

# 学位論文

メロン由来タンパク質分解酵素ククミシン  
およびククミシン-プロペプチド複合体の  
結晶構造解析

2016年 9月

鹿児島大学 大学院理工学研究科  
博士後期課程 システム情報科学専攻

外川内 亜美

# 目次

要旨.....	1
第1章 研究背景.....	3
1-1 セリン型プロテアーゼ.....	4
1-1-1 セリン型プロテアーゼ.....	4
1-1-2 セリン型プロテアーゼの反応機構.....	4
1-2 ククミシン.....	6
1-2-1 ククミシン.....	6
1-2-2 ククミシンの精製.....	8
1-2-3 ククミシンの安定性.....	9
1-2-4 ククミシンの基質特異性.....	11
1-2-5 ククミシンのプロペプチド.....	14
第2章 ククミシンの結晶構造.....	15
2-1 小序論.....	16
2-2 方法.....	16
2-2-1 ククミシンの結晶化.....	16
2-2-2 ククミシンの X 線結晶構造解析.....	17
2-2-3 ククミシンの X 線結晶構造の位相決定と原子モデルの精密化.....	17
2-2-4 結晶構造の解析.....	17
2-2-5 示差走査蛍光定量法.....	18
2-3 結果と考察.....	19
2-3-1 ククミシンの原子モデルの構築と精密化.....	19
2-3-2 ククミシンの結晶構造.....	22
2-3-2-1 全体構造.....	22
2-3-2-2 N 末端の構造.....	25
2-3-2-3 活性中心周辺の構造.....	26
2-3-2-4 ククミシンの立体構造の相同性検索.....	27
2-3-3 ククミシンの熱安定性の評価.....	30
2-3-3-1 ククミシンの融解温度.....	30
2-3-3-2 カルシウム結合サイト.....	31
2-3-3-3 ジスルフィド結合.....	35
2-3-3-4 安定性に寄与するアミノ酸の分布.....	36
第3章 ククミシン-プロペプチド 複合体の結晶構造.....	38
3-1 小序論.....	39
3-2 方法.....	39

3-2-1	プロペプチドの合成.....	39
3-2-1-1	RNA 抽出.....	39
3-2-1-2	cDNA の作成およびクローニング.....	39
3-2-1-3	プロペプチドの発現および精製.....	42
3-2-1-4	阻害活性測定.....	43
3-2-2	ククミシン-プロペプチド複合体の結晶化.....	44
3-2-3	ククミシン-プロペプチド複合体の X 線結晶構造解析.....	45
3-2-4	ククミシン-プロペプチド複合体の X 線結晶構造の位相決定と原子モデルの精密化.....	45
3-2-5	結晶構造の解析.....	45
3-3	結果と考察.....	46
3-3-1	プロペプチドの精製および阻害活性測定.....	46
3-3-2	ククミシン-プロペプチド複合体の原子モデルの構築と精密化.....	48
3-3-3	ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造.....	50
3-3-3-1	全体構造.....	50
3-3-3-2	ククミシン-プロペプチド複合体の相同性検索.....	52
3-3-3-3	ククミシン-プロペプチド複合体における活性サイトの構造.....	54
3-3-4	ククミシンのサブサイトと基質特異性.....	56
3-3-5	ククミシンの構造変化.....	58
第 4 章	プロペプチドによる ククミシンの阻害機構.....	62
4-1	小序論.....	63
4-2	方法.....	63
4-2-1	C 末端欠損プロペプチドの合成.....	63
4-2-1-1	C 末端欠損プロペプチドの発現系の構築.....	63
4-2-1-2	C 末端欠損プロペプチドの発現と精製.....	63
4-2-2	C 末端ヘプタペプチドの合成.....	64
4-2-3	プロペプチド変異体およびペプチドの阻害活性測定.....	65
4-2-4	プロペプチドによる阻害ククミシンの再活性化.....	66
4-3	結果と考察.....	67
4-3-1	ククミシン-プロペプチド間の相互作用.....	67
4-3-2	先行研究のプロペプチド変異体との構造相関.....	70
4-3-3	C 末端欠損プロペプチドの合成.....	73
4-3-4	C 末端ヘプタペプチドの合成.....	74
4-3-5	プロペプチド変異体と構造相関と阻害機構.....	75
4-4	ククミシン前駆体の活性化機構.....	76
4-4-1	ククミシン前駆体の活性化機構の予測.....	76

4-4-2	プロペプチドによる阻害ククミシンの再活性化.....	78
第5章	総括.....	80
記号・略号	.....	83
アミノ酸の略号	.....	83
その他の略号	.....	84
参考論文	.....	86
研究業績	.....	90
主論文	.....	90
学会報告	.....	90
謝辞	.....	93



## 図表目次

図 1-1	キモトリプシンの反応機構 .....	5
図 1-2	ククミシンの至適温度および至適 pH .....	7
図 1-3	成熟および未成熟メロン果汁のカゼイン分解活性測定 .....	7
図 1-4	ククミシンの精製チャートおよび SDS-PAGE.....	8
図 1-5	ククミシンの熱および pH 安定性 .....	9
図 1-6	アルカリ条件下における熱安定性 .....	10
図 1-7	ククミシンによる切断サイトのアミノ酸の分布 .....	13
図 1-8	プロペプチド変異体の $K_i$ 値 .....	14
図 2-1	ククミシンの結晶の写真 .....	16
図 2-2	ククミシン分子のラマチャンドラン・プロット .....	21
図 2-3	ククミシンの主鎖の温度因子分布 .....	21
図 2-4	ククミシンの結晶構造 .....	23
図 2-5	ククミシン, SBT3 (トマトサブチラーゼ), BPN' (サブチリシン BPN') の ドメイン構成の比較.....	24
図 2-6	ククミシンの N 末端の構造 .....	25
図 2-7	ククミシンの活性部位周辺の構造 .....	26
図 2-8	ククミシン, SBT3 および BPN' の立体構造.....	27
図 2-9	ククミシン, SBT3 および BPN' の一次構造と二次構造の比較.....	28
図 2-10	ククミシンと SBT3 の構造の比較.....	29
図 2-11	示差走査蛍光定量法の結果.....	30
図 2-12	ククミシン, サブチリシン BPN' およびサーミターゼの比較.....	31
図 2-13	サブチリシン BPN' のカルシウム結合部位 1 とククミシンの構造 .....	32
図 2-14	サブチリシン BPN' のカルシウム結合部位 2 とククミシンの構造 .....	33
図 2-15	サーミターゼのカルシウム結合部位 3 とククミシンの構造 .....	34
図 2-16	ククミシンと SBT3 のジスルフィド結合 .....	35
図 2-17	ククミシンのアミノ酸分布 .....	37
図 3-1	ククミシン-プロペプチド導入 pET21c のコンストラクト.....	40
図 3-2	プロペプチドの翻訳領域 .....	41
図 3-3	プロペプチドの精製チャートおよび SDS-PAGE.....	46
図 3-4	各濃度のプロペプチドによるククミシンの阻害活性 .....	47
図 3-5	ククミシン-プロペプチド複合体のラマチャンドラン・プロット .....	49
図 3-6	ククミシン-プロペプチド複合体のドメイン構造と主鎖の温度因子分布 .....	49
図 3-7	ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造 .....	50
図 3-8	プロペプチドの構造 .....	51

図 3-9	ククミシン-プロペプチドとサブチリシンプロペプチドの一次構造と二次構造の比較.....	53
図 3-10	ククミシン-プロペプチドとサブチラーゼプロペプチドの一次構造の比較.....	53
図 3-11	ククミシン-プロペプチド複合体の活性サイト周辺の構造.....	55
図 3-12	ククミシンのサブサイト（基質結合ポケット）の構造.....	57
図 3-13	成熟型ククミシンとククミシン-プロペプチド複合体の構造比較.....	59
図 3-14	成熟型ククミシンとプロペプチド複合体のククミシンの二次構造の比較.....	60
図 3-15	ククミシンの構造変化.....	61
図 4-1	ククミシン-プロペプチド間の相互作用.....	68
図 4-2	先行研究におけるプロペプチドの変異箇所立体構造.....	72
図 4-3	C末端欠損プロペプチドの精製.....	73
図 4-4	精製ヘプタペプチドの逆相 HPLC による分析.....	74
図 4-5	プロペプチド変異体によるククミシンの阻害実験.....	75
図 4-6	ククミシン前駆体の予測活性化機構の模式図.....	77
図 4-7	ククミシン-プロペプチド複合体におけるトリプシンの影響.....	79
表 1-1	ククミシンの精製.....	8
表 1-2	ククミシンによる $pNa$ 分解速度.....	11
表 1-3	ククミシンによる加水分解の P1 の影響.....	12
表 2-1	ククミシン結晶の回折像統計値および構造精密化統計値.....	20
表 2-2	ククミシン, SBT3, BPN' のアミノ酸の分布.....	37
表 3-1	ククミシン-プロペプチド複合体の結晶の回折像統計値および構造精密化統計値.....	48
表 4-1	C末端ヘプタペプチド精製のための HPLC の溶出条件.....	64
表 4-2	ククミシン-プロペプチド間の水素結合.....	69

## 要旨

本論文はセリン型エンドペプチダーゼであるククミシンの結晶構造解析およびククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造解析から、ククミシンの構造-機能相関についてまとめたものである。

メロン果肉由来のタンパク質分解酵素であるククミシンを精製し、結晶化して X 線結晶構造解析を行い、ククミシンの結晶構造を解析した。ククミシンは3つのドメインで構成されており、その構造は134アミノ酸残基からなる protease-associated (PA) ドメインが挿入された390残基の触媒ドメイン、97残基のC末端 fibronectin (Fn)-III 様ドメインであった。

カルシウムイオンが結合することによって安定化し、活性化する細菌由来のサブチリシンと異なり、ククミシンの構造はカルシウムや他の金属イオンを必要とせず、カルシウム結合サイトに相当するループ構造が周辺のアミノ酸残基同士で水素結合を形成しゆらぎにくい構造をしていた。さらに、サブチリシンには存在しないジスルフィド結合に加えて、芳香族アミノ酸やプロリンの分布の違いがククミシンの安定性に寄与していると考えられた。

