

(様式第 13号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 東海 彰太

題目: 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)

本研究は、エリンギ由来のファミリーS9 プロリルオリゴペプチダーゼ (S9 POP) に属する酵素 eryngase が、過酸化水素処理により基質特異性が変化することに着目し、本酵素の基質認識及び基質取り込み機構の解明、そして本酵素のペプチド合成ツールとしての利用拡大を目指したものである。

S9 POP は自然界に広く分布しており、ヒトでは、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、アルツハイマー病の疾病に大きく関わり、ある種の *Trypanosoma* 属が持つ S9 POP では、トリパノソーマ病を引き起こす病原因子の一つであると考えられている。このように S9 POP の薬理的な重要性から、ドラッグデザインにおいて、その基質認識機構の解明が期待されているが、完全な解明には至っていない。S9 POP は特徴的な付属構造である β -プロペラドメインと、化学反応の場を提供する触媒ドメインから構成されており、この複雑な構造が、基質認識機構が未解明である原因として挙げられる。 β -プロペラドメインは、触媒ドメイン上の活性部位に、大きな基質が侵入することを物理的に防ぐための蓋の役割を持つと考えられている。本研究では、本ドメインが基質の侵入の制限だけでなく、活性部位への基質の誘導も行う可能性を見出した。この事実は、S9 POP の基質認識メカニズムの理解に大きく寄与するものであり、eryngase の応用利用への展開も期待できるものであった。以下に本研究の具体的な内容と成果を示す。

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 — 様々な生物由来の S9 POP は、化学的処理によって基質特異性の変化が頻繁に観察されている。この特異性変化は、S9 POP が持つ基質認識機構に対して何らかの影響を受けることで引き起こされると予測できる。本研究対象である eryngase もまた、過酸化水素処理によりアミノアシル-pNA 基質に対する pNA 遊離活性の特異性に影響を及ぼした。具体的には、芳香族を側鎖に持つ基質に対して活性は維持されたが、アルキル鎖を側鎖に持つ基質に対する活性が激減した。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、 β -プロペラ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 Phe への置換は、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考えられた。

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 — 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、全ての Met を他の残基に置換した変異酵素を調製し、酸化に伴う特異性変化を評価した。

その結果、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た。

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 — 基質の通り道を構成する残基について、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 -プロペラドメインの内側に位置する **His76**、**Phe180** 及び **Trp198** を特定した。こ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、本経路は基質の取り込みだけでなく、経路内に入った基質の触媒部位への誘導も担うと考えられた。

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 — *eryngase* 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。アミノリシスでは、アシル酵素中間体が別の基質のアミノ基による求核攻撃を受け、ペプチド結合が形成される。本経路は認識する基質を調節する機能を持つと予想されたため、経路を構成するアミノ酸の酸化や変異は、水やアミノ基の認識にも影響すると考えられた。そこで、酸化処理した酵素のペプチド結合能を評価したところ、加水分解よりもアミノリシス活性の上昇が観察された。従って、本経路の改変が、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可能性が示された。

現在、**S9 POP** の基質取り込みを担う経路として、 β -プロペラドメインの頂点に空いた穴を通る経路と、本ドメインの最初と最後の逆平行 β -シートの間隙を通る経路の、二つの経路が予想されている。一方で、基質の侵入は β -プロペラドメインの動的変動や本ドメインのループの配向の変化により、両ドメインをつなぐ蝶番の反対側にある両ドメインの間隙が拡大することで、基質が酵素内部に取り込まれるとも考えられている。本研究によって予想された経路は後者のものであり、本論文研究で得られた成果は、**S9 POP** を対象としたドラッグデザインやペプチド合成への利用展開に有益な情報を与えるものである。