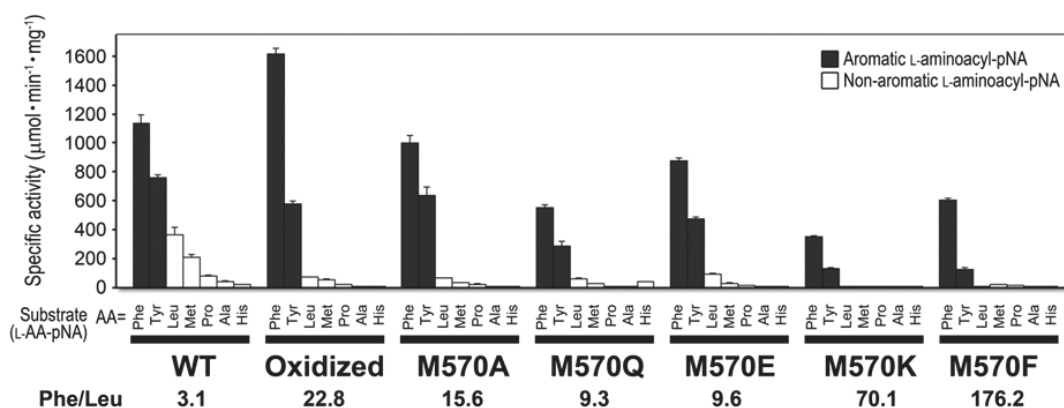


Fig. 6 野生型酵素と M570X の L-アミノアシル-pNA (L-AA-pNA) に対する pNA 遊離活性。基質は L-Phe- (Phe)、L-Tyr- (Tyr)、L-Leu- (Leu)、L-Met- (Met)、L-Pro- (Pro)、L-Ala- (Ala)、L-His- (His)を使用した。Phe/Leu 比はそれぞれのパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

2.4. 酸化した Met の模倣体への Met 残基の置換

Eryngase の 1%過酸化水素処理により、全ての Met 残基が最終的には酸化されると考えられる。これまでの結果から、Met203 と Met570 以外の Met 残基の酸化もわずかに基質特異性に影響するかもしれないが、両 Met 残基の酸化が基質特異性に最も影響を与えると考えられる。そこで、我々は Met 残基を酸化した Met の模倣体として Gln に改変した変異酵素を作製した。それらの変異酵素 (M203Q、M570Q、二重変異酵素 M203Q/M570Q、四重変異酵素 M142Q/M203Q/M570Q/M620Q) は、複数もしくは全ての Met 残基の酸化の影響を明らかにするために利用した。

全ての変異酵素は野生型酵素よりも低い pNA 遊離活性を示した(Fig. 7)。M203Q と M570Q は似た Phe/Leu 比 (それぞれ 7.4 と 9.3)を示し、二重変異酵素は両変異酵素よりも高い Phe/Leu 比 15.4 を示した(Fig. 7)。全ての Met が酸化した状態に似せた四重変異酵素は Phe/Leu 比 23.6 であり、基質特異性のパターンは基本的に酸化型 Eryngase と一致している。これらの結果から、Met203 と Met570 以外の Met 残基は、過酸化水素処理に伴う活性の変化を促進していると考えられた。

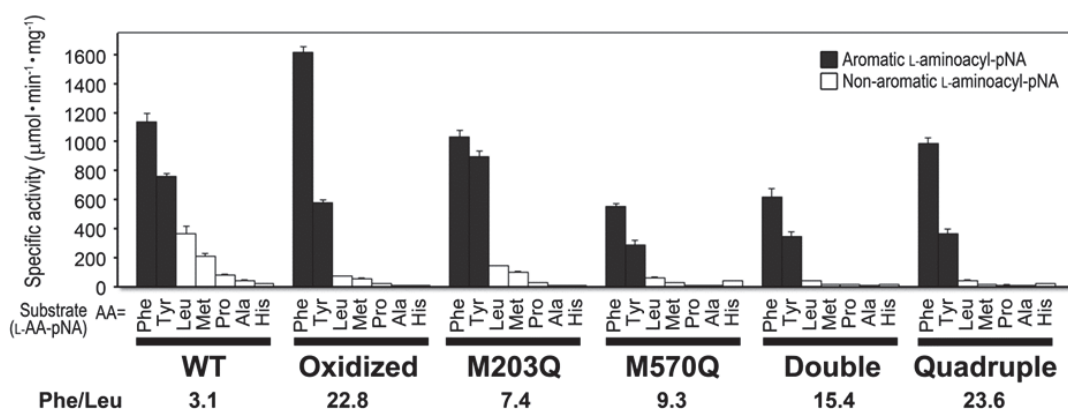


Fig. 7 野生型酵素と Met の酸化を模した変異酵素の L-アミノアシル-pNA (L-AA-pNA) に対する pNA 遊離活性。基質は L-Phe- (Phe)、L-Tyr- (Tyr)、L-Leu- (Leu)、L-Met- (Met)、L-Pro- (Pro)、L-Ala- (Ala)、L-His- (His) を使用した。Phe/Leu 比はそれぞれパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

2.5. 酵素速度論的解析

最後に、我々は本章で使用した酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する触媒能を検討した。Table 2 にまとめたように、変異により反応速度と基質親和性が変化した。第一章の酸化型酵素、M203F、M203D、及び M203K 変異酵素と同様に、L-Leu-pNA に対する著しい k_{cat} 値の低下が、M570F と M570K 変異酵素においても観察された(それぞれ 26 s^{-1} と 4.9 s^{-1})。一方で、L-Leu-pNA に対する似た k_{cat} 値が二重変異酵素と四重変異酵素で観察された(それぞれ 58 s^{-1} と 75 s^{-1})。これらの結果から、Met203 と Met570 それぞれ単独もしくは両方の酸化が酸化処理による基質特異性変化を引き起こすと考えられる。

Table 2 本酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する K_m と k_{cat} 値。

Substrate Enzyme	L-Phe-pNA			L-Leu-pNA		
	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_m (\text{mM})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_m (\text{mM})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$
Wild-type	1900	0.063	30,000	570	0.12	4900
Oxidized	4300	6.2	700	6.4	0.72	8.9
M203Q	1900	0.18	10,000	210	0.3	720
M570A	1100	0.16	6800	210	0.98	220
M570Q	710	0.18	3900	180	0.89	200
M570E	950	0.11	8300	240	1.1	220
M570F	1100	0.64	1800	26	0.73	35
M570K	920	0.82	1100	4.9	0.86	5.7
M203Q_M570Q	1200	0.34	3500	58	0.62	94
M142Q_M203Q_M570Q_M620Q	550	0.12	4600	75	0.68	110

第3章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの β -プロペラドメイン上の環構造を持つ残基が芳香環基質の認識に関わる

第1章及び第2章で、我々は本酵素の酸化に伴う基質特異性の変化に関わる Met203 と Met570 の二つの重要な残基の解析を行った[36,37]。この変化は、Met203 と Met570 がメチオニンスルホキシドに酸化されることが引き金となり生じると考えられた。両 Met 残基は本酵素の表面から活性部位に続く抜け穴に位置しており、従ってこの通り道が基質の取り込みに重要な機能を持つと考えられる。また、基質の通り道に位置する Met 残基の酸化が、芳香族よりもアルキル鎖を側鎖に持つ基質に対する酵素活性に影響を与えたことから、通り道を構成する他の残基が芳香族基質の認識や取り込みに関わる可能性が考えられた。本章で我々は、基質の予測経路のさらなる変異解析を通して、芳香族基質の認識に重要な役割を持つ残基として His76、Phe180、Trp198 の環構造を持つ三残基を新たに特定したことを報告する。これらの環残基は、両 Met も位置する推定上の基質の通り道の一部を構成する。そこで、本通り道の性質の異なる基質に対する取り込み機能を解明するため、変異と酸化の複合的な解析を行った。

結果

3.1.推定基質取り込み経路を構成する残基の変異に伴う Eryngase の基質特異性への影響

まず、我々は Met203 が位置する β -プロペラドメインにあるループを構成する残基 (Trp195、Trp198、His200、Trp205) について部位特異的変異による基質特異性への影響を検討した。W195A は酵素の発現が確認できなかった。His200 と Trp205 の Ala 置換は野生型酵素と似た Phe/Leu 比を示し(Fig. 8)、両変異が本酵素の基質特異性に与える影響は低いと考えられた。対照的に、Trp198 の Ala 置換では、L-Phe-pNA に対する活性が低下し、特徴的な Phe/Leu 比を示した(Fig. 8)。興味深いことに、これまでに特定した Met203 と Met570 の

変異や酸化による基質特異性の変化とは、逆の特異性変化であり、本変化では芳香族の基質への活性が低下しアルキル鎖の基質に対して活性が維持された。前者の変化では、L-Phe-pNA に対する k_{cat} 値の上昇が観察されたが、一方で、後者の変化では L-Phe-pNA に対して k_{cat} 値が著しく低下 (110 s^{-1}) した結果、L-Leu-pNA に対する k_{cat} 値 (280 s^{-1}) よりも低くなったことに起因する。従って、これらの結果は、Trp198 が両 Met 残基とは異なり、芳香族の基質を認識することを示している。

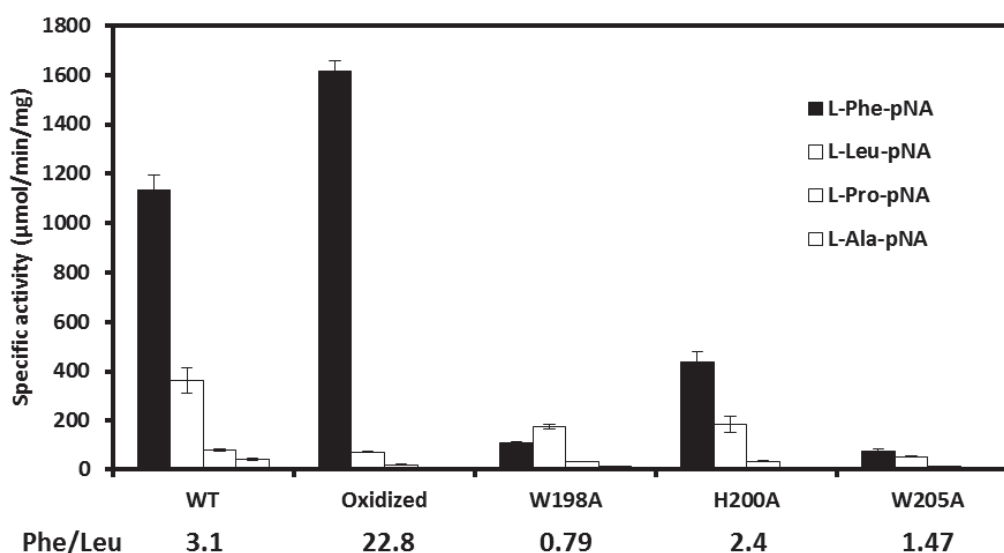


Fig. 8 野生型酵素と変異酵素の L-Phe-pNA、L-Leu-pNA、L-Pro-pNA、L-Ala-pNA に対する pNA 遊離活性。“Oxidized” は 1%過酸化水素を用いて 60 分間 30°C で処理した酵素を示している。Phe / Leu 比をそれぞれのパネルの下に示している。値は 4 つ (WT、Oxidized、W198A、W205A) または 3 つ (H200A) の独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

この Trp198 の変異による基質特異性の変化は、基質である L-Phe-pNA の側鎖の芳香環との相互作用が崩れたために生じたと予想された。そこで我々は次に Trp198 の近傍に位置する環構造を持つ残基 (His76、Phe180、Phe565) に着目し、Ala 置換による基質特異性への影響を検討した。その結果、触媒ドメインの Phe565 の Ala への置換は、Phe/Leu 比は 2.1

であり(Fig. 9)、野生型酵素 (Phe/Leu 比 3.1) とあまり変わらなかった。対照的に、 β -プロペラドメインの His76 と Phe180 の変異は、Trp198 の変異と似た Phe/Leu 比 (それぞれ 1.0 と 0.66) を示し (Fig. 9)、His76 と Phe180 もまた芳香族の基質の認識に関わることが示唆された。また、Phe565 の Ala 置換では野生型酵素と似た K_m と k_{cat} 値を示したが、その他の残基の変異では、L-Phe-pNA に対して K_m は変化しなかったが、 k_{cat} の低下が観察された(Table 3)。これらの結果から、Phe565 は本酵素の基質特異性に影響しないと考えられたが、一方で、 β -プロペラドメインの環残基である His76、Phe180 の変異では、L-Phe-pNA の触媒部位での認識は良いが活性中心への本基質の誘導速度が低下したと推測される。さらに、これらの変異において、L-Leu-pNA に対して K_m と k_{cat} に変化が観察されなかった(Table 3)。従って、これら残基は本基質に対して認識や誘導の役割を持たないと考えられる。