中川らは、ククミシンのプロペプチドが成熟型ククミシンの活性を阻害すると報告していることから (Nakagawa, 2010), リコンビナントプロペプチドの発現系を構築し、成熟型ククミシンとリコンビナントプロペプチドの複合体の結晶構造解析を行った。結晶構造解析の結果、プロペプチドは4本の $\beta$ ストランドからなる逆平行の $\beta$ シートと2本のヘリックスの $\alpha$ - $\beta$ サンドイッチ構造とC末端のフラグメントで構成されていた。ククミシン-プロペプチド複合体は、ククミシンの活性サイトにプロペプチドのC末端が挿入している形で複合体を形成しており、枯草菌由来のサブチリシン E のプロペプチド複合体の構造と類似していた。プロペプチドの $\beta$ シートと成熟型ククミシンの界面は互いの疎水性アミノ酸の疎水性相互作用によって密着していた。さらに、その周辺の多くの分子間水素結合によって、成熟型ククミシンとプロペプチドは強固に結合していた。プロペプチドのC末端が、単に活性サイトを塞ぐだけでなく、プロペプチドが離脱しにくい構造を取っていたことでククミシンはプロペプチドで阻害されるものと考えられた。

ククミシンの活性サイトとプロペプチドの結合領域の構造より、ククミシンのサブサイト1は広く深いポケットであり、主に極性非電荷のアミノ酸が分布していたことから、極性非電荷のアミノ酸を好み、有電荷のアミノ酸を好まないというククミシンの基質特異性と一致していた。また、オキシアニオンホールペアを形成する Asn307 がポケットの入口付近に位置しており、 $\beta$ 炭素から分岐しているアミノ酸も好まないと考えられた。この点においてもククミシンの基質特異性と一致していた。

プロペプチドのC末端がククミシンのサブサイト1に結合していたことから、ククミシン前駆体において、プロペプチドのC末端と成熟型ククミシンのN末端の間は分子内自己

分解で切断され、本研究で得られたククミシン-プロペプチド複合体の構造に至ると考えられた。その後、すでに活性化されているククミシンやその他のプロテアーゼにより、プロペプチドが切断されてククミシンの活性化が起こる可能性が示唆された。

# 第1章 研究背景

## 1-1 セリン型プロテアーゼ

### 1-1-1 セリン型プロテアーゼ

タンパク質分解酵素は加水分解酵素であり、タンパク質のペプチド結合を加水分解する反応を触媒する。国際生化学・分子生化学連合 (IUBMB) は、タンパク質分解酵素は触媒残基の構造の違いにより、触媒残基に活性セリンが配置しているものを「セリン型」、活性システインが配置しているものを「システイン型」、酸性アミノ酸が配置しているものを「酸性型」、金属イオンが配位しているものを「金属型」と定義している。本論文ではセリン型プロテアーゼの構造と機能を中心に研究を進めた。

### 1-1-2 セリン型プロテアーゼの反応機構

セリン型プロテアーゼの触媒残基は Asp, His, Ser であり、この触媒トライアドと呼ばれる3つのアミノ酸残基が数 Å ( $10^{-10}$  m) 以内に配置されている (1)。

キモトリプシンを例にセリン型プロテアーゼの反応機構を図 1-1 に示した。基質の P1 位の側鎖が基質結合ポケットに結合すると Asp102 と His57 に構造的に負荷がかかり、低障壁水素結合が2つの側鎖の間で形成される。これにより His57 の  $pK_a$  が上昇し、His57 は一般塩基触媒として Ser195 のヒドロキシ基からプロトンを引き抜くことができるようになる。Ser195 の求核性の酸素は基質ペプチドの P1 と P1' の間のペプチド結合のカルボニル炭素を攻撃し、負電荷をもつ Asp102 のカルボキシ基は His57 の正電荷を安定化させ、遷移状態に近い四面体中間体が形成される。

四面体中間体の負に荷電した酸素は、Ser195 のアミノ基と触媒残基ではない近傍のアミノ酸 (オキシアニオンホールパートナー) の Gly193 との間で水素結合を形成し、オキシアニオンホールがつくられる。His のイミダゾリウムイオンが一般酸触媒としてはたらき、ペプチド結合の窒素にプロトンを供与して切断しやすくする。酵素と結合している P1 位のカルボニル基は、酸素と共有結合してアシル酵素中間体になり、基質のペプチド結合が切断され、新しくできたアミノ末端をもつアミン生成物が活性部位から離れる。

次に、P1 位のアミノ酸の分離反応であるアシル酵素中間体の脱アシル反応が起こる。His57 が水分子からプロトンを引き抜き、OH 基がエステルのカルボニル基を攻撃して Asp102 が His57 の正電荷を安定化すると、第二の四面体中間体が形成されオキシアニオンホールによって安定化する。His57 のイミダゾリウムイオンは再度一般酸触媒としてはたらき、新たなカルボキシ末端をもったカルボン酸生成物が活性部位から外れて遊離の酵素が再生される。

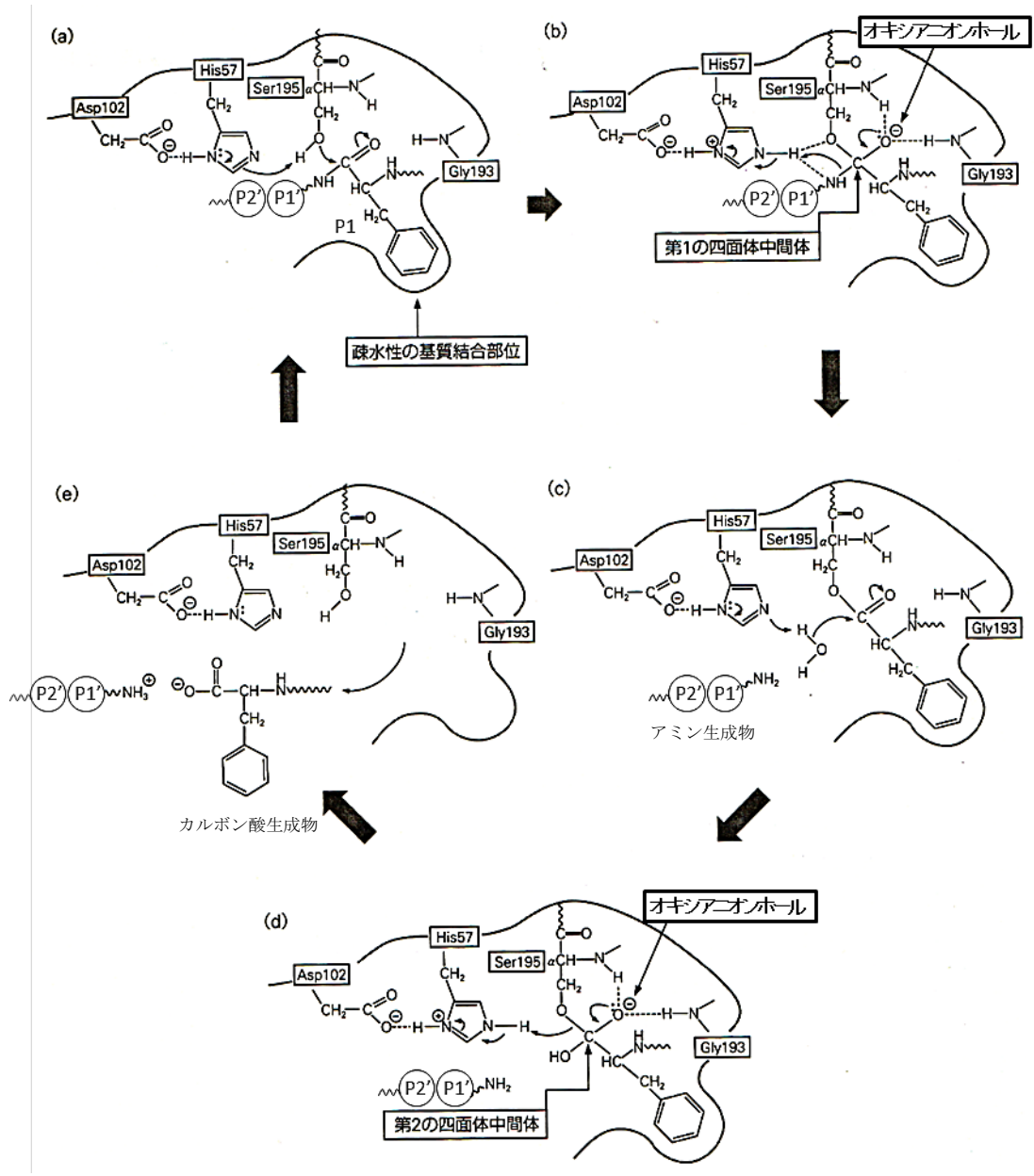


図 1-1 キモトリプシンの反応機構

長谷川慎, 石水 毅, 有馬一成, 前田衣織 著 (2014) 生体高分子の基礎 はじめてのバイオ分子化学 実教出版 pp44 改変

## 1-2 ククミシン

### 1-2-1 ククミシン

ククミシン (Cucumisin) [EC 3.4.21.25] はプリンスメロン (*Cucumis melo* L. ver. Prince) の果肉から精製されたプロテアーゼである (2)。典型的なセリン型プロテアーゼ阻害剤である DFP (Diisopropyl fluoro phosphate) や PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) で阻害されるが、トリプシン様阻害剤であるロイペプチンや STI (soybean trypsin inhibitor) などの天然由来の阻害剤で阻害されない (2-5)。ククミシンは 621 残基のアミノ酸からなり、分子質量は 67 kDa と動物由来のセリン型プロテアーゼであるトリプシン (23 kDa) や、細菌由来のサブチリシン (27 kDa) より非常に大きい構造を取っている (6)。1975 年の発見当初、ククミシンはおおよそ 50 kDa とされていたが、67 kDa のククミシンは時間経過に伴い、54 kDa と 14 kDa に自己分解することが確認された (4)。マスクメロン (*Cucumis melo* L. ver. *reticulatus* cv. Teresa) の遺伝子解析により、ククミシンはアミノ酸 22 残基のシグナル配列、88 残基のプロ配列、505 残基のプロテアーゼ部分および 116 残基の C 末端ペプチド部分で構成されていた (6)。一次構造上の触媒残基の出現の順 (Asp140-His204-Ser525) とその周辺のアミノ酸残基の保存性から、ククミシンはサブチリシン様プロテアーゼ (clan SB, family S8, subfamily S8B) に分類された (7)。ククミシンの至適温度は 70°C、至適 pH は 10.2~11.2 であることから、ククミシンは耐熱性アルカリ性のプロテアーゼと言える (図 1-2) (2,4)。

メロン果実の成熟段階によるノーザンブロット解析により、ククミシンの mRNA の合成は受粉後 9 日でピークに達するが (8)、未成熟果実と成熟果実の果汁の酵素活性をそれぞれ測定すると、成熟果実は未成熟果実の 5 倍の活性を示した (図 1-3)。

医学的な知見として、ククミシンの N 末端付近のペプチドがメロンアレルギーのアレルゲンとなる可能性があることが報告された (9)。



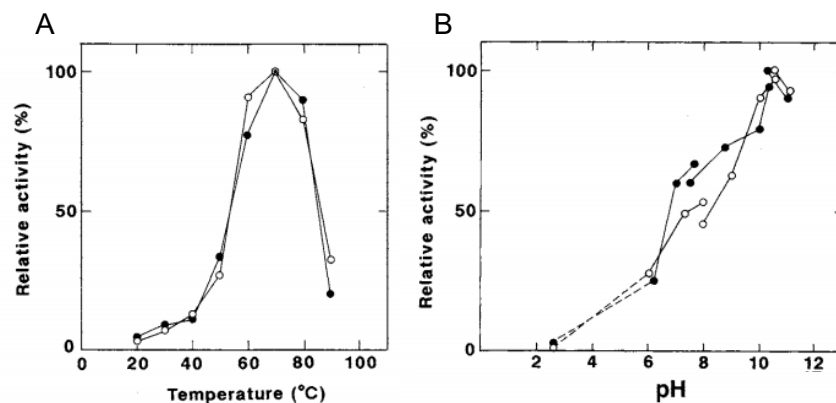


図 1-2 ククミシンの至適温度および至適 pH

67 kDa (○), 54 kDa (●) のククミシン活性は最大活性を 100%としたときの相対活性で示した。

A : 各温度におけるククミシンのカゼイン分解活性

B : 各 pH の緩衝液におけるククミシンのカゼイン分解活性

pH 2.6 ~ 8.0 : クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液

pH 7.7 ~ 10.5 : ホウ酸-リン酸ナトリウム緩衝液

pH 10.2 ~ 11.2 : 水酸化ナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液

Yamagata, H. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* (1989) 53 (4): 1009-1017

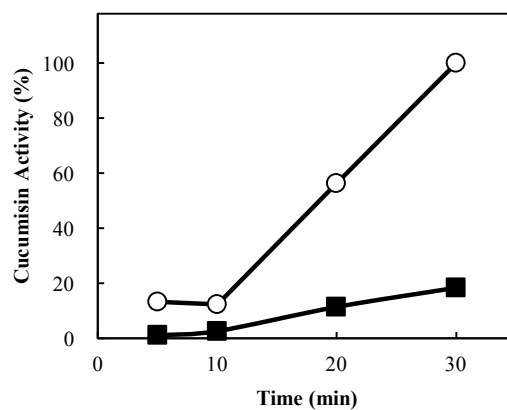


図 1-3 成熟および未成熟メロン果汁のカゼイン分解活性測定

成熟メロン (○) および未成熟メロン (■) の果汁の酵素活性は Kunitz 法 (10) で測定した。基質の 1%カゼインと各果汁を等量混合し、5-30 分 37°C でインキュベートした。5% TCA で反応停止後、反応液を濾過して、濾液の 280 nm の吸光度を測定した。酵素活性は 30 分インキュベートの活性を 100%とした相対活性で示した (データ未発表)。

### 1-2-2 ククミシンの精製

ククミシンは内木場と金田らの方法を用いて精製した (5,11)。メロンの果肉を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中でホモジネートし、3,000×g で 15 分遠心分離した上清を同じ緩衝液で平衡化した陰イオン交換 DEAE-cellulose カラムに通し、樹脂に結合しなかった素通り画分を回収し、ククミシンが存在している素通り画分を 60%飽和硫酸アンモニウムで沈殿にした。遠心分離後のペレットを同緩衝液で透析し、10,000×g で 10 分遠心分離後、上清を陽イオン交換 CM-Sepharose カラムに添加した。同緩衝液で洗浄し、0-0.3M NaCl のリニアグラジェントで溶出することで、高純度かつ高効率でククミシンを得ることができた (図 1-4, 表 1-1)。

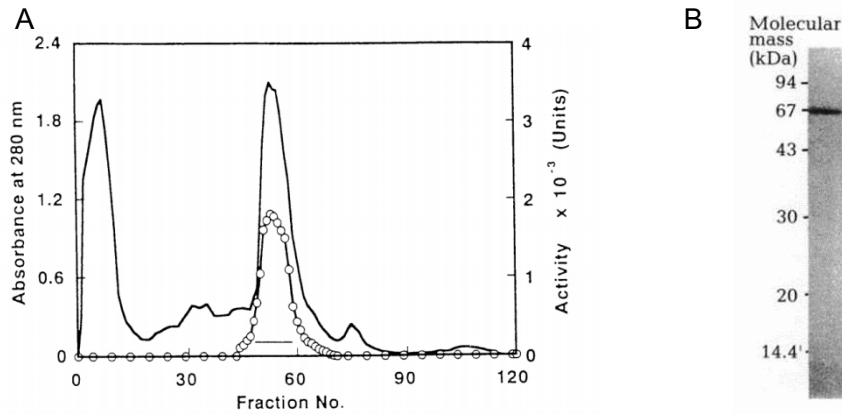


図 1-4 ククミシンの精製チャートおよび SDS-PAGE

A は CM-Sepharose クロマトグラフィーにおけるタンパク質の 280 nm の吸光度 (直線) とカゼイン分解活性 (○) を溶出画分ごとに示した。

Uchikoba, T., et al. *J. Biochem.* (1995) 117: 1126-1130

B は精製画分の 15%アクリルアミド電気泳動の結果 (CBB 染色)

Kaneda, M., et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (1995) 22: 215-222

表 1-1 ククミシンの精製

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)
Juice	6040	231000	38	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	119	119000	1000	52
CM-Sepharose	61	93600	1530	41

<sup>a</sup> The supernatant of the dialysis residue after the (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation.

Kaneda, M. et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (1995) 22: 215-222

### 1-2-3 ククミシンの安定性

ククミシンの至適温度は高く、至適 pH はアルカリ性側にある。ククミシンは熱や pH に対して安定で、10 分の加熱 (pH 5.0) で 70°C まで安定、また 80°C においても活性が残存していた (図 1-5) (2,4)。セリンプロテアーゼのアルカリ条件下における熱安定性を比較すると、動物由来のキモトリプシンは 47°C、20 分インキュベートすることで失活したが、ククミシンは 100% の活性を維持していた。また、グラム陽性菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のサブチリシン BPN' は 60°C で失活したが、ククミシンは 80% の活性を維持していた (図 1-6) (11)。

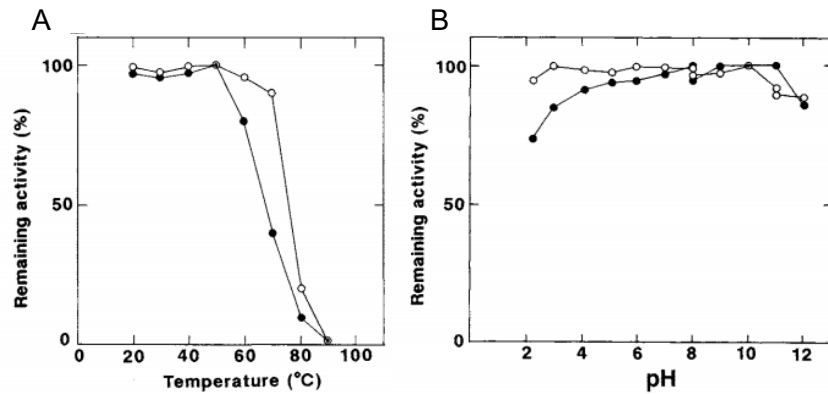


図 1-5 ククミシンの熱および pH 安定性

67 kDa (○), 54 kDa (●) のククミシンの最大活性を 100% としたときの相対活性で示した。

A : 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) で 10 分加熱後の残存活性

B : 各 pH の緩衝液中 20°C で 24 時間インキュベート後の残存活性

pH 2.6 ~ 8.0 : クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液

pH 7.7 ~ 10.5 : ホウ酸-リン酸ナトリウム緩衝液

pH 10.2 ~ 11.2 : 水酸化ナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液

Yamagata, H. et al., *Agric. Biol. Chem.* (1989) 53 (4): 1009-1017

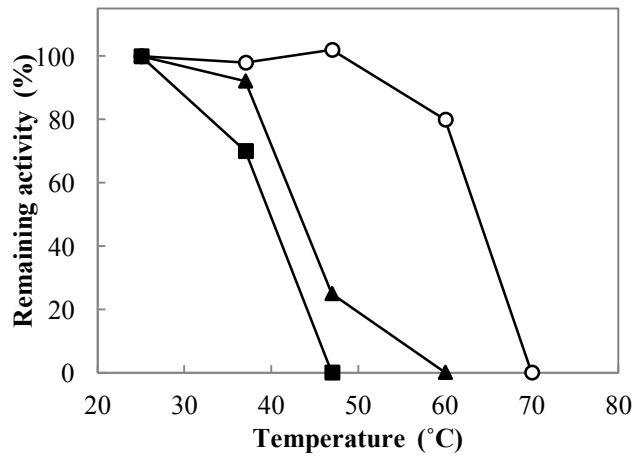


図 1-6 アルカリ条件下における熱安定性

pH 11.1 で 20 分インキュベート後の酵素の残存活性を示した。  
 クミシン (○), サブチリシン BPN' (▲), キモトリプシン (■)