3.2. 酸化に伴う変異酵素の基質特異性変化

野生型酵素を酸化処理すると芳香族基質に対して厳格になる基質特異性の変化が観察された。一方で、変異により既に芳香族基質に対して特異性が厳格になった M203A と M570A は基本的に酸化処理で特異性に変化はなかった[36,37]。

そこで我々は、これら環構造を持つ残基を Ala に置換した変異酵素を酸化処理することで、基質特異性への影響を評価した。1%過酸化水素で 60 分間処理することで、これら酵素の L-Phe-pNA に対する活性は著しく上昇し、上昇率はそれぞれ 3.0、4.2、3.5 であり (Fig. 9)、それぞれの変異酵素に対する酸化の効果は、非常に似通っていた。一方で、酸化処理に伴う F565A の L-Phe-pNA に対する活性は 1.6 倍上昇し、野生型酵素の 1.4 倍とほぼ同じ比率であった (Fig. 9)。従って、この結果は、 β -プロペラドメインに位置する His76、Phe180、Trp198 が芳香族の基質認識に重要であり、非触媒ドメインに位置する Phe565 はこの基質認識にあまり関与しないという推察を支持している。

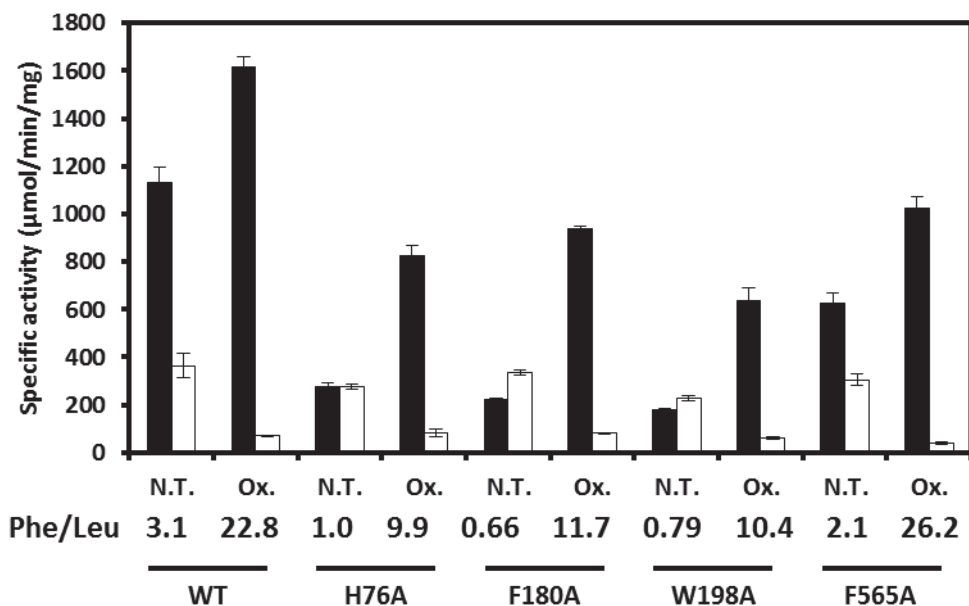


Fig. 9 野生型酵素と変異酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する pNA 遊離活性。N.T., 未処理, Ox., 酸化処理。それぞれ 1%過酸化水素で 30 °C、60 分間処理する前 (N.T.)と後 (Ox.)の酵素を検討した。Phe/Leu 比はそれぞれのパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

3.3. W198A の酸化型酵素と Met 酸化模倣体の基質特異性

これら環構造を持つアミノ酸残基の変異の効果は同じであるため、それぞれの残基の基質特異性に果たす役割は同じであると考えられる。そこで、これら三残基のうち Trp198 に焦点を絞り、W198A の酸化に伴う活性の時間依存性と酸化が及ぼす触媒能への影響を検討した。その結果、W198A の L-Phe-pNA に対する pNA 遊離活性は 40 min まで急上昇し、その後、時間経過に従い徐々に低下したが、一方で L-Leu-pNA に対する活性は 60 min 以内に劇的に低下し、60min 時点で Phe/Leu 比は 10.4 を示した(Fig. 10)。また、W198A の酸化により L-Phe-pNA に対する k_{cat} 値の上昇が観察された (Table 3)。一方で、L-Tyr-pNA に対する pNA 遊離活性は 1% 過酸化水素処理で 60 min 処理しても基本的に影響が観察されなかった(Fig. 10)。これは、Tyr がフェニル環に水酸基が付く側鎖構造を持つため、周りの残基と

の芳香環同士の相互作用以外にも水酸基との水素結合を介して相互作用し、変異や酸化による基質取り込み経路の構造変化の影響を受けにくいためであると考えられる。

第二章の結果より、Met を Gln に置換した変異酵素が酸化処理と似た特異性の変化を示し、特に Met203 と Met570 の Gln 置換において顕著な基質特異性の変化が観察された。つまり、両 Met 残基は酸化による基質特異性変化に直接的に関わる。そこで、Trp198 をこれらアミノ酸残基の代表として選択し、W198A に酸化を模した変異 (Met203 または Met570 の Gln 置換) を導入し、二重変異酵素 W198A/M203Q、W198A/M570Q、三重変異酵素 W198A/M203Q/M570Q を作製した。これらの W198A の酸化模倣変異酵素を利用し、W198A の酸化による活性変化への影響を検討した。

全ての酸化模倣変異酵素は、W198A の酸化と同じく、W198A よりも L-Phe-pNA に対する高い pNA 遊離活性を示した (Fig. 10)。W198A/M203Q、W198A/M570Q は似た Phe/Leu 比 (それぞれ 5.7 と 3.9) を示し、三重変異酵素 W198A/M203Q/M570Q は両二重変異酵素よりも高い Phe/Leu 比 26.0 を示した (Fig. 10)。W198A の経路入口を構成する Met 残基の構造改変で L-Phe-pNA に対する k_{cat} 値が上昇したが、これは野生型酵素の k_{cat} 値を大きく下回る。従って、本酵素の L-Phe-pNA に対する活性に影響する独立した二つの段階、つまり、本経路への本基質の取り込み (Met203 と Met570 の酸化で促進) と経路内に入った基質を触媒部位への誘導 (His76、Phe180、Trp198 が関与) が存在し、本活性に別々に影響し合っていると考えられる。

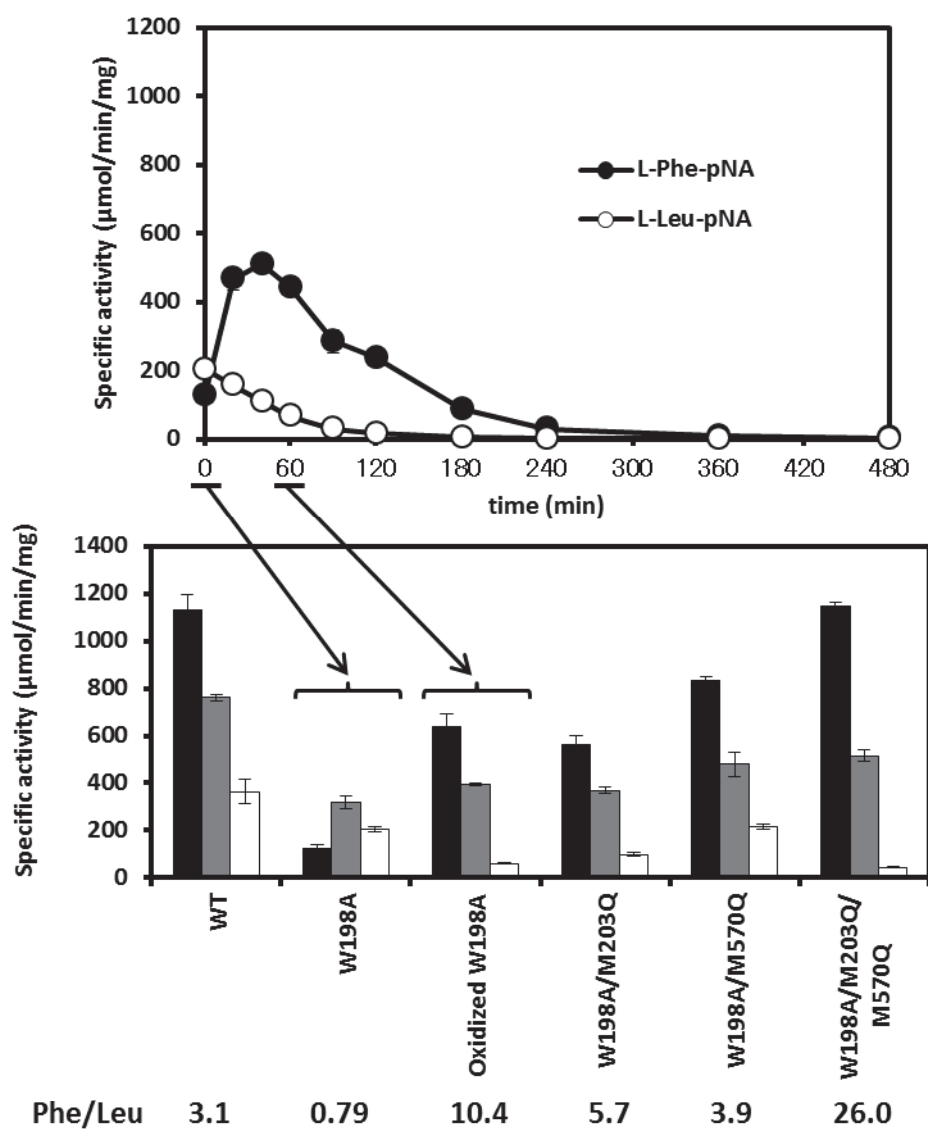


Fig. 10 野生型酵素と W198A の Met 酸化模倣体の黒; L-Phe-pNA、灰; L-Tyr-pNA、白; L-Leu-pNA に対する pNA 遊離活性。上側のパネルは、W198A の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する活性への酸化の時間依存性を示している。酵素は 1%過酸化水素で処理されている。下側のパネルは酵素のそれぞれの基質に対する比活性を示している。Phe/Leu 比はそれぞれパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

3.4. Trp198 の構造改変による基質特異性への影響

我々は Trp198 をいくつかのアミノ酸に置換した変異酵素を構築することで、Trp198 の構造改変による基質特異性への影響を評価した。全ての変異酵素の芳香族アミノアシル-pNA に対する pNA 遊離活性は大きく低下したが、芳香環を側鎖に持つ Phe への変異では活性低下が抑えられた (Fig. 11)。さらに、W198L、W198F、W198K 変異酵素は野生型酵素と似た Phe/Leu 比 (それぞれ 2.8、3.0、4.4) を示した。一方で、W198S と W198D 変異酵素は W198A に似た低い Phe/Leu 比 (それぞれ 0.99 と 1.1) を示した。従って、198 番目の位置は、嵩高いもしくは芳香環を持つ残基であることが芳香族の pNA 基質の認識に重要であることが示唆された。Table 3 に示すように、Trp198 を Phe、Asp、Lys に置換したそれぞれの変異酵素で、L-Leu-pNA に対する k_{cat} の著しい減少が観察された。これは、変異により 198 番目の残基周辺の疎水相互作用や静電的環境に変化をきたしたため、L-Leu-pNA の活性中心への移動が阻害されたためであると推測される。