Kaneda, M. *et al. Biotechnol. Appl. Biochem.* (1995) 22: 215-222

#### 1-2-4 ククミシンの基質特異性

プロテアーゼによって切断されるペプチド基質はカルボキシ側のアミノ酸を P1, その C 末端側を P2, P3, 切断されるアミノ基側のアミノ酸を P1', その N 末端側を P2' と定義されている。プロテアーゼの基質特異性の多くは P1 位のアミノ酸に対して示される。例えば, トリプシンは基質結合ポケットの底に負電荷をもつ Asp が存在しているため, P1 位に正電荷をもつ Lys と Arg を認識して切断する。

ククミシンの基質特異性の研究は, さまざまな天然ペプチドや合成ペプチドを用いて行われてきた。これまで調べられている基質において, ククミシンの最適な基質は合成基質の Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*NA ( $k_{\text{cat}}/K_m$  4,680 /M·s) と Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA ( $k_{\text{cat}}/K_m$  4,170 /M·s) であり, Suc-Ala-Ala-Ala-*p*NA より P2 位が Pro の Suc-Ala-Pro-Ala-*p*NA の方が  $k_{\text{cat}}/K_m$  が 30 倍高かった (表 1-2) (5)。ククミシンの基質特異性は P1 位以外を固定した合成ペプチド Leu-Leu-Pro-X↓Ala-Leu を用いて調べた結果, ククミシンは特に Met, Leu, Glu, Asn, Thr を好み, Gly, Ile, Pro は切断せず, Asp, Glu, Arg, Lys などの有電荷のアミノ酸は好まない傾向があった (表 1-3) (12)。ククミシンは P1' に側鎖の小さなアミノ酸である Ala や Ser を好み (13), 複数の長さのペプチドを基質に用いた時の切断率より, サブサイトは S5-S3' であることが分かった (12)。このように, ククミシンの P1 位の基質特異性は広く明瞭ではないが, P2 位は非極性のアミノ酸やプロリンが適していた (図 1-7) (14)。

表 1-2 ククミシンによる *p*Na 基質分解速度

Substrate	$K_m$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Glt-Ala-Ala-Pro-Leu- <i>p</i> Na	1.25	5.9	4,680
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> Na	1.00	4.17	4,170
Suc-Ala-Pro-Ala- <i>p</i> Na	1.96	0.31	158
Suc-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> Na	2.72	0.013	5
Suc-Ala-Ala- <i>p</i> Na	2.91	0.007	2
Suc-Ala- <i>p</i> Na	3.57	0.002	0.56

Uchikoba, T. *et al. J. Biochem.* (1995) 117: 1126-1130

表 1-3 ククミシンの加水分解による合成基質の P1 位の影響

P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	Hydrolysis rate
Leu	Leu	Pro	X	Ala	Leu	(%)
Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	0
Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Leu	0
Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	0
Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	1
Leu	Leu	Pro	Tyr	Ala	Leu	2
Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	4
Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	8
Leu	Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	9
Leu	Leu	Pro	Trp	Ala	Leu	10
Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	15
Leu	Leu	Pro	Ser	Ala	Leu	27
Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	33
Leu	Leu	Pro	Phe	Ala	Leu	34
Leu	Leu	Pro	His	Ala	Leu	78
Leu	Leu	Pro	Asn	Ala	Leu	88
Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	89
Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	92
Leu	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	94
Leu	Leu	Pro	Met	Ala	Leu	>95

Enzyme concentration, 91 nM; incubation time, 30 min at 37°C.

Yonezawa, H. *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2000) 64: 2104-2108

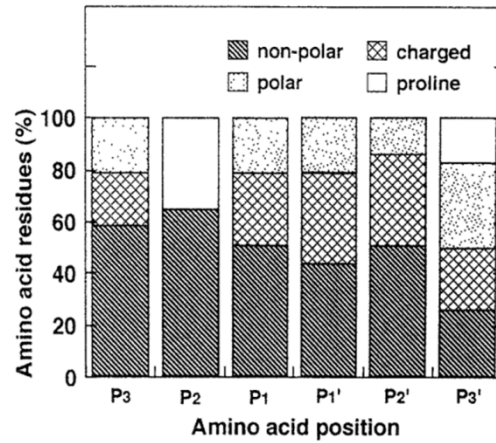


図 1-7 ククミシンによる切断サイトのアミノ酸の分布

ウシヘモグロビン、 $\beta$ -カゼイン、ニワトリリゾチームのアミノ酸配列をもとに合成した複数のペプチドを基質として、ククミシンが加水分解したアミノ酸の分布を百分率で示した。

non-polar (非極性) : Val, Leu, Met, Phe, Trp, and Ala

polar (極性) : Tyr, Gly, Ser, Thr, Asn, and Gln

charged (電荷) : Lys, His, Arg, Glu, and Asp

Yonezawa, H. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1997) 61: 1277-1280

### 1-2-5 ククミシンのプロペプチド

プロテアーゼの多くは不活性な前駆体タンパク質として合成される。プロペプチドのプロセシングは、多くの場合で自己分解的であると報告されている (15-17)。プロペプチドはプロテアーゼ自体の阻害剤であるだけでなく、 $\alpha$ -溶菌プロテアーゼ (18,19)、アクアライシン I (20)、カテプシン L (21)、サーモライシン (22)、サブチリシン (23,24) のようなさまざまなプロテアーゼのシャペロンである。細菌サブチリシン BPN' のプロペプチドはプロ BPN' の自己分解で産生され、活性化成熟型 BPN' の構造を形成する分子内シャペロンとして機能すると考えられている (24)。トマト SBT3 のプロペプチドは自己分解で放出され、SBT3 の細胞外アポプラストへの分泌に関与していることが知られている。また、SBT3 の C 末端 Fn-III ドメインは SBT3 の分泌経路に必要であると報告されている (25)。

ククミシンのプロペプチドについては、ククミシンを濃度依存的に阻害することが報告されている (26)。ククミシンのプロペプチドの配列を数種の植物サブチラーゼと枯草菌由来のサブチリシン E のプロペプチドと比較すると、相同性は低いものの、いくつかのアミノ酸が保存されていた。中川らはそれらの疎水性アミノ酸がプロペプチドの機能に重要であると考え、N 末端と C 末端の疎水性領域を欠損したプロペプチドを作成し、阻害に重要な 2 つの疎水性領域 Asn32-Met38 と Gly97-Leu103 を報告した (26)。さらに、部位特異的変異を入れたプロペプチドにより Asn32-Met38 を含む疎水性クラスターの Val36 を中心としたトリペプチド Ile35-Val36-Tyr37 が、ククミシン阻害に不可欠である二次構造の形成に関与していると報告した (図 1-8)。

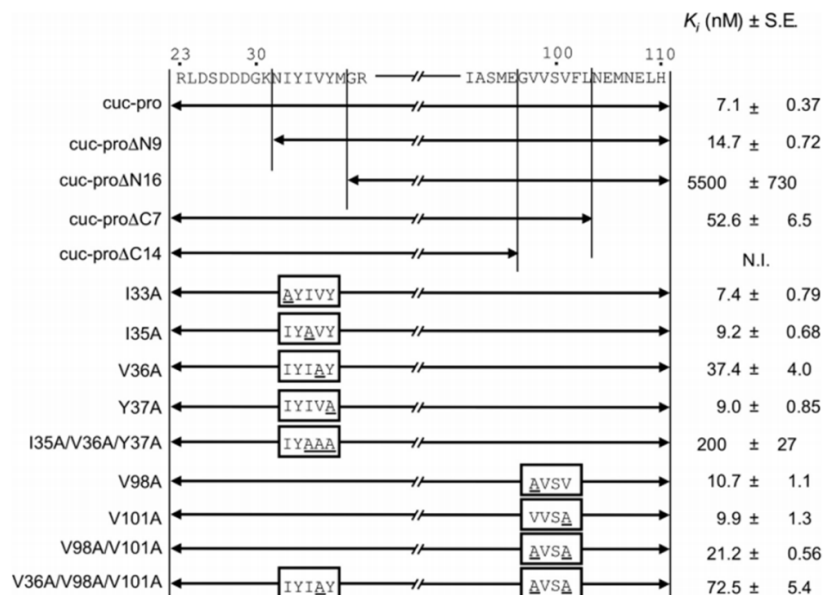


図 1-8 プロペプチド変異体の  $K_i$  値

プロペプチドの長さを矢印で示した。Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA を基質に用い、阻害活性を測定した。阻害定数  $K_i$  を示した。

Nakagawa, M. et al. *J. Biol. Chem.* (2010) 285: 29797-29807



## 第2章 ククミシンの結晶構造

## 2-1 小序論

ククミシンは高い熱安定性と広い基質特異性を有しているプロテアーゼである。本報では、ククミシンタンパク質を結晶化して X 線結晶構造解析を行い、ククミシンの酵素的特性を生じさせる構造的要因を解明することを目的とした。

## 2-2 方法

### 2-2-1 ククミシンの結晶化

プリンスメロン果実から精製したククミシン (30% ショ糖含有) 凍結乾燥粉末を 0.05 M NaCl, 1 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 10 倍モルの DFP を含んだ 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、陽イオン交換 HiTrap SP カラム (GE Healthcare) に添加し、0.05-0.4 M NaCl のリニアグラジェントで溶出した。タンパク質が含有している画分をゲル濾過 Superdex 200 HR カラム (GE Healthcare) で分画し、自己分解を防ぐための DFP を活性セリンに結合させたククミシンを得た。精製したククミシンを還元条件下 SDS-PAGE で分析したところ、DFP で自己分解を防いだのにもかかわらず、全長の 67 kDa と分解産物と思われる 53 kDa および 14 kDa の 3 つのタンパク質のバンドが確認された。非還元条件では、全長の 67 kDa のバンドが増加したため、ククミシンはジスルフィド結合を介した 53 kDa と 13 kDa の間で自己分解を起こしていることが示唆された。

ククミシンタンパク質の結晶を得るために、精製ククミシンを限外濾過装置 Centricon filter (Millipore) で 20 mg/mL に濃縮したものを、結晶化用サンプルとし、シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化した。結晶化には 1  $\mu$ L のタンパク質溶液と 1  $\mu$ L のリザーバー溶液 [0.8 M 酢酸ナトリウムを含んだ 0.1 M イミダゾール緩衝液 (pH 6.5)] の液滴で 6 週間を要した (0.2 mm $\times$ 0.05 mm $\times$ 0.05 mm) (図 2-1)。

得られた結晶を 1 mM  $K_2PtCl_6$  溶液に 1 日浸漬し、重原子誘導体を作成した。



図 2-1 ククミシンの結晶

### 2-2-2 ククミシンの X 線結晶構造解析

結晶を抗凍結剤である Paraton-N に 1 分間浸漬した後, 110 K の窒素ストリームで瞬間凍結した。重原子誘導体の回折データは放射光科学研究施設 Photon Factory のビームライン NW12 で波長 1.06978 Å (peak), 1.07195 Å (edge), 1.05375 Å (high remote) の 3 波長の X 線に対して収集した。ネイティブ結晶の回折データは放射光科学研究施設 Photon Factory のビームライン NW12 および大型放射光施設 Spring-8 の BL32XU で収集した。最終的な回折データは分解能 2.75 Å までのデータを使用し, HKL2000 program suite (27)で積分とスケールングを行った。

### 2-2-3 ククミシンの X 線結晶構造の位相決定と原子モデルの精密化

ククミシンの結晶構造は多波長異常分散法 (MAD 法: multi-wavelength anomalous dispersion method)で決定した。重原子座標 (白金) の決定と MAD 位相の計算を SOLVE プログラム (28) で 3.5 Å 分解能までで行い, 4 つの白金の座標を特定した。RESOLVE プログラム (28) を用いて 3.1 Å 分解能まで位相改良を行い, 電子密度図 (性能指数: 0.42) を得た。非対称単位のふたつの分子 (分子 A および B) を program O (29) を用いて電子密度図にし, 分解能 2.75 Å のネイティブ結晶データを用いて CNS プログラム (30) で精密化した。Coot (31) を用いて最終的なモデルをラマチャンドラン・プロットで評価した。決定したククミシンの座標は 2012 年 5 月 23 日に Protein Data Bank に登録した (PDB ID: 3VTA)。結晶化および X 線結晶構造解析は理化学研究所で行った。

### 2-2-4 結晶構造の解析

結晶構造のレンダリングや計算は, 菱化システム株式会社の統合計算化学システム MOE 2014.09 (Molecular Operating Environment) を使用して行った。相同タンパク質の検索には Dali server (32) を用いた。タンパク質の一次構造と二次構造の比較には, MOE に搭載されている Clustal X を使用した。

#### 2-2-5 示差走査蛍光定量法

ククミシンの熱安定性を評価するために、示差走査蛍光定量法 (DSF: Differential Scanning Fluorimetry) を用いて変性中点温度  $T_m$  値を測定した。原理はタンパク質内部の疎水性部位に結合して隠れていた SYPRO orange が、タンパク質の熱変性で溶媒に露出してくる性質を利用している。2  $\mu\text{M}$  のククミシン, 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, SYPRO orange (Invitrogen) を混合し, 全量 50  $\mu\text{L}$  にした。混合液を 7300 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) で 20°C から 99°C まで 1°C ずつ加熱した。加熱に伴い 488 nm の励起波長を当て, ROX (Rhodamine Red X) フィルターで蛍光を検出した。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 ククミシンの原子モデルの構築と精密化

ククミシンの結晶構造は2分子の非対称単位で構成されており、分子AはLys599-Gly627およびC末端Val731、分子BはCys602-Gly627およびC末端Val731の残基以外はモデルを置くことができ、分解能2.75 Åのネイティブ結晶データを用いて精密化した。その結果、 $R_{\text{work}}=0.214\%$ 、 $R_{\text{free}}=0.262\%$ までモデルを精密化できた。回折像統計値と精密化統計値は表2-1に示した。

最終的に得られた構造は、Asn466とAsn652に糖鎖(N-アセチルグルコサミン)を含む構造であった(分子AではAsn466のみ)。最終的なモデルのラマチャンドラン・プロットの結果、分子Aにおいて91.48%の残基が好ましい領域(preferred regions)にあり、7.16%が許容される領域(allowed regions)、1.36%が許容範囲から外れている残基(outliers)であった(図2-2)。分子Bにおいては86.44%の残基がpreferred regions、10.34%がallowed regions、3.22%がoutliersであった。ククミシン構造のゆらぎの大きさを示す温度因子の分布を図2-3に示した。

以降の構造解析は主にククミシン分子Aの結晶構造を使用した。

表 2-1 ククミン結晶の回折像統計値および構造精密化統計値

Crystal characteristics				
Space group	R3			
Unit cell parameters (Å)	$a=149.483, b=149.483, c=218.035$			
Molecules per asymmetric unit	2			
	Pt MAD data			
	Peak	Edge	Remote (high)	Native
Wavelength (Å)	1.06978	1.07195	1.0375	0.9000
Resolution range (Å)	50.00-3.00	50.00-3.00	50.00-3.00	50.00-2.75
Redundancy	4.5	4.5	4.5	4.6
Unique reflections	36,597	36,597	36,370	46,877
Completeness (%)	100.0 (100.0) <sup>a</sup>	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
$I/s(I)$	14.0 (3.2)	13.9 (2.5)	13.0 (2.2)	12.1 (2.9)
$R_{\text{sym}}^b$	0.106 (0.496)	0.111 (0.605)	0.116 (0.736)	0.158 (0.591)
Figure of merit	0.42 (after solvent modification)			
Refinement statistics				
Resolution range (Å)	44.64-2.75			
Unique reflections	46,860			
$R$ -factor/ $R_{\text{free}}^c$	0.214/0.262			
No. of protein atoms	8,960			
No. of water molecules	206			
RMSD from ideal geometry				
Bond lengths (Å)	0.007			
Bond angles (°)	1.40			
Average isotropic $B$ -value (Å <sup>2</sup> )	49.3			

<sup>a</sup> Numbers in parentheses refer to the highest-resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ .

<sup>c</sup>  $R$ -factor =  $\sum_h ||F_o| - |F_c|| / \sum_h |F_o|$ . Free  $R$ -factor was calculated using 5% of reflections omitted from refinement.