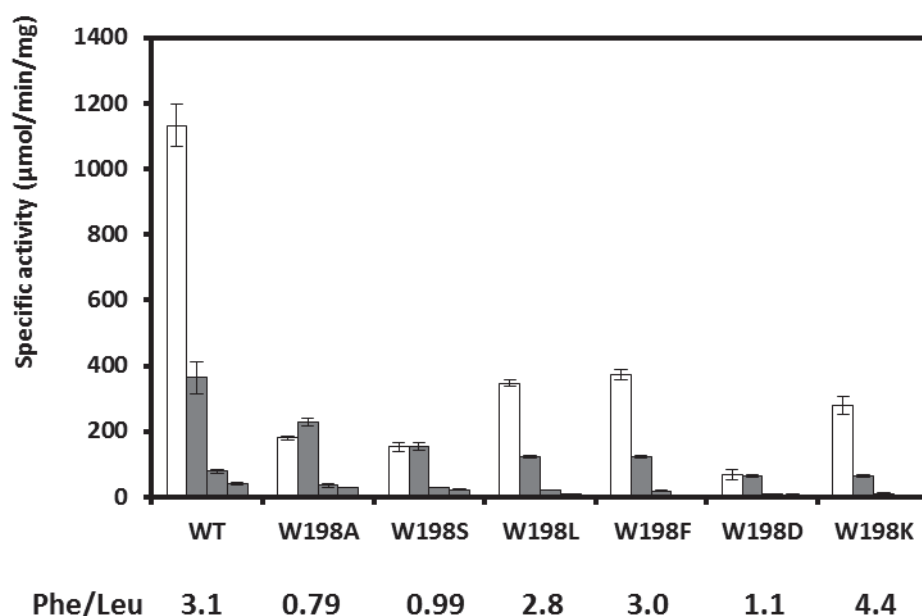


Fig. 11 野生型酵素と W198X 変異酵素の L-Phe-pNA、L-Leu-pNA、L-Pro-pNA、L-Ala-pNA に対する pNA 遊離活性。Phe/Leu 比はそれぞれのパネルの下に示している。値は 4 つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

Table 3 本酵素の L-Phe-pNA と L-Leu-pNA に対する K_m と k_{cat} 値。

Substrate	L-Phe-pNA			L-Leu-pNA		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
Wild-type	1900	0.063	30,000	570	0.12	4900
Oxidized	4300	6.2	700	6.4	0.72	8.9
H76A	450	0.047	9600	440	0.14	3100
F180A	870	0.049	18,000	680	0.18	3800
W198A	110	0.011	10,000	280	0.15	1800
H200A	630	0.053	12000	290	0.18	1600
F565A	1900	0.088	21,000	340	0.21	1600
W198S	720	0.12	5900	590	0.21	2800
W198L	470	0.051	9300	330	0.35	950
W198F	970	0.081	12,000	49	0.089	550
W198D	170	0.099	1700	20	0.067	290
W198K	720	0.12	5800	80	0.23	350
Oxidized W198A	360	0.084	4200	45	0.2	220
W198A_M203Q	820	0.19	4300	280	0.83	340
W198A_M570Q	600	0.077	7800	310	0.39	800
W198A_M203Q_M570Q	980	0.26	3700	150	1.3	110

第4章 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの Met 残基の酸化と変異に伴うアミノリシス活性への影響

第4章では、Eryngase のペプチド結合形成活性であるアミノリシス活性を利用したペプチド合成ツールとしての本酵素の応用を目指し、酸化に伴うアミノリシス活性への影響を検討した。一般的にペプチドの合成には酵素合成よりも化学合成が主流ではあるが、化学合成では劇薬の使用や有機廃液による安全性の問題や煩雑な作業工程が必要である。一方で、酵素合成ではマイルドな条件でかつ 1-ポット/1-ステップでペプチド合成が可能である。ペプチダーゼによるペプチド合成は、有機溶媒中の脱水縮合だけではなく、水系で反応可能なアミノリシスがある。本反応は、アシル酵素中間体の基質に対するアミノ酸誘導体のアミノ基の求核攻撃によりペプチド結合が形成されるが、反応液中に有機溶媒を含まないため、工程の簡素化、危険性や環境への負荷軽減が期待できる。本酵素は、加水分解と拮抗してアミノリシス反応を触媒し、その基質特異性も広く、鎮痛ジペプチド Kyotorphin 誘導体 (Tyr-Arg-OMe) を含む多様なジペプチド類を合成できることを明らかにした[26]。しかし、アミノリシスは加水分解と拮抗して起きるため、生成物が分解される問題がある。そこで我々は、よりアミノリシスに特化した酵素の創出を目指し、第1章から第3章にかけて本酵素の基質取り込みに着目した基質認識機構に迫った。その基礎的な研究の中で、本酵素が酸化されることで、基質または生成物の通り道に微細な変化をきたし、本酵素の基質特異性が変化することを見出した。この基質特異性の変化は、芳香族とアルキル鎖を

側鎖に持つ基質との間で酵素の触媒能が異なる影響を受けることで現れる。そこで、我々は、酸化に伴うこの特異性の変化が、水を含むアシル受容体の基質認識にも影響を与えている可能性を検討するため、酸化処理に伴う本酵素のアミノリシス活性及び加水分解活性への影響を評価した。

結果

4.1. 酸化に伴う Eryngase のアミノリシス活性への影響

Eryngase の酸化及び変異により、pNA 遊離活性における基質特異性の変化が観察されたが、pNA 遊離活性ではアシル酵素中間体形成後の反応の詳細が不明であった。そこで、酸化処理した本酵素について、アミノ酸誘導体を基質とした酵素反応液を ESI-MS で解析することで、本酵素の酸化に伴うアシル受容体の認識への影響を検討した。

まず、L-Phe-pNA とアミノ酸の側鎖部が同じ構造である L-Phe-OMe を基質として、酸化型酵素を用いて酵素反応を行った。酸化型酵素は野生型酵素よりも L-Phe-OMe の減少が速く、本基質への高い反応性を示した (Fig. 12A)。4 時間反応時の酸化型酵素の L-Phe の生成量は 15.5 mM であり、野生型酵素の 11.5 mM の約 1.4 倍多い量を生産した (Fig. 12A)。一方で、1.5 時間反応時の酸化型酵素の(L-Phe)₂-OMe の生成量は、野生型酵素よりも約 29.1 倍多く生産した (Fig. 12A)。従って、酸化型 Eryngase は未酸化の酵素と比較して、L-Phe-OMe に対する反応性が上昇したが、加水分解産物である L-Phe よりもアミノリシス産物である

(L-Phe)₂-OMe を多く生産したことが示された。これとは対照的に、酸化型酵素は野生型酵素よりも L-Leu-pNA と同じ側鎖構造を持つ L-Leu-OMe に対しても低い反応性を示した (Fig. 12B)。しかし、酸化型酵素と野生型酵素の最大生産時間は、それぞれ 8 時間と 2 時間反応時であり、酸化によりその到達が遅くなったが、一方で、それぞれのアミノリシス産物である(L-Leu)₂-OMe の最大生産量を比較すると、野生型酵素よりも約 1.2 倍多く生産した (Fig. 12B)。これは、酸化処理に伴い L-Leu-OMe に対するアミノリシス活性以上に加水分解活性もまた抑えられたことから (Fig. 12B)、アミノリシス産物 (L-Leu)₂-OMe の分解が抑えられた結果であると推測される。これらの結果は、酸化に伴う本酵素の pNA 遊離活性の基質特異性変化と矛盾しない。一方で、Eryngase の D-Phe-OMe に対する反応性は酸化処理に伴い低下し、野生型酵素よりも低い活性を示した (Fig. 13)。

4.2. 酸化に伴う Eryngase の Kyotorphine 合成能への影響

最後に、我々は酸化に伴う本酵素の鎮痛ジペプチド Tyr-Arg (Kyotorphin) 誘導体の合成能への影響を検討した。L-Tyr-NH₂ と L-Arg-OMe の二種類の基質を用いて、酸化型酵素の L-Tyr-L-Arg-OMe の生成量を野生型酵素と比較検討した。両酵素は、L-Arg-OMe の濃度が上がるに従い、L-Tyr-L-Arg-OMe の生成量が増加し 20mM の L-Arg-OMe で、最も高い L-Tyr-L-Arg-OMe の生成量を示した。酸化型酵素は全ての濃度において野生型酵素よりも高い L-Tyr-L-Arg-OMe の生成量を示した (Fig. 14)。

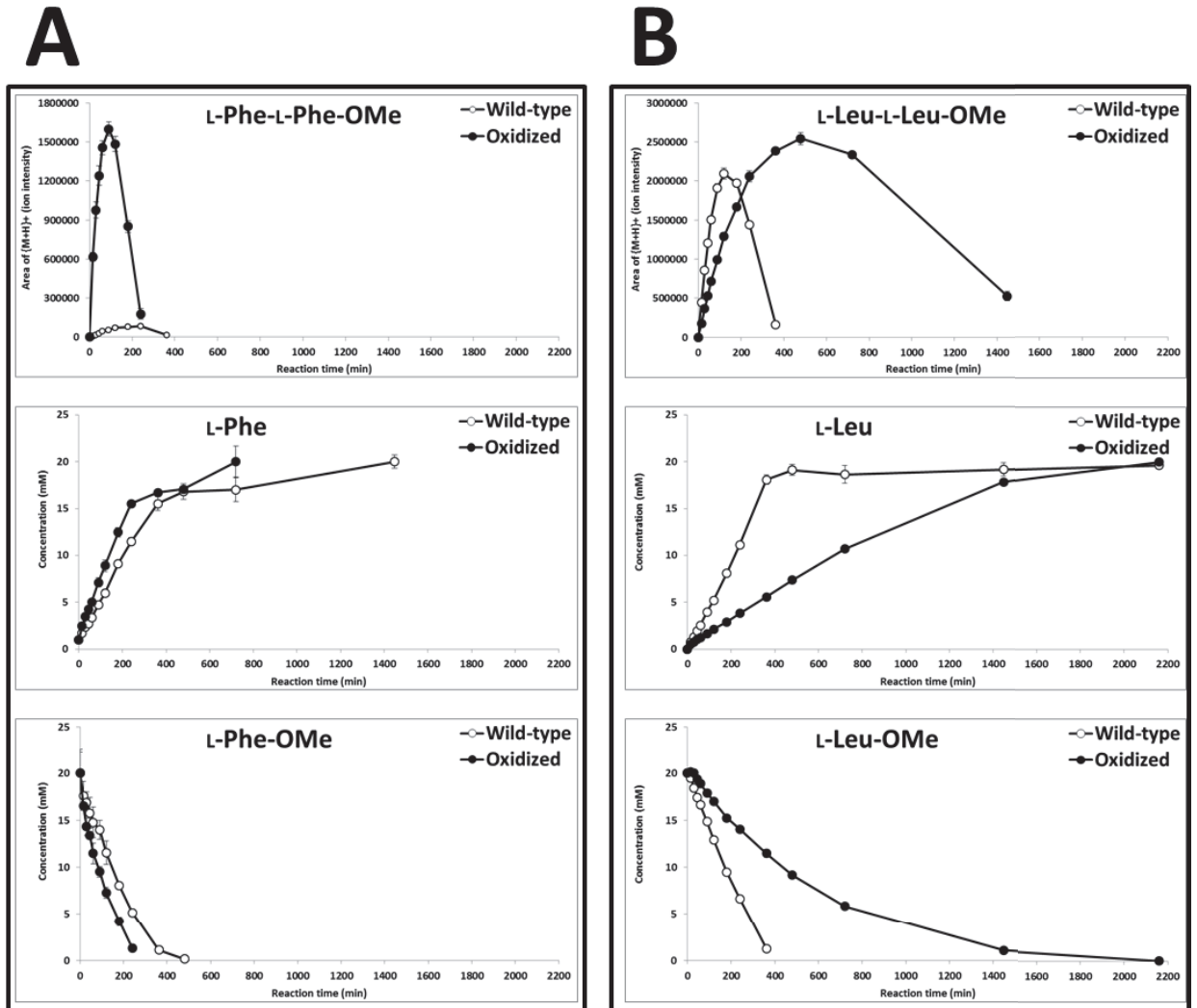


Fig. 12. 野生型と酸化したeryngaseの生成物の時間依存性。反応は15分から2160分まで4°Cで行った。基質は終濃度が20 mMのL-Phe-OMe (A)もしくはL-Leu-OMe (B) を使用した。値は4つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

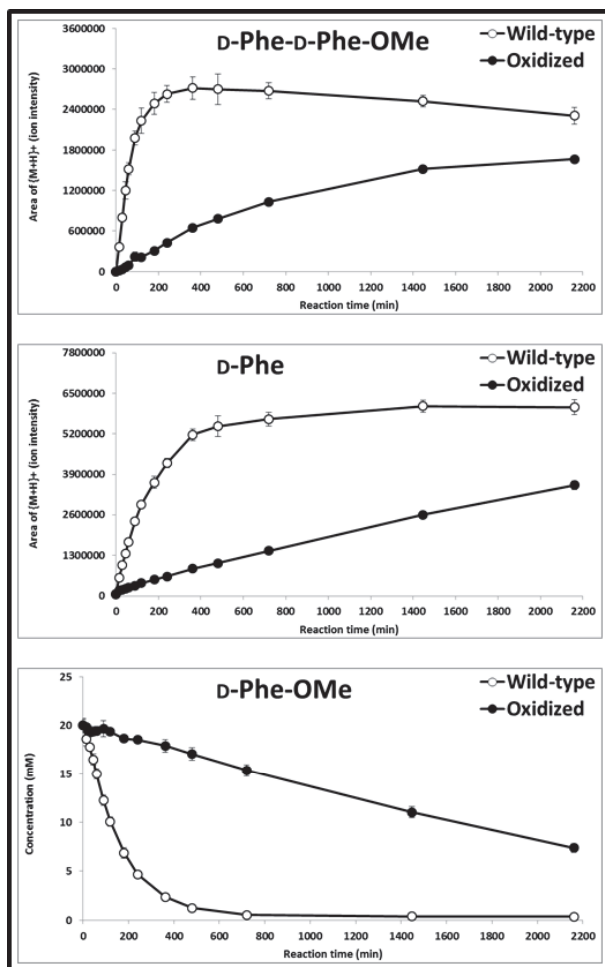


Fig. 13. 野生型と酸化したeryngaseの生成物の時間依存性。反応は15分から2160分まで4℃で行った。基質は終濃度が20 mMのD-Phe-OMeを使用した。値は4つの独立した実験での平均値±標準偏差を示している。

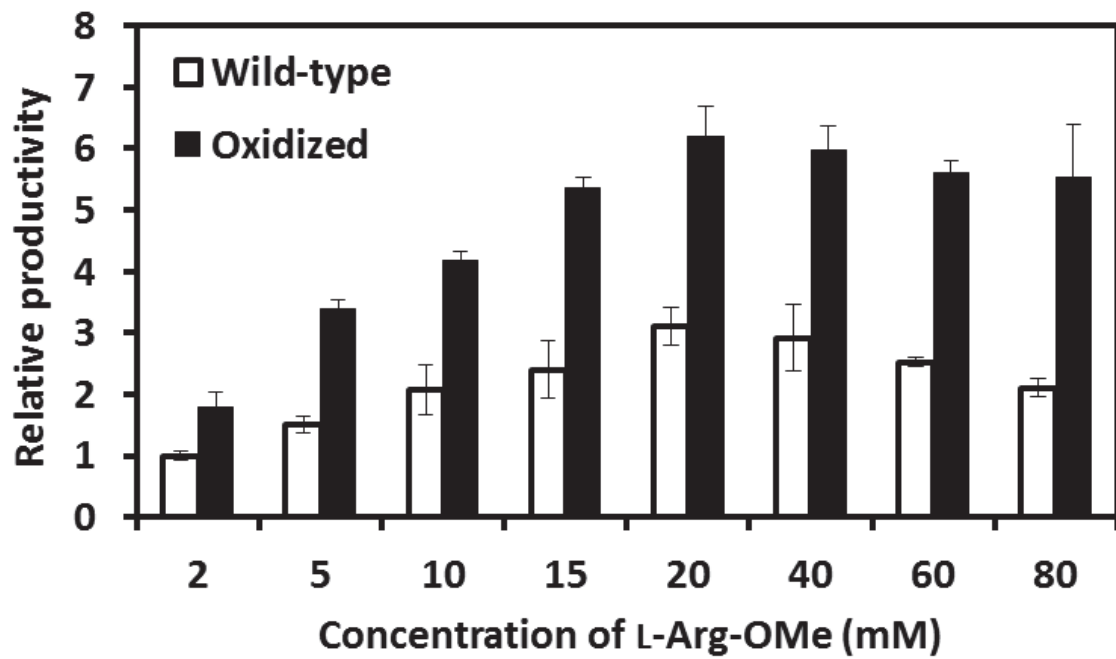


Fig. 14. 野生型と酸化したeryngaseのL-Tyr-L-Arg-OMeの相対的生産性。反応は4°Cで90分間行った。基質は終濃度20 mMのL-Tyr-NH₂と終濃度2-80 mMのL-Arg-OMeを使用した。

結論と考察

本研究で我々は、酸化されることで基質特異性が変化するエリンギ由来の S9 POP である *eryngase* について、その構造と活性の相関について解析を行った。本酵素のアミノ酸配列の Pfam 解析から、S9 POP 内での系統学的な分類を行ったところ、本酵素は acyl aminoacyl peptidase が属す S9c の近くに位置していた[27] (Fig. 15)。S9c POP には oxidized protein hydrolase (OPH) [38]が含まれており、OPH は酸化されたタンパク質を分解することで酸化ストレスへの抵抗性を向上させると報告されている[39,40]。OPH の酸化への安定性は不明であるが、*eryngase* が 1%過酸化水素に曝されてもアルキル基質に対する酵素活性は低下したが、芳香族基質に対する酵素活性を保持したことから、本酵素もまたエリンギ子実体において酸化されたタンパク質の分解に関わっているかもしれない。我々は、本酵素のこの酸化に伴う基質特異性変化に着目し、酸化が予測されたアミノ酸残基とその周辺残基の変異解析、及び酸化処理による活性の比較検討を行うことで、本酵素の基質認識及び取り込み機構の解明に迫った。

本研究で我々は、酸化が予想される第一のアミノ酸残基として Met203 を特定し、本残基の酸化による立体構造の変化が *eryngase* の基質特異性変化を引き起こすと推測した。Met203 は蝶番の反対側の β -プロペラドメインの表面にあるループに位置しており、酵素表面から活性中心に続く通路の入り口の一部を構成する (Fig. 16)。さらに我々は、酸化に伴

う基質特異性変化に関わる二番目の重要残基 Met570 を特定した。Met570 は触媒ドメインに位置し、Met203 と同じ通り道の入り口の一部を構成している (Fig. 16)。両 Met 残基の変異による構造改変により、酸化処理と同じように、本酵素の基質特異性への影響が観察されたため、特定した二つの Met 残基はアルキル鎖を側鎖に持つ基質の認識に関わると考えられる。我々は本通り道がアルキル鎖だけでなく芳香族の基質や水分子の触媒部位への取り込み機能も持つと推測し、通り道を構成するアミノ酸残基の更なる変異解析を通して、芳香族基質の認識に関わる His76、Phe180、Trp198 を特定した。これらの残基は β -プロペラドメインに位置しており、Met203 及び Met570 が一部を形成する予測経路の上部を構成する (Fig. 16)。これら残基の位置から環構造を取り除くと、芳香族基質に対する活性が大きく低下し、一方でアルキル基質に対して活性が維持されたため、これら残基の環構造と芳香族基質との間で、基質認識や取り込みに重要な相互作用が起きていると考えられる。

一方で、第一章の結果より、本酵素が短時間の酸化処理で L-Phe-pNA に対する pNA 遊離活性の一時的な上昇が観察されたが、我々は Met203 と Met570 の酸化が芳香族基質の認識を強めると推測した。この裏付けとして、環構造を取り除くことで芳香族基質の認識を弱めた変異酵素の酸化処理で、芳香族基質に対する活性の上昇が確認された。さらに、W198A 変異酵素内の両 Met の酸化状態を模した変異酵素を作製し、追加検証を行ったところ、W198A の酸化に酷似した特異性変化が観察されたことから同じ結論が導き出される。

しかし、本酵素の予測構造上、Trp198 と Met203 は同じ β -プロペラドメインのルー

プに位置しているが、一方で、Met570 は触媒ドメインに位置しており、両ドメインの残基間の距離は遠く離れている(11 Å 以上)。従って、両 Met の酸化に伴う構造変化は、His76、Phe180、Trp198 のこれら環残基と芳香族基質との相互作用に対して、直接的な影響はないと考えられる。本酵素の過酸化水素処理により、両 Met 残基の側鎖はメチオニンスルフォキシドへと酸化され、側鎖に付与された酸素原子が近傍の主鎖のアミノ基と水素結合や塩橋を形成すると予想される。つまり、本酵素の通り道の入り口を構成する Met 残基の酸化により静電的環境が変化し、本酵素の基質の入口が拡大され、L-Phe-pNA の取り込み効率が上がったと予測される。酸化に伴う特異性変化と似た現象が、両 Met 残基の Ala への置換で観察されたが、これもまた側鎖の短化により、入口が広がったためであると考えられる。従って、本酵素の酸化と環残基の変異に伴う芳香族基質に対する活性の変化は、前者は基質の経路内への取り込み、後者は活性中心への誘導であり、それぞれ異なる機構により引き起こされたと考えられる。一方で、実際の S9 POP の基質の取り込み経路は複数の経路が関わるはずであるが、この基質特異性の変化は共通の予測経路の構造変化に起因すると考えられたことから、蝶番の反対側にあるドメイン間が基質の取り込みに関わる説[15-19]を強く支持する結果を得た。

これまでに、Z-Pro-Prolinal などの S9 POP 阻害剤の作用モデルが調べられてきた[41-45]。これらの結晶構造解析により、 β -プロペラドメインと触媒ドメインは、阻害剤存在下で互いに近接する closed state、非存在下で互いに離れる open state をとり[15,46,47]、この

立体構造変化は S9 POP の基質認識に大きく貢献する[47]。従って、本酵素は open state で拡大された通路内の特定残基が基質への親和性を発揮し、基質を活性中心へ誘導し、closed state での活性部位で最終的に酵素化学反応が起こると考えられる。本酵素の closed state の予測構造で Phe565 は、芳香族基質に親和性を持つ Trp198 の近傍に存在するが、本残基は基質認識に関与しないため、芳香族基質の活性部位への誘導に関わる基質認識が、open state での β -プロペラドメインのこれら環残基で行われると予測された。

さらに我々は、変異酵素の速度論的解析から、Met203 を Phe に置換した変異酵素が L-Phe-pNA に対する k_{cat} 値の顕著な減少を示すことを明らかにした。本酵素の予測構造において、触媒ドメインから延びる Tyr569 の側鎖が Met203 の側鎖と近接することが確認された。Met203 を Phe に置換することで、203 番目と 569 番目の残基のフェニル環同士が π - π スタッキングにより相互作用し(Fig. S4)、蝶番の反対にある入口からの基質の取り込みが阻害されたと推測された。この可能性の裏付けとして、我々は二重変異 (M203F/Y569A)により活性が部分的に回復することを確認した(see Table S1 in the supplementary materials)。この構造変化に起因する制限が、恐らく L-Phe-pNA に対する k_{cat} 値の顕著な減少を引き起こしたと考えられる。これらの結果は、過去の基質誘導による構造変化の影響に着目した研究[48,49]と合致しており、この予測経路の構造変化が触媒の律速段階に影響を与えることが示唆された。

第 1 章から第 3 章にかけての基礎的な研究結果から、S9 POP が付属領域である β -

プロペラドメインにより、触媒部位だけでなく基質が通る経路内での取り込む基質の選択も酵素活性に大きな影響を与えると推察された。そして第4章で我々は、実際に、酸化処理した本酵素が未処理の酵素よりも、芳香族とアルキルの両アミノ酸誘導体基質でジペプチド誘導体生産が増加することを明らかにした。この嬉しい変化は、基質の通り道にある Met 残基が酸化されることで、水よりもアミノ酸誘導体を認識するように基質特異性が変化したことためであると考えられる。一方で、酸化処理した本酵素の反応速度が L-Phe-L-Phe-OMe 合成では上昇したのに対して、L-Leu-L-Leu-OMe 合成では低下したため、基質に対する反応性はアミノ酸-pNA 基質でも観察された通り、芳香族アミノ酸誘導体に対して厳格になったと考えられる。さらに、酸化処理した本酵素を使用して L-Tyr-NH₂ と L-Arg-OMe を材料にして鎮痛ジペプチド L-Tyr-L-Arg-OMe の生産を評価すると、当該ジペプチドの生産量の増加も観察された。我々は以前の研究で、本酵素の活性中心 Ser を Cys に置換することでペプチド合成能の上昇を図ったが、本酵素が本来持つ加水分解活性により生成ペプチド類の分解を抑えることができなかった。これまでに、ペプチド合成に向けたより高性能な酵素への改良において、基質の通り道の改変は注目されてこなかった。第4章で明らかにした成果は、本酵素の基質取り込み経路の改変が、生成ペプチドへの加水分解を抑える一つの手段になりうる可能性を示すものである。我々は本酵素の基質認識機構の解明が、S9 POP を用いたより効果的なペプチド合成を促進することに役立つと考えている。