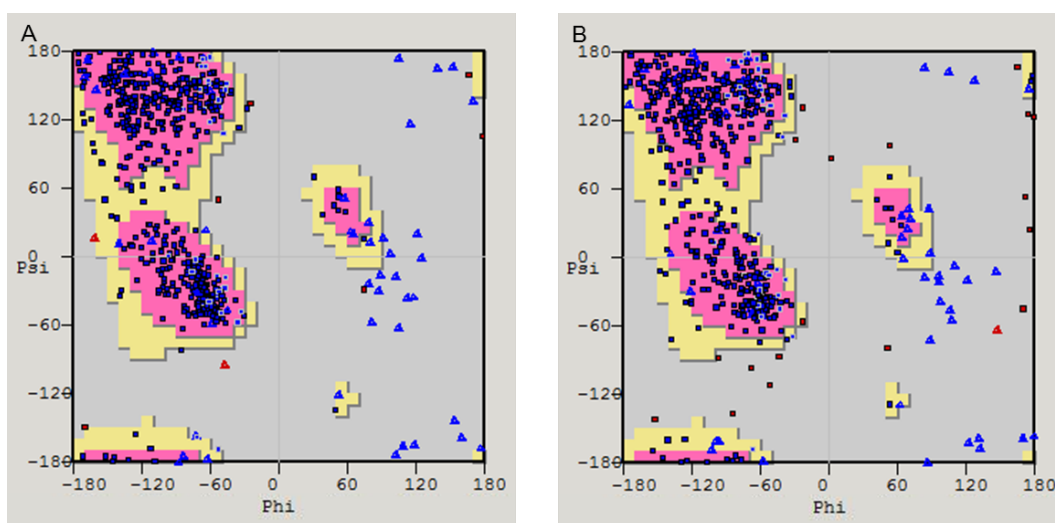


図 2-2 ククミシン分子のラマチャンドラン・プロット

パネル A は分子 A, パネル B は分子 B のプロットを示した。

ピンク : 好ましい領域

黄 : 許容される領域

赤▲ : 許容な範囲から外れた残基

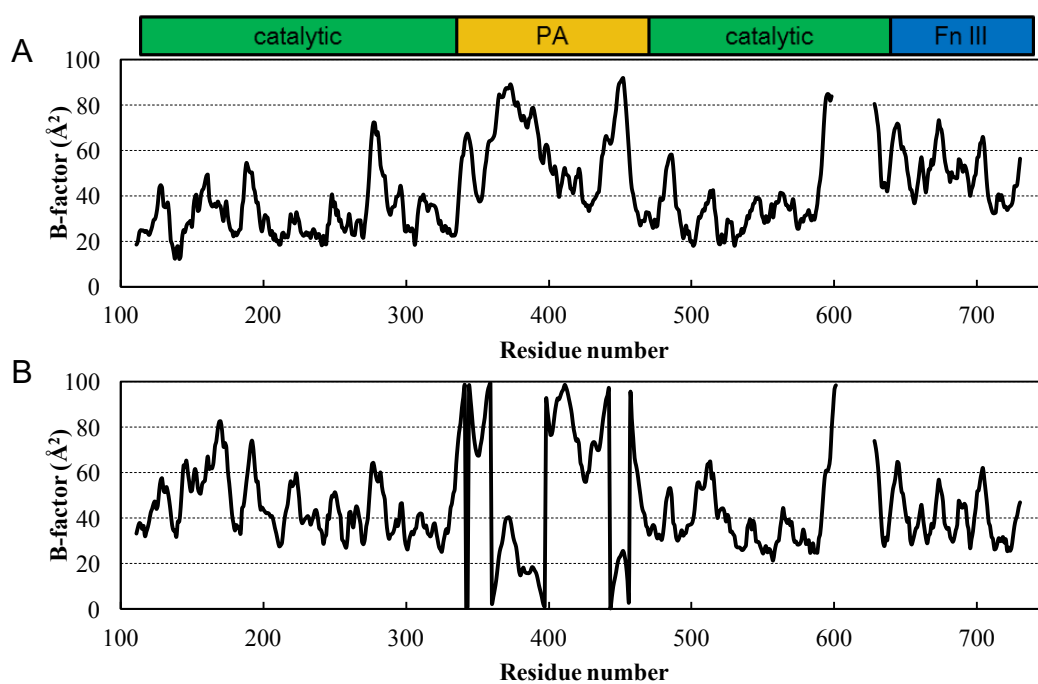


図 2-3 ククミシンの主鎖の温度因子分布

パネル A は分子 A, パネル B は分子 B の温度因子を示した。

図上部に各ドメインを示した。

## 2-3-2 ククミシンの結晶構造

### 2-3-2-1 全体構造

ククミシン分子の全体構造を図 2-4 に示した。ククミシンの結晶構造は 2 分子の非対称単位で成っており、95%以上の構造が同定された。C<sup>α</sup>原子で重ねあわせた分子 A と B の構造のずれを示す指標である平均二乗偏差 (RMSD: root mean square deviation) は 0.671 Å であった。ククミシンの N 末端は Thr111 であることから、本構造は Thr111 から Leu730 までの電子密度図で示した。C 末端の Val731 および一部のループ領域 (分子 A: 599-627, 分子 B: 602-627) については電子のゆらぎや自己分解により同定できなかった。このループ領域は、ククミシンの自己分解によって切断される C 末端部位と一致していた (4)。ククミシンは触媒ドメイン、Protease-associated (PA) ドメイン、fibronectin (Fn)-III 様ドメインの 3 つで構成されており、PA ドメインは触媒ドメインの途中に挿入されていた (図 2-5)。触媒ドメインは 7 本のβストランド (β1, 2, 5, 8, 9, 10, 20) からなる高度にねじれた平行なβシートとそれを上下から挟んだ 4 本のαヘリックス (α3, 4, 5, 9) でサブチリシンファミリーの典型的なα/β構造をとっていた。触媒ドメインの間に挿入されている PA ドメインは Arg332 から Leu465 で、4 本のストランドからなる逆平行βシートと 3 本のストランドからなる並行βシートと 3 本のαヘリックスで構成されていた。Fn-III ドメインは触媒ドメインのα10 と可視化できなかったフレキシブルなリンカーに隣接していた。また、Fn-III ドメインは 8 本のストランドでβサンドイッチ構造を形成していた。



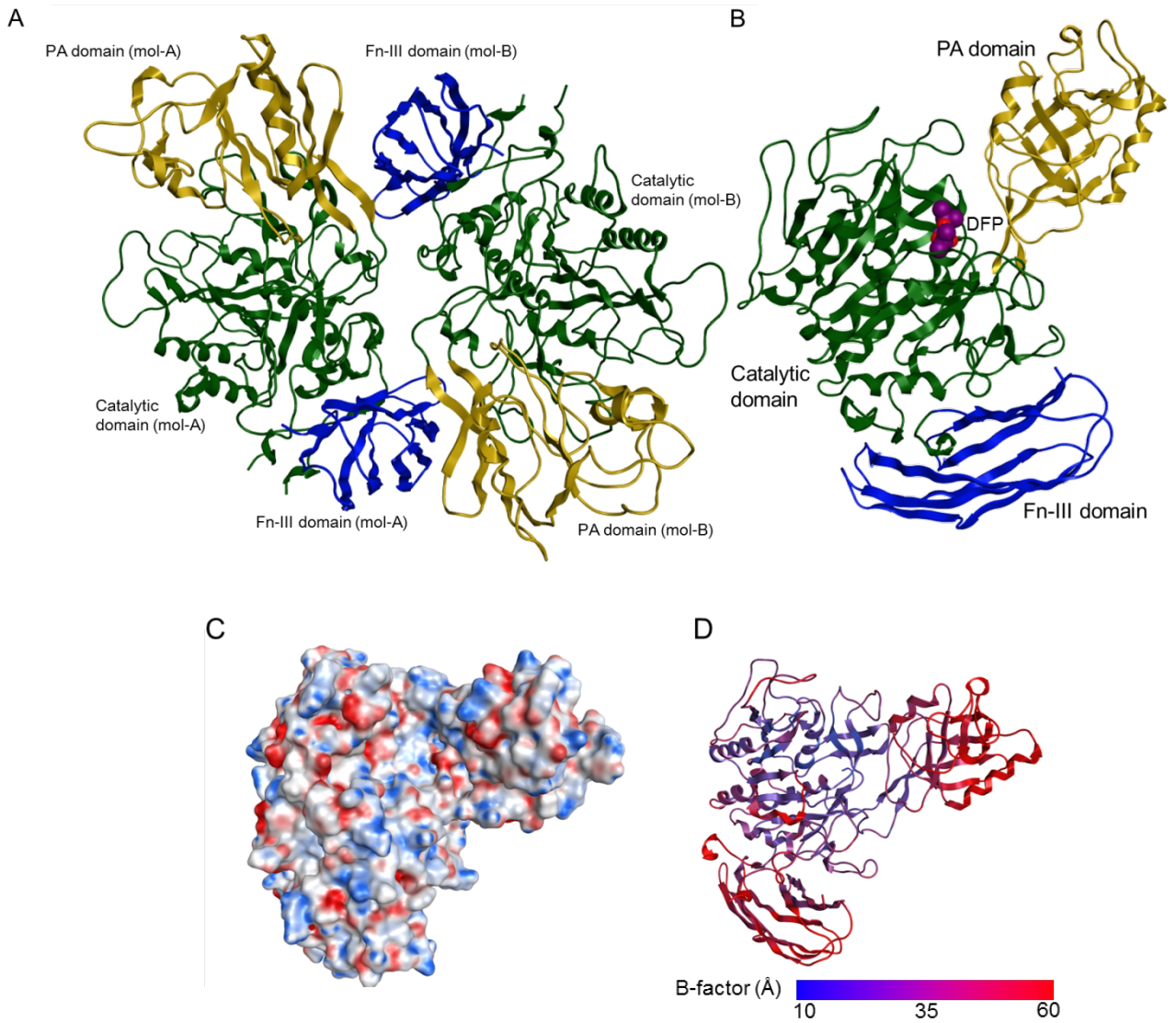


図 2-4 ククミシンの結晶構造

触媒ドメイン, PA ドメイン, Fn-III ドメインをそれぞれ緑, 黄, 青のリボン構造で示した。

A: 結晶学的な非対称単位

B: ボールモデルの DFP が結合したククミシンの分子 A

C: 分子表面モデル (分子 A), 正電荷: 青, 負電荷: 赤

D: ククミシン (分子 A) の温度因子

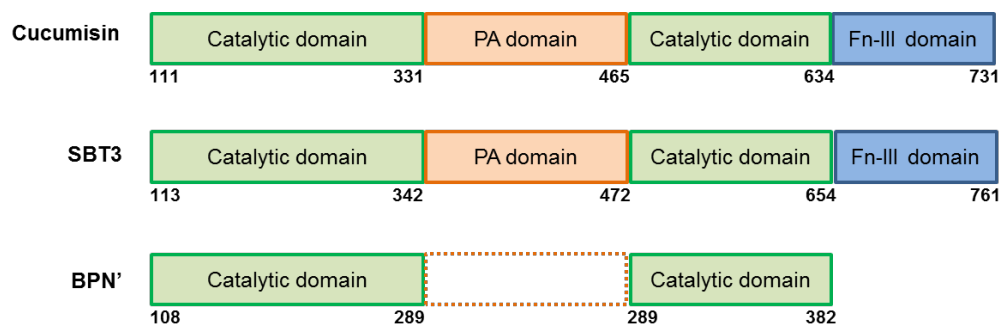


図 2-5 ククミシン, SBT3 (トマトサブチラーゼ), BPN' (サブチリシン BPN') のドメイン構成の比較

### 2-3-2-2 N末端の構造

ククミシン遺伝子の解析により、ククミシンは不活性の前駆体として合成され、プロ配列のプロセッシングで成熟型ククミシンとなることが分かった (6)。プロ配列の切断によりできた成熟型ククミシンのN末端 Thr111は触媒ドメインの隙間に埋まっていた。さらに、Thr111 (O<sup>γ</sup>)はArg231 (O)と、Thr112 (O<sup>γ</sup>)はGly226 (O)とArg332 (N<sup>η1</sup>)水素結合を形成し、Arg113はAsp331と塩橋を形成して安定化していた (図 2-6)。Ser114-Phe117でひと巻のαヘリックスを形成しており、Ser114 (O<sup>γ</sup>)はHis530 (N<sup>ε2</sup>)と、Trp115 (N<sup>ε1</sup>)はArg231 (O)と水素結合を、Asp116はArg231と塩橋を形成し、Trp115はHis530 (C<sup>δ2</sup>)とTスタッキング相互作用を形成することで構造の安定化に寄与していた。

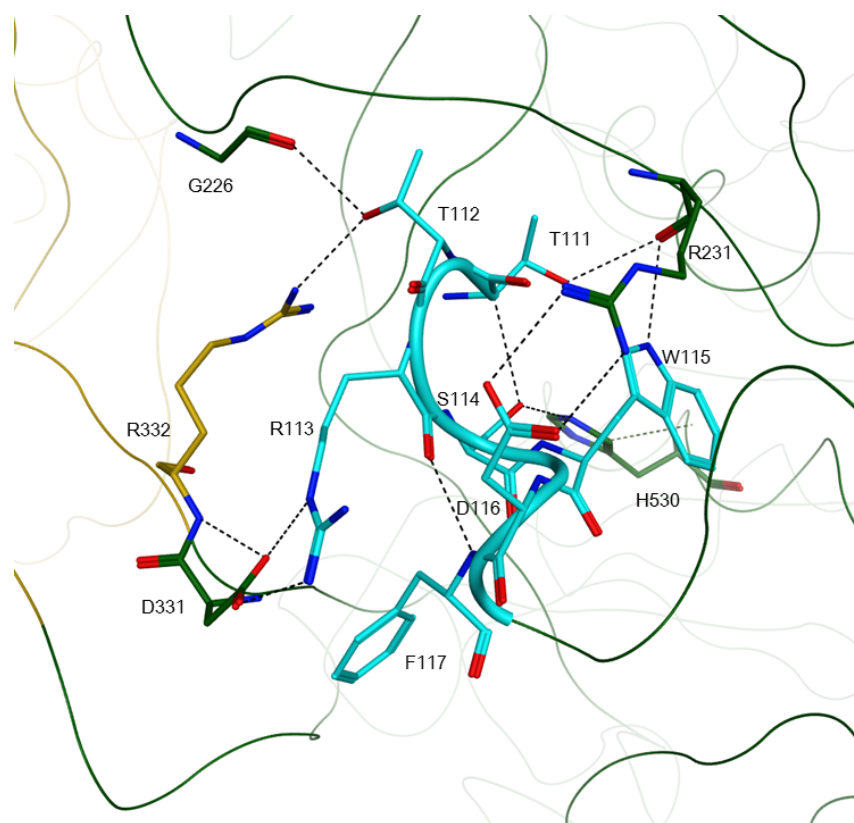


図 2-6 ククミシンの N 末端の構造

シアン：ククミシンの N 末端 7 残基 (Thr111-Phe117)