これまで、本酵素を含む S9 POP の基質の取り込み経路を介した基質認識機構の詳細

細について、明らかにされていなかった。本研究で我々は、酸化された本酵素の基質特異性が変化するという興味深い現象に端を発し、その構造的要因から基質認識機構の解明に迫った。さらに、この特異性変化を利用したペプチド類合成の応用への発展性を示した。今後は、酸化を模した変異酵素について、基質取り込み経路が果たす水分子の認識への役割を検討し、本酵素の活性部位とは独立した水の認識機構解明の糸口をつかむことで、ペプチド類合成ツールとしての本酵素の利用拡大を目指したい。

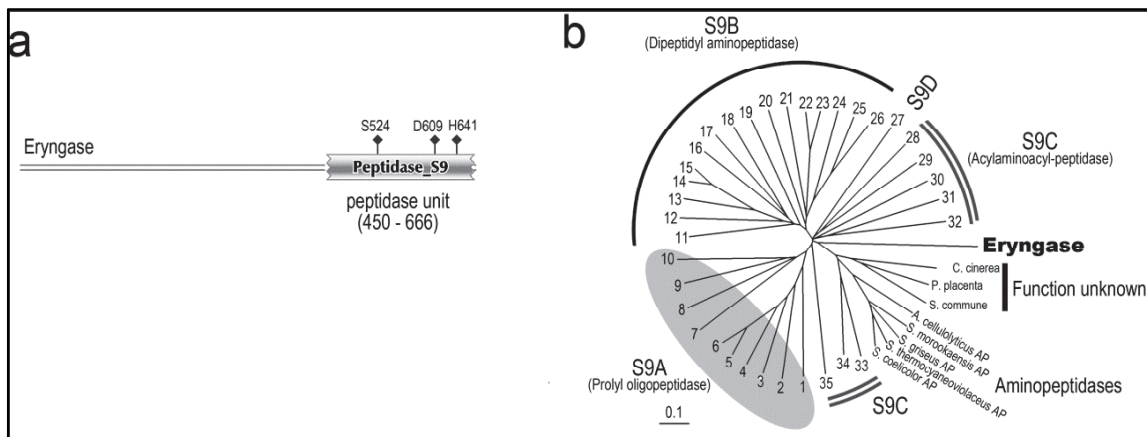


Fig. 15. Eryngase の Pfam 解析 (a) とファミリーS9 酵素との系統樹 (b)。(a):Eryngase の活性中心 Ser と電子リレーに関わる Asp と His 残基を◆で示した。ペプチダーゼユニットは、1 次構造上 C 末側に存在し、N 末側は本酵素のβ-プロペラドメインを構成していると予測される。(b):Eryngase と様々なファミリーS9 酵素の 1 次構造配列情報を使用した系統樹。Eryngase は、S9C の酵素群の間に存在する。系統樹作成に使用した配列データは、[Supplementary material](#) にまとめた。

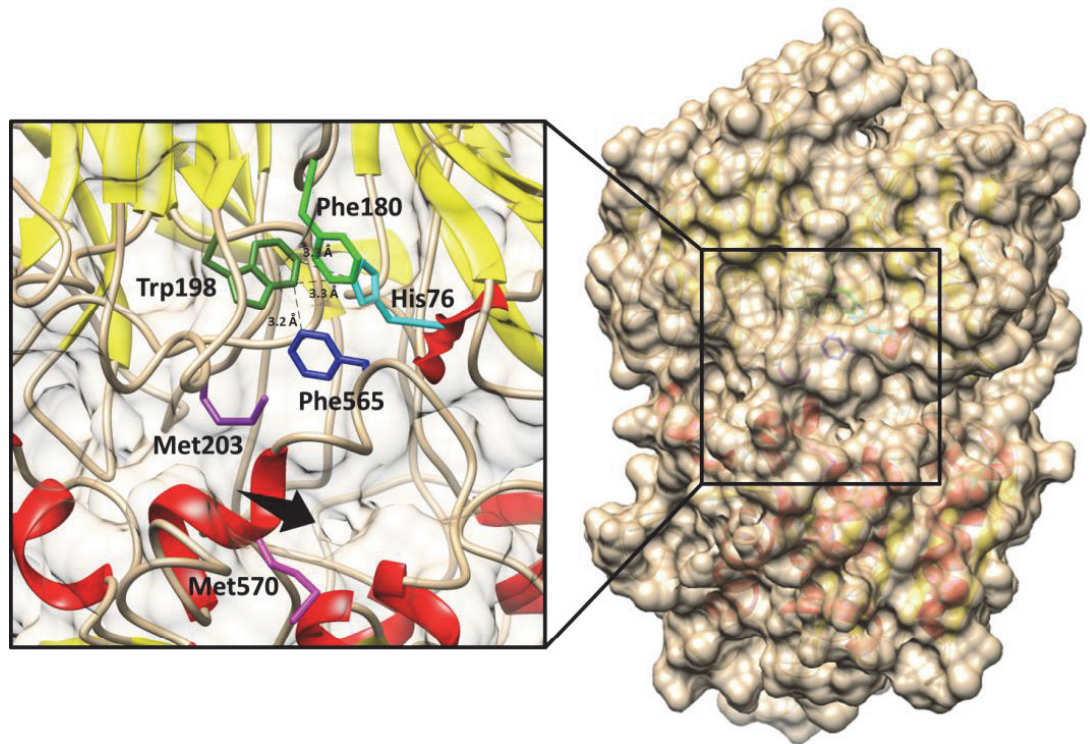


Fig. 16. Eryngase の基質取り込み経路入り口の局所構造。Met203 と Met570 はそれぞれ紫と赤紫、His76、Phe180、Trp198、Phe565 はそれぞれ青緑、緑、深緑、青で示している。Met203 と Met570 は経路の入り口の一部を構成しており、His76、Phe180、Trp198 は経路の少し入った上部を構成している。

材料と方法

1. 試薬、プラスミド、使用菌株、培地

アミノ酸-pNA 誘導体は Bachem AG、Aldrich Chemical Co. Inc.、Sigma Chemical Co.、Novabiochem Co.、Wako Pure Chemical Industries Ltd.から購入した。Eryngase の生産用のベクターは、当研究室の千葉により構築された pET22b/Ery[50]を使用した。プラスミド構築のための形質転換体の宿主菌には *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 を使用し、大腸菌発現系における宿主菌は *E. coli* Rosetta (DE3) 株を使用した。大腸菌の培養には Table 4 に示す培地を用いた。

Table 4 培地の組成と調製法

培地名	組成	調製法
LB-Agar 培地	1% Bacto trypyone, 0.5% Yeast extract, 1.5% Agar powder, 0.1% NaCl	D.W.で溶解し、オートクレーブ。60℃前後まで冷まし、抗生物質を 50µg/mL となるよう添加後、滅菌ディスプレイザブルシャーレに分注
LB 培地	1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl	D.W で溶解し、オートクレーブで滅菌。使用前に抗生物質を 50µg/mL となるよう添加
Overnight express 培地	6% Overnight express (Novagen), 1% Glycerol	D.W.で溶解し、オートクレーブで滅菌。使用前に抗生物質を 50 µg/mL となるよう添加

2. 酵素試験

本酵素の活性測定は、アミノ酸-pNA 誘導体の分解反応によって遊離する pNA につ

いて、405 nm の吸光度上昇を測定することで行った。0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 75 μ L、適宜希釈した酵素溶液 5 μ L を添加し、よく混合した。続いて基質 20 μ L を添加し反応を開始し、96-well のマイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories Inc.)で 405 nm の吸光度上昇をモニターした。初期活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) は、吸光度プロファイルの直線部から決定した。

3. 部位特異的変異導入

変異酵素は pET-22b/Ery と点特異的変異を含むプライマーペアを用いたインバース PCR により部位特異的変異を導入して構築した(Table S2) 。PCR プログラムは 98°C 1 分、68°C 1.5 分の 18 サイクルで行った。PCR 産物は制限酵素 Dpn I を加え、37°C 6 時間反応させて鋳型プラスミドを消化し、*E. coli* JM109 のコンピテントセルに導入した。プラスミドは抽出し、正しいクローニングであることをシーケンスで確かめた。

4. Eryngase の発現と精製 2.4 Expression and purification of recombinant eryngase and its variants

pET-22b/Ery もしくは変異酵素の発現用プラスミドを含む *E. coli* Rosetta (DE3) を 20 mL の 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ のアンピシリンを含む Overnight Expression Instant TB medium (Novagen

Inc.) を発現培地に用いて、15 °C で 72 h 培養した。培養した菌は、1 mM DTT を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (buffer A) にけん濁し、氷中で超音波破碎した。菌の破片を取り除いた後、上清を 50%飽和硫酸アンモニウムに供し、得られた上清を続いて 70%飽和硫酸アンモニウムに供した。得られた沈殿物を 10 mM CaCl₂ を含む buffer A に溶かし、この溶液を 55 °C で 30 min 熱処理した。沈殿物を遠心分離で除去し、上清を 40%飽和硫酸アンモニウムに供した。この溶液を 40%飽和硫酸アンモニウムを含む buffer A で平衡化した butyl Toyopearl カラム(Tosoh Corp.)に通した。30%飽和硫酸アンモニウムを含む buffer A でカラムを洗った後、20%飽和硫酸アンモニウムを含む buffer A で酵素を溶出した。高い活性を示したフラクションを回収し buffer A で透析した。透析液を buffer A で平衡化した Vivapure-Q spin カラム (Sartorius AG) に通した。containing 0.25 M NaCl を含む buffer A で洗浄後、結合しているタンパクを 0.4 M NaCl を含む buffer A で溶出した。高い活性を持つ溶出液を精製酵素溶液とした。

5. 酸化された部位の特定

Eryngase を 1%過酸化水素で 0、1 及び 8 h 処理し、95 °C で 10 min 熱処理し、続いて約 0.05 mg·mL⁻¹ trypsin を用いて 2 h 室温で分解した。トリプシン処理で生じた Eryngase のペプチド断片を Zip Tip (Merck Millipore Co.)を用いて脱塩し、続いてシナピン酸を MALDI matrix に用いて Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics Inc.) で解析した。

6. Eryngase の活性への酸化の時間依存性

野生型及び変異型の Eryngase 溶液 ($0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) を 1% 過酸化水素を用いて $30 \text{ }^\circ\text{C}$ で 20 min から 8 h 処理した。酸化反応は終濃度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ になるように溶液に添加したカタラーゼで停止した。この混合液を酸化型の Eryngase の性質検討に使用した。

7. 酵素反応速度論的解析

本酵素の L-Phe-pNA 及び L-Leu-pNA に対する K_m と k_{cat} 値は、活性測定の際の各基質の終濃度を変化させ (0.003125 から 0.4 mM)、それぞれの濃度における pNA 遊離活性を測定し、Lineweaver-Burk plot から K_m (mM) と V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を算出した。また、本酵素の分子量 (約 $72,840 \text{ g/mol}$) から k_{cat} (s^{-1}) を算出した。

8. アミノリシス反応によるペプチド合成

Eryngase のペプチド合成反応は、マイクロプレートを用いた one-pot 反応系で行った。マイクロプレート内で 0.2 M Tris-HCl (pH8.0) buffer $46 \mu\text{L}$ に、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の酵素を $2 \mu\text{L}$ (終濃度 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した後、 0.5 M のアミノ酸誘導体基質を $2 \mu\text{L}$ (アシル供与体終濃度 20 mM 、アシル受容体終濃度 $2\text{-}80 \text{ mM}$) 添加して反応をスタートさせ (Total $50 \mu\text{L}$)、 4°C で 20 分から 36 時間反応を行った。反応停止には 0.5 M HCl を $50 \mu\text{L}$ 加え、生成物の検出には

Electron Spray Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (ESI-TOF MS)もしくは Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) -ESI TOF-MS を利用した。

9. 酵素反応生成物の UPLC-ESI-TOF MS による検出

ESI-MS による生成物の検出は、反応停止後の溶液を 0.1%ギ酸で 100 倍に希釈し、Millex-LH フィルター (MILLIPORE) に通しながら、1 mL 容ガラスバイアルに移し替えた。その後、LCT-Premire (Waters 社製)を用いて分子質量及び抽出イオンクロマトグラフィーを解析した。UPLC-ESI TOF-MS は Acquity UPLC (Waters) を接続した LCT-Premire を用い、サンプルは 5.0 μ L を供した。UPLC での溶媒として 0.1% HCOOH/H₂O (solvent A) 及び 0.1% HCOOH/CH₃CN (solvent B) を使用した。UPLC の条件は、solvent A:B=95:5 を 2 分間、solvent A:B=80:20 を 1 分間、A:B=80:20~50:50 のグラジエントを 2 分間、solvent A:B=50:50 を 1 分間流した後、solvent A:B=80:20 で 2 分間洗浄し、solvent A:B=95:5 を 2 分間流すことで溶媒を戻した。