緑：相互作用している触媒ドメインの残基

黄：PA ドメインの残基

黒の点線：水素結合 緑の点線：CH/π相互作用

### 2-3-2-3 活性中心周辺の構造

ククミシンの触媒残基は Asp140, His204, Ser525 である (図 2-7)。自己分解を防ぐための DFP は、活性 Ser に結合していた。

ククミシンは一次構造からオキシアニオンホールパートナーは Asn307 であることが推測されたが (6), 今回得られた構造を確認すると, Asn307 が Ser の近傍に触媒部位側を向いて存在しており, DFP が存在している周辺が基質結合ポケットであると考えられた。また, この周辺は Gly などの側鎖の小さなアミノ酸が分布しており, ククミシンの基質特異性の広さに起因していると考えられた。さらに, 活性サイト近傍には Cys245 と Cys250 でできたジスルフィド結合が存在していた。これは基質の P2 位に影響を与えると考えられた。

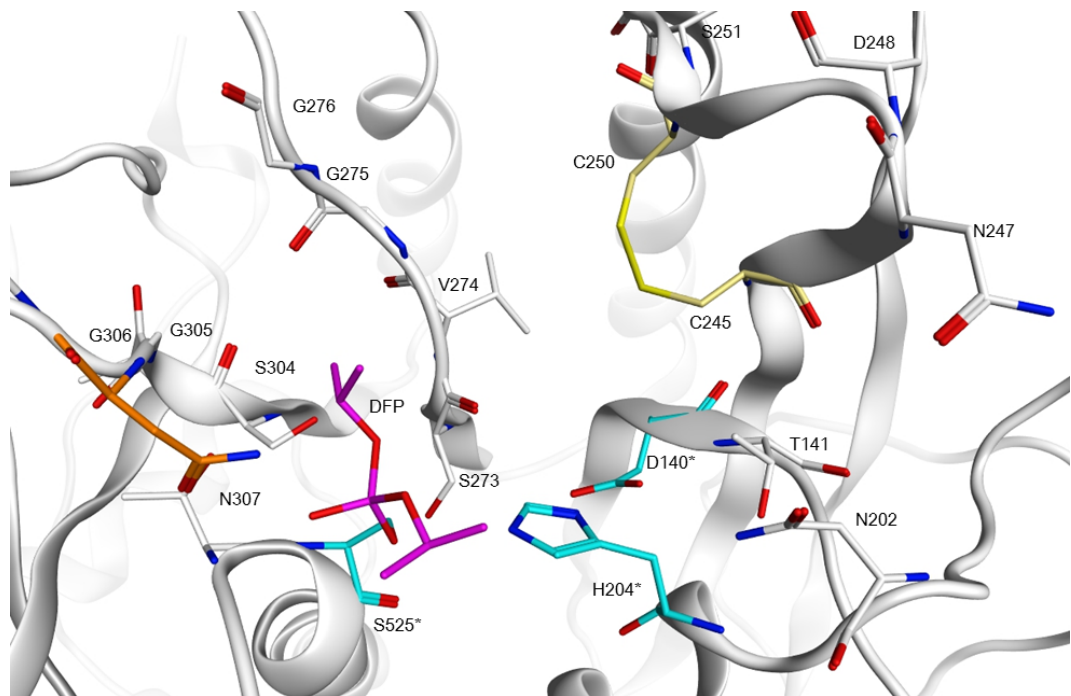


図 2-7 ククミシンの活性部位周辺の構造

触媒残基 (Asp140, His204, Ser525) : シアンおよびアスタリスク

オレンジ : オキシアニオンホールパートナーの Asn307

黄色 : ジスルフィド結合を形成する Cys250 および Cys245

マゼンタ : Ser525 に共有結合している DFP

#### 2-3-2-4 ククミシンの立体構造の相同性検索

ククミシンの立体構造は、サブチリシン様の酵素やサブチリシンと相同性が高いことが確認された。最も相同性が高かった構造はトマト由来のサブチラーゼ 3 (SBT3) (PDB ID: 3I74) で、Z-score が 50.9, RMSD は 3.5 Å であった。SBT3 はククミシンと同じく 3 つのドメインで構成されており、二次構造も類似していた。触媒ドメインだけで比較すると、サブチリシン BPN' (PDB ID: 1LW6) も相同性が高いことが分かった (Z-score=36.3, RMSD=1.9 Å) (図 2-8)。

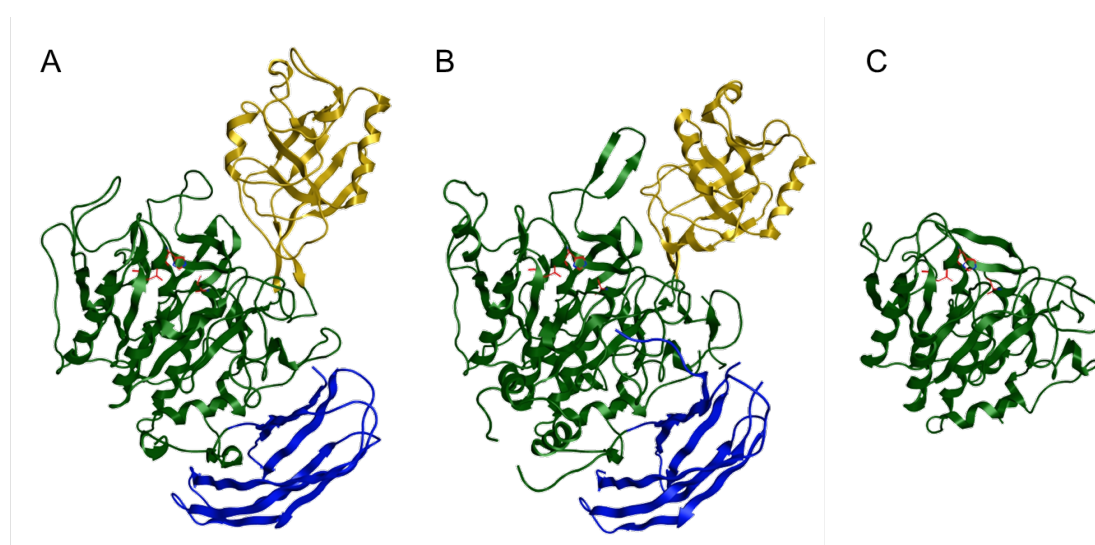


図 2-8 ククミシン, SBT3 および BPN' の立体構造

A : ククミシンの構造 (PDB ID: 3VTA)

B : SBT3 の構造 (PDB ID: 3I74)

C : BPN' の構造 (PDB ID: 1LW6)