1. 謝辞

本研究の遂行や論文の作成等、研究活動全般において、ご指導ならびに貴重なご助言を頂きました鳥取大学農学部 有馬 二郎 教授に心から感謝の意を表しますと共に、厚く御礼を申し上げます。

副担当教員として貴重な御助言を賜りました山口大学農学部 小崎 紳一 教授、鳥取大学農学部 藪田 行哲 准教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、様々な助言や実験上の協力をして頂きました、生命機能化学研究室の皆様方に深く感謝致します。

2. 参考文献

- [1] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, R. D. Finn, Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016), D343–D350
- [2] G. Dodson, A. Wlodawer, Catalytic triads and their relatives, *Trends Biochem Sci.*, 23 (1998), pp. 347–352
- [3] I. Brandt, S. Scharpe, A.-M. Lambeir, Suggested functions for prolyl oligopeptidase: a puzzling paradox, *Clin. Chim. Acta*, 377 (2007), pp. 50–61
- [4] R. E. Morty, J. D. Lonsdale-Eccles, J. Morehead, E. V. Caler, R. Mentele, E. A. Auerswald, T. H. Coetzer, N. W. Andrews, B. A. Burleigh, Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999), pp. 26149–26156
- [5] R. E. Morty, R. Pelle, I. Vadasz, G. L. Uzcanga, W. Seeger, J. Bubis, Oligopeptidase B from *Trypanosoma evansi*. A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts, *J. Bio. Chem.*, 280 (2005), pp. 10925–10937
- [6] L. Polgar, The prolyl oligopeptidase family, *Cell Mol. Life Sci.*, 59 (2002), pp. 349–362
- [7] V. Fulop, Z. Bocskei, L. Polgar, Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis, *Cell*, 94 (1998), pp. 161–170
- [8] L. Shan, II. Mathews, C. Khosla, Structural and mechanistic analysis of two prolyl

- endopeptidase: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), pp. 3599–3604
- [9] D. Rea, V. Fulop, Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes, *Cell Biochem. Biophys.*, 44 (2006), pp. 349–365
- [10] R. Walter, H. Shlank, J. D. Glass, I. L. Schwartz, T. D. Kerenyi, Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme, *Science*, 173 (1971), pp. 827–829
- [11] R. Walter, T. Yoshimoto, Postproline cleaving enzyme: kinetic studies of size and stereospecificity of its active site, *Biochemistry*, 17 (1978), pp. 4139–4144
- [12] Fulop V, Bocskai Z, Polgar L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis, *Cell*, 94 (1998), pp. 161–170.
- [13] Fulop V, Szeltner Z, Polgar L. Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism, *EMBO Rep.* 1(2000), pp. 277–281.
- [14] Szeltner Z, Rea D, Juhasz T, Renner V, Fulop V, Polgar L. Concerted structural changes in the peptidase and the propeller domains of prolyl oligopeptidase are required for substrate binding, *J Mol Biol.* 340 (2004) pp. 627–637.
- [15] Kaushik S, Etchebest C, Sowdhamini R. Decoding the structural events in substrate-gating mechanism of eukaryotic prolyl oligopeptidase using normal mode analysis and molecular dynamics simulations, *Proteins*, 82(2014), pp. 1428–1443.

- [16] Fuxreiter M, Magyar C, Juhasz T, Szeltner Z, Polgar L, Simon I. Flexibility of prolyl oligopeptidase: molecular dynamics and molecular framework analysis of the potential substrate pathways, *Proteins*, 60 (2005) pp. 504–512.
- [17] St Pierre J-F, Karttunen M, Mousseau N, Rog T, Bunker A. Use of umbrella sampling to calculate the entrance/exit pathway for z-pro-prolinal inhibitor in prolyl oligopeptidase, *J Chem Theory Comput.*, 7(2011) pp. 1583–1594.
- [18] Kaszuba K, Rog T, Danne R, Canning P, Fulop V, Juhasz T, Szeltner Z, St Pierre J-F, Horsman AG, Mannisto PT, Karttunen M, Hokkanen J, Bunker A. Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase, *Biochimie*, 94(2012) pp. 1398–1411.
- [19] Szeltner Z, Juhasz T, Szamosi I, Rea D, Fulop V, Modos K, Juliano L, Polgar L. The loop facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity, *Biochim Biophys Acta*, 1834 (2013) pp. 98–111.
- [20] R. E. Morty, A. Y. Shih, V. Fulop, N. W. Andrews, Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, *FEBS Lett.*, 579 (2005), pp. 2191–2196
- [21] H. Usuki, Y. Uesugi, M. Iwabuchi, T. Hatanaka, Activation of oligopeptidase B from *Streptomyces griseus* by thiol-reacting reagents is independent of the single reactive cysteine residue, *Biochim. Biophys. Acta*, 1794 (2009), pp. 1673–1683

- [22] L. Polgar, Effects of ionic strength on the catalysis and stability of prolyl oligopeptidase, *Biochim. J.*, 312 (1995), pp. 267–271
- [23] L. Polgar, pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle, *Eur. J. Biochem.*, 197 (1991), pp. 441–447
- [24] L. Polgar, Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting, *Biochim. J.*, 283 (1992), pp. 647–648.
- [25] T. Juhasz, Z. Szeltner, V. Renner, L. Polgar, Role of the oxyanion binding site and subsites S1 and S2 in the catalysis of oligopeptidase B, a novel target for antimicrobial chemotherapy, *Biochemistry*, 41 (2002), pp. 4096–4106
- [26] J. Arima, M. Chiba, T. Ichianagi, Y. Yabuta, N. Mori, T. Aimi, Eryngase: a *Pleurotus eryngii* aminopeptidase exhibiting peptide bond formation activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87 (2010), pp. 1791–1801
- [27] J. Arima, S. Tokai, M. Chiba, T. Ichianagi, Y. Yabuta, N. Mori, T. Aimi, Gene cloning and biochemical characterization of eryngase, a serine aminopeptidase of *Pleurotus eryngii* belonging to the family S9 peptidases, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78 (2014), pp. 1856–1863
- [28] Morty RE, Shih AY, Fulop V, Andrews NW. Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, *FEBS Lett.*, 579 (2005) pp. 2191–2196.
- [29] Usuki H, Uesugi Y, Iwabuchi M, Hatanaka T. Activation of oligopeptidase B from

Streptomyces griseus by thiol-reacting reagents is independent of the single reactive cysteine residue,

Biochim. Biophys. Acta, 1794(2009) pp. 1673–1683.

[30] Polgar L. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle,

Eur J Biochem., 197(1991) pp. 441–447.

[31] Polgar L. Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting,

Biochim J., 283 (1992) pp. 647–648.

[32] Polgar L. Effects of ionic strength on the catalysis and stability of prolyl oligopeptidase,

Biochim J., 312 (1995) pp. 267–271.

[33] Juhasz T, Szeltner Z, Renner V, Polgar L. Role of the oxyanion binding site and subsites S1 and

S2 in the catalysis of oligopeptidase B, a novel target for antimicrobial chemotherapy, Biochemistry,

41(2002) pp. 4096–4106

[34] Y. Matoba, A. Nakayama, K. Oda, M. Noda, T. Kumagai, M. Nishimura, M. Sugiyama,

Structural evidence that puromycin hydrolase is a new type of aminopeptidase with a prolyl

oligopeptidase family fold, Proteins, 79 (2011), pp. 2999–3005

[35] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein

homology-modeling server, Nucleic Acids Res., 31 (2003), pp. 3381–3385

[36] Tokai S, Bito T, Shimizu K, Arima J. Effect of oxidation of the non-catalytic β -propeller

domain on the substrate specificity of serine aminopeptidase from *Pleurotus eryngii*, Biochem

Biophys Res Commun., 487 (2017) pp. 356–361

[37] Tokai S, Bito T, Shimizu K, Arima J. Methionine residues lining the substrate pathway in prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii* play an important role in substrate recognition, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018 Apr 6:1-9. doi: 10.1080/09168451.2018.1459177. [Epub ahead of print]

[38] Fujino T, Watanabe K, Beppu M, Kikugawa K, Yasuda H. Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase, *Biochim Biophys Acta*, 1478(2000) pp. 102-112.

[39] Shimizu K, Kiuchi Y, Ando K, Hayakawa M, Kikugawa K. Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins, *Biochem Biophys Res Commun.*, 324 (2004) pp. 140-146.

[40] Nakai A, Yamauchi Y, Sumi S, Tanaka K. Role of acylamino acid-releasing enzyme/oxidized protein hydrolase in sustaining homeostasis of the cytoplasmic antioxidative system. *Planta.* 2012 Aug;236(2):427-36. doi: 10.1007/s00425-012-1614-1. Epub 2012 Mar 8.

[41] Matoba Y, Nakayama A, Oda K, Noda M, Kumagai T, Nishimura M, Sugiyama M. Structural evidence that puromycin hydrolase is a new type of aminopeptidase with a prolyl oligopeptidase family fold. *Proteins.* 2011;79:2999–3005.

[42] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22:195–201.

- [43] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information *Nucleic Acids Research*. 2014;42(W1): W252–W258.
- [44] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25: 1605–1612.
- [45] Wilk S, Orłowski M. Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by n-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. *J Neurochem*. 1983;41:69–75
- [46] Yoshimoto T, Kado K, Matsubara F, Koriyama N, Kaneto H, Tsura D. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J Pharmacobiodyn*. 1987;10:730–735.
- [47] Bakker AV, Jung S, Spencer RW, Vinick FJ, Faraci WS. Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem J*. 1990;271:559–562
- [48] L. Polgar, Prolyl endopeptidase catalysis A physical rather than a chemical step is rate-limiting, *Biochem. J*. 283 (1992), pp. 647–648
- [49] L. Polgar, E. Kollt, M. Hollosi, Prolyl oligopeptidase catalysis Reactions with thiono substrates reveal substrate-induced conformational change to be the rate-limiting step, *FEBS Lett.*, 322 (1993) 3 pp. 227–230

[50] 千葉真範(2012年3月)エリンギ由来、ペプチド結合形成能を有する新奇アミノペプチダーゼ

の構造機能解析 鳥取大学大学院農学研究科 修士論文

Supplementary material

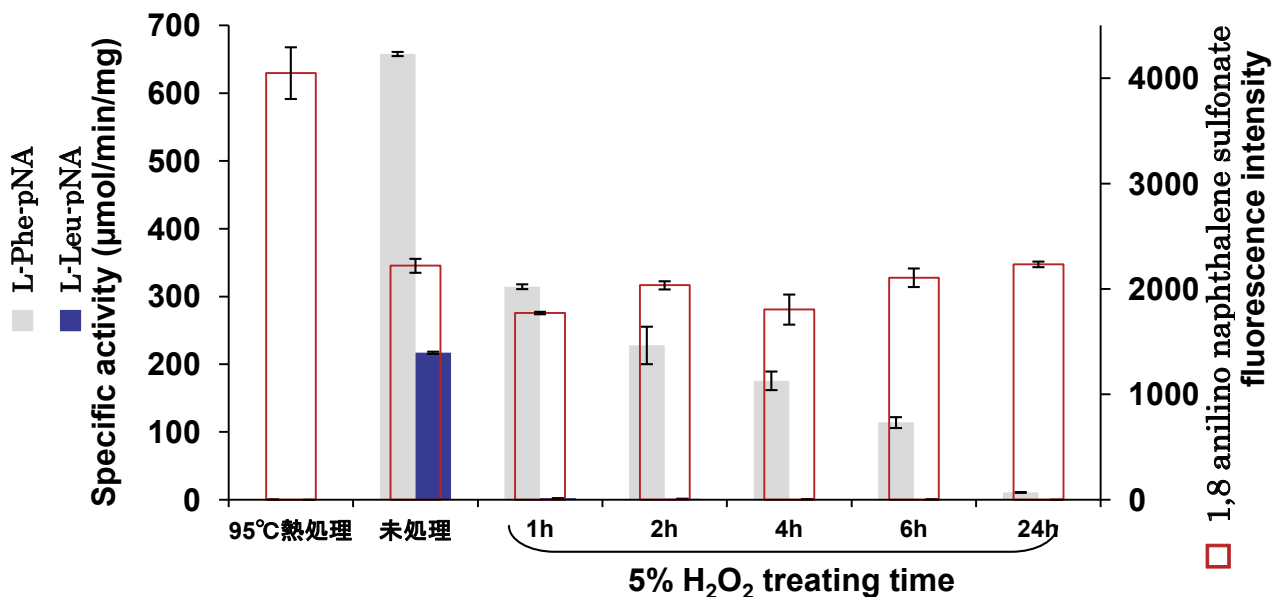


Fig.S1.過酸化水素処理による基質特異性変化と立体構造変化。■ L-Phe-pNA に対する比活性。■ L-Leu-pNA に対する比活性。□ 1,8-anilino naphthalene sulfonate の蛍光度。

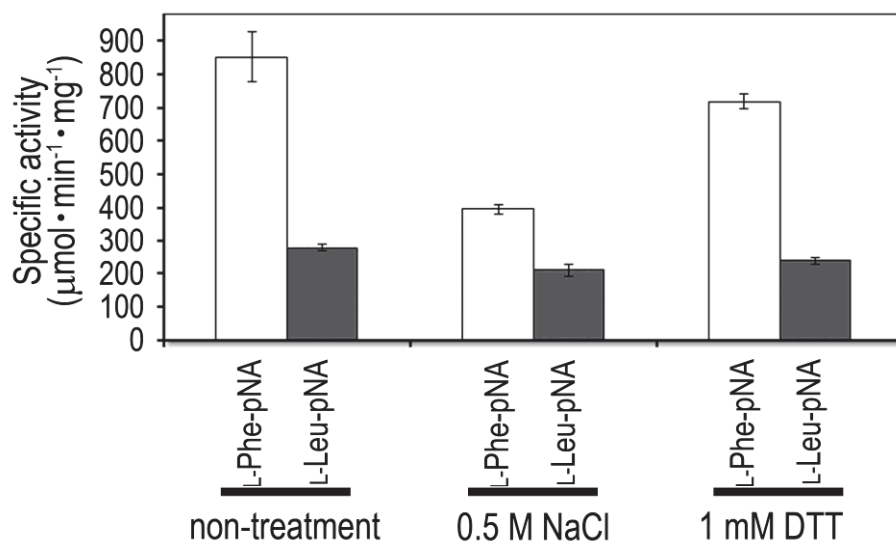


Fig. S2. Effects of reducing agent and high concentration salt on specific activities toward L-Phe-pNA and L-Leu-pNA. White and gray bars indicate the pNA-release activities toward L-Phe-pNA and L-Leu-pNA, respectively. The values of all assays are averages \pm standard deviations of four independent experiments.

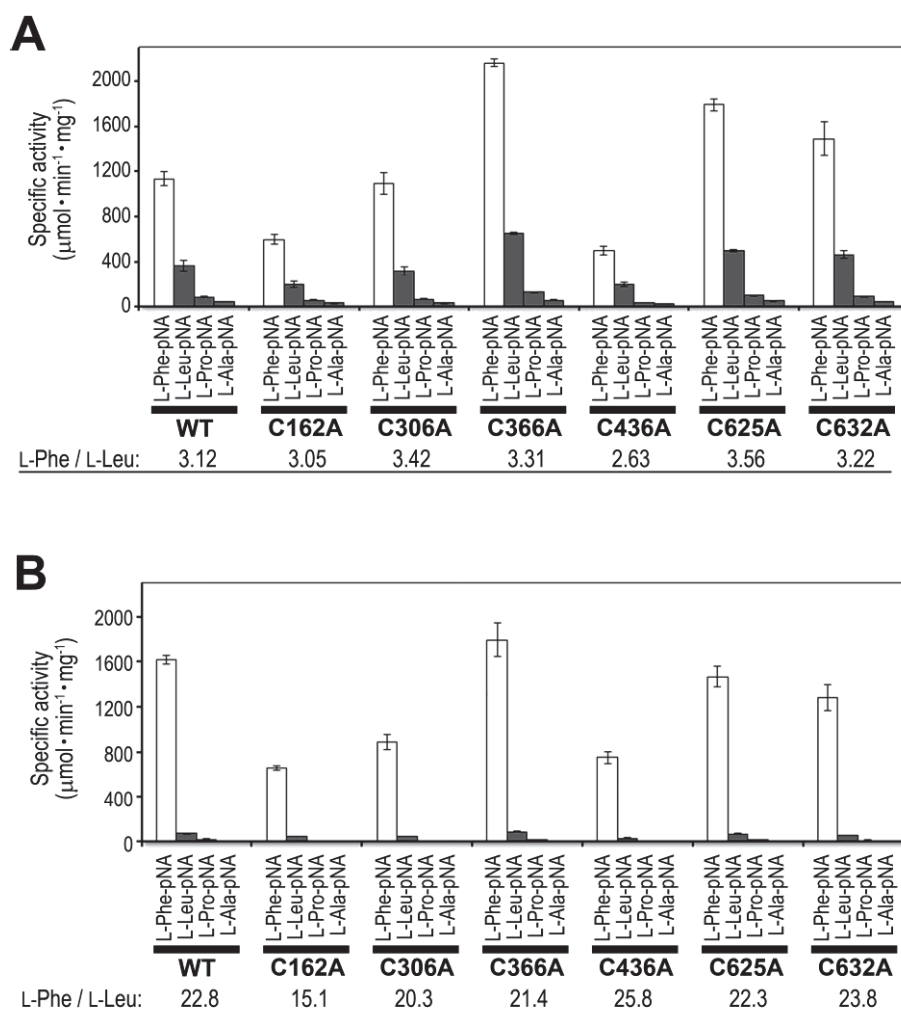


Fig. S3. pNA-release activities of wild-type and mutant enzymes, in which one cysteine residue was substituted with alanine. (A), non-oxidized enzymes and (B), oxidized enzymes. The values of all assays are averages \pm standard deviations of four independent experiments.

Table S1 K_m and k_{cat} values of eryngase mutants towards L-Phe-pNA and L-Leu-pNA

Substrate	L-Phe-pNA			L-Leu-pNA		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
M203F	14	0.054	260	3.4	0.16	22
Y569A	300	0.074	4100	410	0.74	560
M203F/Y569A	770	0.7	1100	17	1.3	12

Table S2 部位特異的変異で使したプライマーの配列

変異酵素	Primer name	Sequence(5' to 3')
H76A	Ery_H76A_F	GCACAGGGGTGGCAGAGTACGGCGG
	Ery_H76A_R	CCGCCGTACTCTGCCACCCCTGTGC
M142A	Ery_M142A_F	GTGGTCGCGATTGCGGAAGATCACAC
	Ery_M142A_R	GTGTGATCTTCCGCAATCGCGACCAC
C162A	Ery_C162A_F	AGTGAACACTCTCGCGGTCATCGACACGGT
	Ery_C162A_R	ACCGTGTTCGATGACCGCGAGAGTGTTCACT
F180A	Ery_F180A_F	TCTGGCGCCGACGCATATTCCAATGCAAGG
	Ery_F180A_R	CCTTGCATTGGAATATGCGTCGGCGCCAGA
W195A	Ery_W195A_F	TAGTCGTCTCGTCGCGCTTCAGTGGTTCCAC
	Ery_W195A_R	GTGGAACCACTGAAGCGCGACGAGACGACTA
W198A	Ery_W198A_F	CGTCTGGCTTCAGGCGTTCACCCGGATAT
	Ery_W198A_R	ATATCCGGGTGGAACGCCTGAAGCCAGACG
W198S	Ery_W198S_F	TCGTCTGGCTTCAGTCATTCCACCCGGATA
	Ery_W198S_R	TATCCGGGTGGAATGACTGAAGCCAGACGA
W198L	Ery_W198L_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_W198L_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
W198F	Ery_W198F_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_W198F_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
W198D	Ery_W198D_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_W198D_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
W198K	Ery_W198K_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_W198K_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
H200A	Ery_H200A_F	GCTTCAGTGGTTCGCGCCGGATATGCCTTG
	Ery_H200A_R	CAAGGCATATCCGGCGCGAACCACTGAAGC
M203A	Ery_M203A_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203A_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
M203S	Ery_M203S_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203S_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
M203L	Ery_M203L_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203L_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
M203F	Ery_M203F_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203F_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
M203D	Ery_M203D_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203D_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC

M203K	Ery_M203K_F	GTTCCACCCGGATGCGCCTTGGGAGGGCTC
	Ery_M203K_R	GAGCCCTCCCAAGGCGCATCCGGGTGGAAC
M203Q	Ery_M203Q_F	GTGGTTCCACCCGGATCAGCCTTGGGAGGG
	Ery_M203Q_R	CCCTCCCAAGGCTGATCCGGGTGGAACCAC
W205A	Ery_W205A_F	CGGATATGCCTGCGGAGGGCTCCGA
	Ery_W205A_R	TCGGAGCCCTCCGCAGGCATATCCG
C306A	Ery_W306A_F	GCAAAATATCCTAGCGACGGCGTGGAAGGA
	Ery_W306A_R	TCCTTCCACGCCGTCGCTAGGATATTTTGC
C366A	Ery_W366A_F	TGCTATCATTCGTGCGACCCTGCCGTCTTC
	Ery_W366A_R	GAAGACGGCAGGGTCGCACGAATGATAGCA
C436A	Ery_C436A_F	GATGAATCACCGCCTGCGGTTGTGAATGTC
	Ery_C436A_R	GACATTCACAACCGCAGGCGGTGATTCATC
F565A	Ery_F565A_F	GAGTCCACGCACAAGGCAGAATCTCAATAC
	Ery_F565A_R	GTATTGAGATTCTGCCTTGTGCGTGGACTC
M570A	Ery_F570A_F	AGTTTGAATCTCAATACGCGAACAAGCTCG
	Ery_F570A_R	CGAGCTTGTTTCGCGTATTGAGATTCAAAC
M570F	Ery_M570F_F	AGTTTGAATCTCAATACTTCAACAAGCTCG
	Ery_M570F_R	CGAGCTTGTTGAAGTATTGAGATTCAAAC
M570E	Ery_M570E_F	AGTTTGAATCTCAATACGAAAACAAGCTCG
	Ery_M570E_R	CGAGCTTGTTTTTCGTATTGAGATTCAAAC
M570K	Ery_M570K_F	AGTTTGAATCTCAATACAAAAACAAGCTCG
	Ery_M570K_R	CGAGCTTGTTTTTGTATTGAGATTCAAAC
M570Q	Ery_M570Q_F	AGTTTGAATCTCAATACCAGAACAAGCTCG
	Ery_M570Q_R	CGAGCTTGTTCTGGTATTGAGATTCAAAC
W198A/M203Q	Ery_W198A/M203Q_F	GGCGTTCCACCCGGATCAGCCTTGGGAGGG
	Ery_W198A/M203Q_R	CCCTCCCAAGGCTGATCCGGGTGGAACGCC
Y569A	Ery_Y569A_F	AGTTTGAATCTCAAGCGATGAACAAGCTCG
	Ery_Y569A_R	CGAGCTTGTTTCATCGCTTGGAGATTCAAAC
M620A (M620T gained)	Ery_M620A_F	CTGAACAGGCGCGAGATAC
	Ery_M620A_R	GTATCTCGCGCCTGTTTCAG
C625A	Ery_C625A_F	GCGAGATACTATTGCGGCAAATGGTGGGGT
	Ery_C625A_R	ACCCACCATTTGCCGCAATAGTATCTCGC
C632A	Ery_C632A_F	GGTGGGGTGGTGGCGTATAAACTATATG
	Ery_C632A_R	CATATAGTTTATACGCCACCACCCACC

W198A/M203Q 以外の二重以上の変異酵素作成には、シングル変異用プライマーを使用した。

系統樹作成に使用した酵素群と配列情報

Table S2. List of family S9 enzymes from different species used for the construction of phylogenetic tree (Figure 1a of the main text)

Entry	Species	Domain of life	MEROPS ID ¹⁾	Subfamily
1	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Archaea	MER000398	S9A
2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Protozoa	MER022823	S9A
3	<i>Drosophila melanogaster</i>	Animal	MER011450	S9A
4	<i>Sus scrofa</i>	Animal	MER000392	S9A
5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER002490	S9A
6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER015621	S9A
7	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER004227	S9A
8	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Protozoa	MER082498	S9A
9	<i>Escherichia coli</i>	Bacteria	MER000410	S9A
10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER011872	S9A
11	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Bacteria	MER001423	S9B
12	<i>Drosophila melanogaster</i>	Animal	MER01123	S9B
13	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER000399	S9B
14	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER000401	S9B
15	<i>Rattus norvegicus</i>	Animal	25253 ²⁾	S9B
16	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungi	MER004504	S9B
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungi	MER000404	S9B
18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungi	MER000405	S9B
19	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacteria	MER004211	S9B
20	<i>Streptomyces thermocyanoviolaceus</i>	Bacteria	MER195666	S9B
21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER005994	S9B
22	<i>Pseudomonas sp. WO24</i>	Bacteria	MER058228	S9B
23	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bacteria	MER002813	S9B
24	<i>Drosophila melanogaster</i>	Animal	MER011413	S9B
25	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER013484	S9B
26	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER004923	S9B
27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER004925	S9D
28	<i>Homo sapiens</i>	Animal	MER000408	S9C
29	<i>Aeropyrum pernix</i>	Archaea	MER005807	S9C
30	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Archaea	MER017401	S9C
31	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungi	MER000263	S9C
32	<i>Giardia intestinalis</i>	Protozoa	MER016096	S9C
33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant	MER015682	S9C

34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Bacteria	5863270 ²⁾	S9C
35	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Animal	MER001920	S9C
<i>C. cinerea</i>	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Fungi	9378566 ²⁾	unknown
<i>P. placenta</i>	<i>Postia placenta</i>	Fungi	8141030 ²⁾	unknown
<i>S. commune</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	Fungi	9586821 ²⁾	unknown
<i>A. cellulolyticus AP</i>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Bacteria	4485406 ²⁾	unknown
<i>S. morookaensis AP</i>	<i>Streptomyces morookaensis</i>	Bacteria	AB220645 ³⁾	unknown
<i>S. griseus, AP</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	Bacteria	SGR1153 ⁴⁾	unknown
<i>S. thermocyaneoviolaceus AP</i>	<i>Streptomyces thermocyaneoviolaceus</i>	Bacteria	AB480284 ³⁾	unknown
<i>A. cellulolyticus AP</i>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Bacteria	4485406 ²⁾	unknown
Eryngase (This study)	<i>Pleurotus eryngii</i>	Fungi	AB918644	unknown

¹⁾ ID of MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/>), ²⁾ ID of NCBI genbank, ³⁾ ID of DDBJ genbank, ⁴⁾ ID of *Streptomyces griseus* genome project (<http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/>)

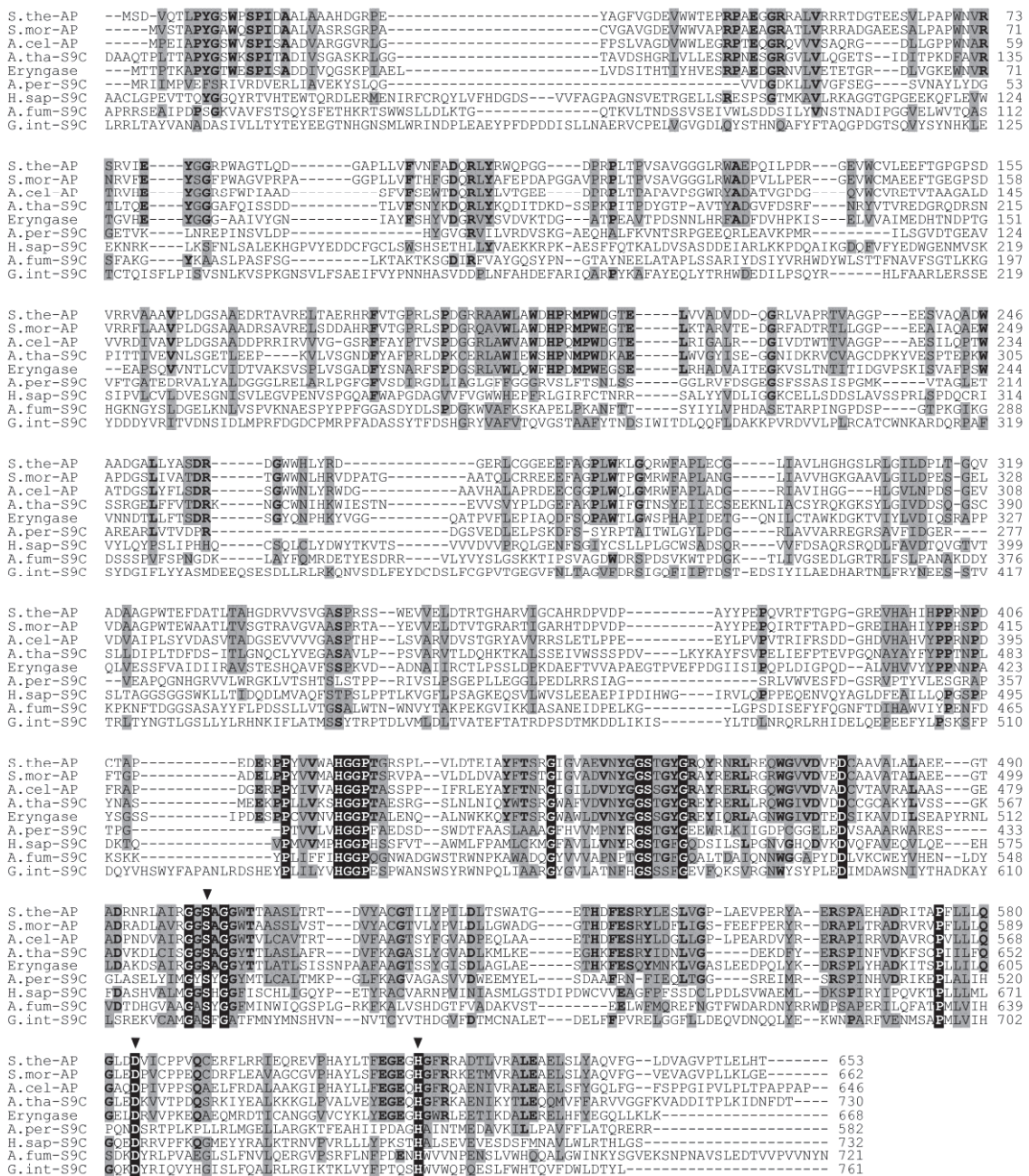


Fig. S4. Alignment of full-length amino acid sequence of eryngase and other proteins of family S9 peptidases. Multiple sequence alignment was performed using the CLUSTAL algorithm. Residues conserved among all proteins are highlighted in black. Residues functionally conserved among eryngase and aminopeptidases are highlighted in gray. Bold type denotes the residues conserved among eryngase and aminopeptidases. Residues composing the catalytic triad are indicated by arrowheads. Proteins: S.the-AP, S9 aminopeptidase from *S. thermocyanoeviolaceus*; S.mor-AP, puromycin hydrolase from *S. morookaensis* which belongs to S9 aminopeptidase; A.cel-AP, S9 aminopeptidase from *A. cellulolyticus*; A.the-S9C, tyrosyl aminopeptidase from *A. thaliana*; A.per-S9C, acylaminoacyl-peptidase from *A. pernix*; H.sap-S9C, acylaminoacyl-peptidase from *H. sapiens*; A.fum-S9C, dipeptidyl-peptidase from *A. fumigatus*; G.int-S9C, dipeptidyl-peptidase from *G. intestinalis*.

摘要

エリンギ由来のファミリーS9 のプロリルオリゴペプチダーゼに属す酵素 *eryngase* は、本酵素の過酸化水素処理により基質特異性が変化することを見出した。酸化処理により本酵素の pNA 基質に対する活性は、芳香族の基質に対して維持されたが、一方で、アルキル鎖の基質に対して激減した。本属酵素の基質認識機構は、それらの薬理的な重要性から興味深い研究対象であるが、活性部位を覆う β -プロペラドメインが、その機構解明を複雑にしている。本酵素のトリプシン消化ペプチド断片の MALDI-TOF MS 解析により、本付属ドメインの表面に位置する Met203 の側鎖構造がメチオニンスルフォキシドに酸化されることで、特異性変化が起こると考えられた。さらに、Met203 のより小さなアミノ酸残基への変異は、野生型酵素の酸化で観察されたものと似た基質への特異性を示し、Met203 の Phe への置換では、酵素活性の激減を招いた。従って、Met203 は取り込む基質のゲートに関わる可能性がある (第1章)。

他の Met 残基もまた過酸化水素処理で酸化されるはずであるため、我々は全ての Met を他の残基に置換した変異酵素を比較検討し、酸化に伴う特異性変化に関わる残基として触媒ドメインに位置する Met570 を特定した。Met203 と Met570 は異なるドメインの表面に位置し、酵素表面から活性中心に続く通路の一部を形成する。従って、この通路が基質の通り道を形成し、基質認識の役割を持つと考えられる (第2章)。

上記の第1章と第2章の研究では、芳香族の認識に関わる残基を本予測通路から特定できなかった。そこで、我々は本経路の更なる変異解析を行い、芳香族基質の認識に関わる残基として β -プロペラドメインに位置する His76、Phe180 及び Trp198 を特定した。それら残基の構造置換は、Met203 や Met570 の酸化に伴う活性変化とは逆の基質特異性の変化を示した。従って、本研究の結果はアルキルと芳香族の異なる種類の基質への認識における本経路の機能の考察を提供する（第3章）。

一方で、本酵素は加水分解と拮抗してペプチド結合形成反応であるアミノリシスを触媒する。酸化処理した本酵素は、加水分解よりもアミノリシスの活性が上昇した。従って、予想される基質取り込み経路を介した本酵素の基質認識機構の解明が、活性部位の改変に代わり、ペプチド合成に特化した酵素を取得するための重要なアプローチになると考えられる（第4章）。

Summary

We have found that an S9 family prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii* alters the substrate specificity of the enzyme following hydrogen peroxide treatment. The activity of eryngase for aromatic amino acid p-nitroanilide (pNA) was maintained by oxidation but was dramatically reduced for alkyl amino acid pNA substrates. The mechanism of substrate recognition in the enzyme belonging to same family is of interest because of their pharmacological importance, but its elucidation is difficult by β -propeller domain covering the active site. MALDI-TOF MS analysis using tryptic peptides of eryngase indicated that the change in substrate specificity was triggered by oxidizing Met203 lies on surface of this domain to methionine sulfoxide. In addition, mutations of Met203 to smaller residues provided specificity similar to one observed following oxidation of the wild-type eryngase and substitution of Met203 with Phe significantly decreased activity. Therefore, Met203 is likely involved in substrate gating (First chapter).

The other Met residues should also be oxidized by hydrogen peroxide treatment, we assessed mutants in which all the Met residues were substituted with other amino acids, and identified Met570 in the catalytic domain, which another potent residue for the altered substrate specificity following oxidation. Met203 and Met570 lie on the surfaces of different domains and form part of a funnel from the surface to the active center. Therefore, the funnel is considered to

form the substrate pathway and play a role in substrate recognition (Second chapter).

In both studies in first and second chapter, we could not identify the residue involved in the recognition of aromatic substrate from the predicted pathway. By more mutation analysis into the pathway, we identified His76, Phe180 and Trp198 in β -propeller domain, which have a role in recognition of aromatic substrate. Structural substitution of them exhibited the change in substrate specificity opposite that of oxidation of Met203 and Met570. Therefore, these results provided the discussion that function of the possible pathway on recognition of alkyl and aromatic substrates at side chains (Third chapter).

On other hand, eryngase exhibits the activity that peptide bond formation (aminolysis) in accordance with hydrolysis. By Oxidative treatment, eryngase increased the aminolysis activity more than hydrolysis activity of the enzyme. We believe that the elucidation of the mechanism of substrate recognition through the predicted substrate pathway is important approach to get a specific enzyme for peptide synthesis, which is alternative to modification of active site (fourth chapter).

学位論文に関連する投稿論文

- (1) Tokai Shota, Bito Tomohiro, Shimizu Katsuhiko, Arima Jiro. Effect of oxidation of the non-catalytic β -propeller domain on the substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017 May 27;487(2):356-361. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.064. Epub 2017 Apr 13.

This article is corresponding to chapter 1 of the thesis.

- (2) Tokai Shota, Bito Tomohiro, Shimizu Katsuhiko, Arima Jiro. Methionine residues lining the substrate pathway in prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii* play an important role in substrate recognition, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2018 Apr 6:1-9. doi: 10.1080/09168451.2018.1459177. Epub 2018 Apr 06

This article is corresponding to chapter 2 of the thesis.