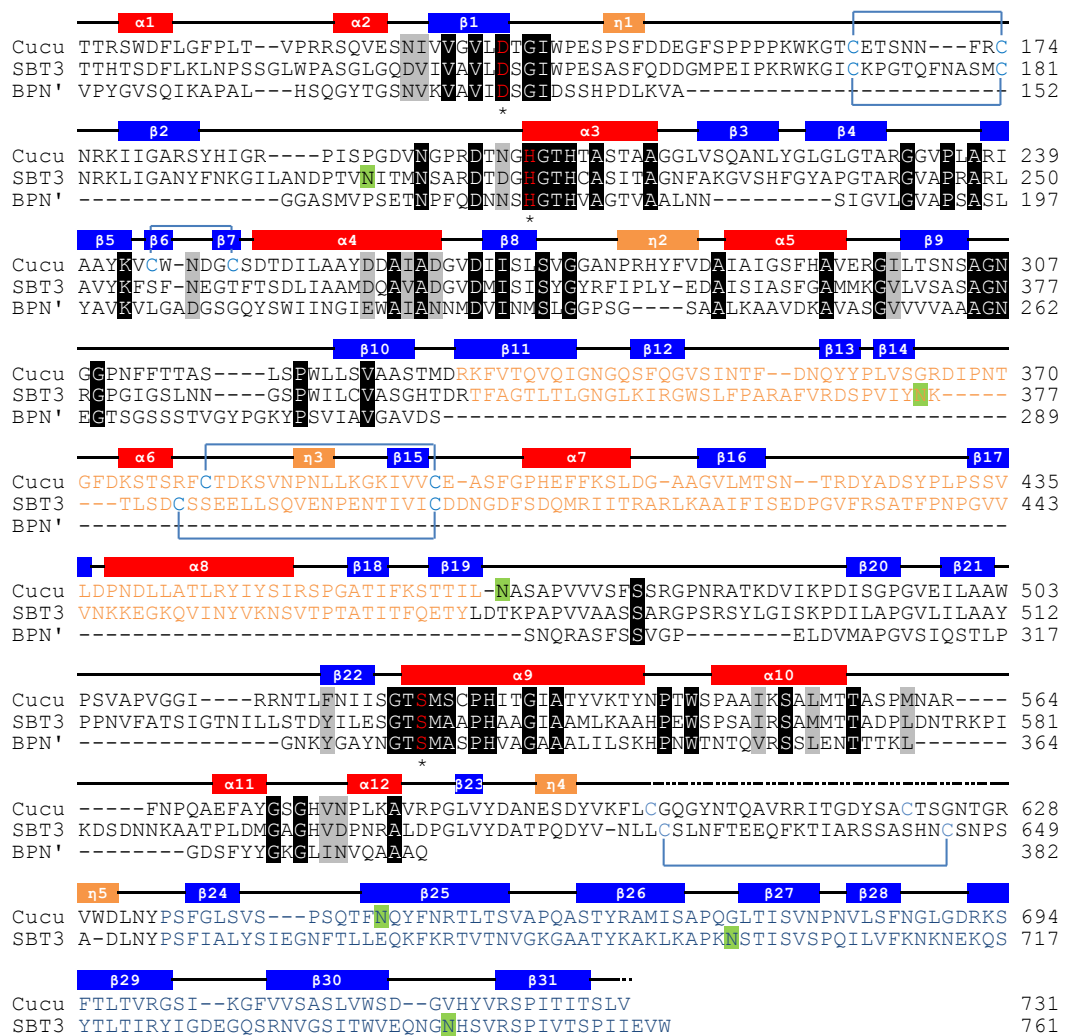


図 2-9 ククミシン, SBT3 および BPN'の一次構造と二次構造の比較

SBT3 は PDB ID: 3I74, BPN'は PDB ID: 1LW6 を使用した。

赤 :  $\alpha$ ヘリックス

青 :  $\beta$ ストランド

オレンジ :  $3_{10}(\eta)$  ヘリックス

オレンジの文字 : PA ドメイン

青の文字 : Fn-III ドメイン

青のライン : ジスルフィド結合

赤の文字およびアスタリスク : 触媒残基

緑のハイライト : 糖鎖修飾されるアミノ酸

黒と灰色のハイライト : 触媒ドメインにおける相同なアミノ酸

ククミシンと SBT3 の一次構造と二次構造を比較すると、触媒ドメインの相同性は SBT3 で 40%, BPN' で 30%であった (図 2-9)。SBT3 のドメイン構成はククミシンと同じで、ドメインごとに構造を重ね合わせると RMSD が触媒ドメインで 1.43 Å, PA ドメインで 2.08 Å, Fn-III ドメインで 1.14 Å であり、構造的に類似していた。触媒残基で重ね合わせると、ククミシンの PA ドメインの方が触媒ドメイン側に傾いており、ククミシンの Ser450 とそれに相当する SBT3 の Asn458 の C<sup>α</sup>の距離を測定すると 14 Å ほど離れていた (図 2-10)。SBT3 のこの PA ドメインが開いている構造と PA ドメインの隣にあるβヘアピン構造はホモダイマー化に重要なはたらきをしていると報告されている (33)。しかし、ククミシンはダイマー化しておらず、ククミシンの PA ドメインは SBT3 とは機能が異なると考えられた。

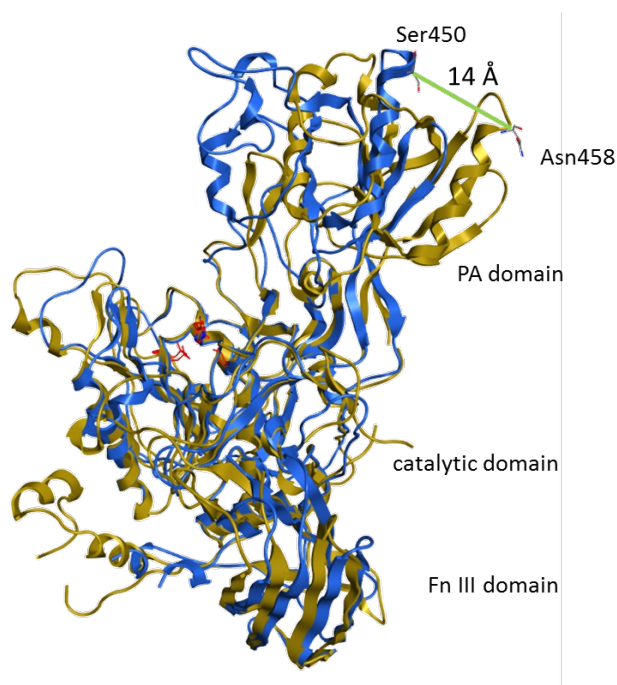


図 2-10 ククミシンと SBT3 の構造の比較

青：ククミシン

黄：SBT3

赤：触媒残基

緑のライン：ククミシンの Ser450 と SBT3 の Asn458 の C<sup>α</sup>間の距離



### 2-3-3 ククミシンの熱安定性の評価

#### 2-3-3-1 ククミシンの融解温度

図 2-11 の示差走査蛍光定量法による融解曲線をもとに求めたククミシンの  $T_m$  値は  $81.0^\circ\text{C}$  であった (計算方法は省略)。この値は十分な温度安定性を示すものであった。また、SBT3 の  $T_m$  値は  $71.5^\circ\text{C}$  (33), カルシウム非存在下の BPN' は  $58.9^\circ\text{C}$ , 存在下は  $78.3^\circ\text{C}$  (34) と報告されており, これらと比較してもククミシンの熱安定性が最も高かった。ククミシンと SBT3 の立体構造は高く保存されていたが,  $T_m$  値で約  $10^\circ\text{C}$  の差が見られた。

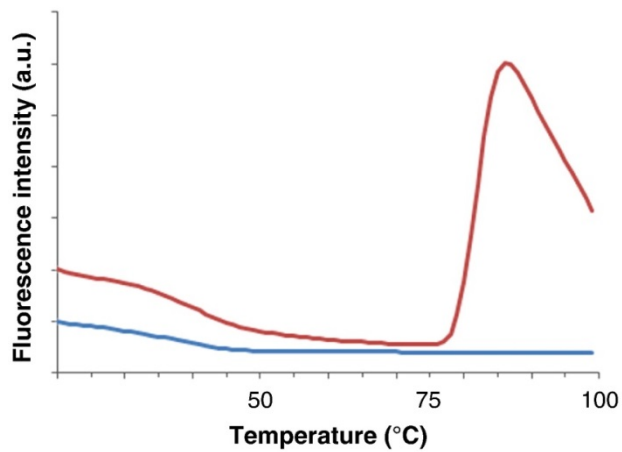


図 2-11 示差走査蛍光定量法の結果

赤：ククミシンの融解曲線

青：タンパク質非存在のベースライン



### 2-3-3-2 カルシウム結合サイト

サブチリシン BPN'を始めとする細菌性のサブチリシンは、複数の  $\text{Ca}^{2+}$  と結合することで高い安定性を示している。 $\text{Ca}^{2+}$  の有無でサブチリシン BPN'の  $T_m$  値は約  $20^\circ\text{C}$  も変化する (34)。サブチリシン様プロテアーゼには、高度に保存されたカルシウム結合部位 1, 2 とわずかに保存されたサイト 3 があり (35)、サブチリシン BPN'のカルシウム結合部位が除去されると熱安定性に著しく影響を与える (36)。ククミンや SBT3 は分子の安定化にカルシウムイオンを始めとする金属イオンを必要としないが、どちらも高い耐熱性を保持している。そこで、カルシウム結合部位 1, 2 をもつサブチリシン BPN'とカルシウム結合サイト 3 をもつ好熱性放線菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*) 由来サブチリシン様プロテアーゼのサーミターゼの構造を用いて、ククミンのカルシウム結合部位に相当する構造を確認した (図 2-12)。

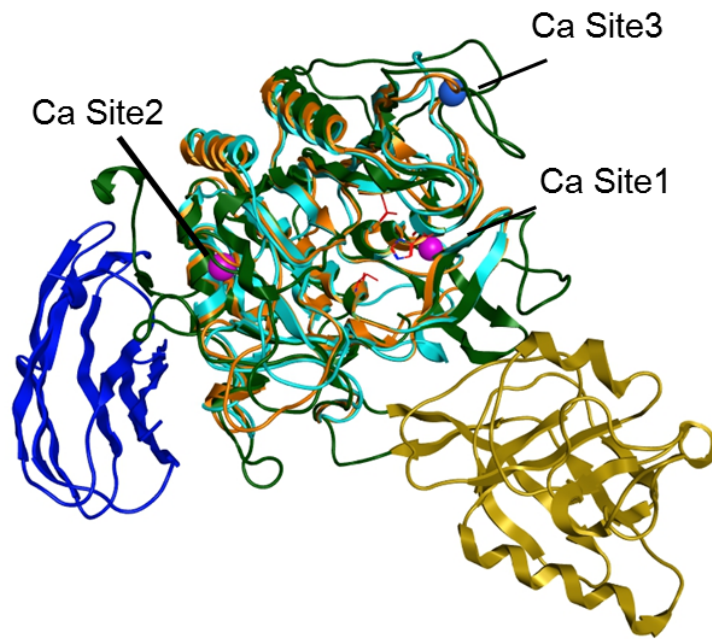


図 2-12 ククミン, サブチリシン BPN'およびサーミターゼの比較  
緑のリボン: ククミンの触媒ドメイン  
黄のリボン: ククミンの PA ドメイン  
青のリボン: ククミンの Fn-III ドメイン  
オレンジのリボン: サブチリシン BPN' (PDB ID: 1A2Q)  
マゼンタのボール: サブチリシン BPN'の  $\text{Ca}^{2+}$   
シアンのリボン: サーミターゼ (PDB ID: 1THM)  
青のボール: サーミターゼの  $\text{Ca}^{2+}$

サブチリシン BPN'のカルシウム結合部位 1 を図 2-13 に示した。BPN'の Ala181-Gly190 の 10 残基でできたループに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合しており，ループと周辺の残基 Gln109, Asp148, Leu182, Asn184, Ile186 と水素結合を形成していた。一方のククミシンでは，BPN'より 9 残基長い Gly214-Arg231 が存在しており， $\beta 3$ ,  $\beta 4$  で $\beta$ -ヘアピン構造を形成していた。このヘアピンのループ先端の Tyr223 が Thr353 と CH/ $\pi$ 相互作用を，Lys460 と水素結合を形成し，ヘアピンの先端を固定していると思われた。さらにその前後の Leu222 と Leu225 が Ile351, Val509, Ile520, Phe334 と疎水性相互作用を形成していることが予想された。このように，ククミシンでは近接している PA ドメインや触媒ドメインと相互作用して， $\text{Ca}^{2+}$  が結合しているのと同じように分子構造の高い安定性を保持していると考えられた。

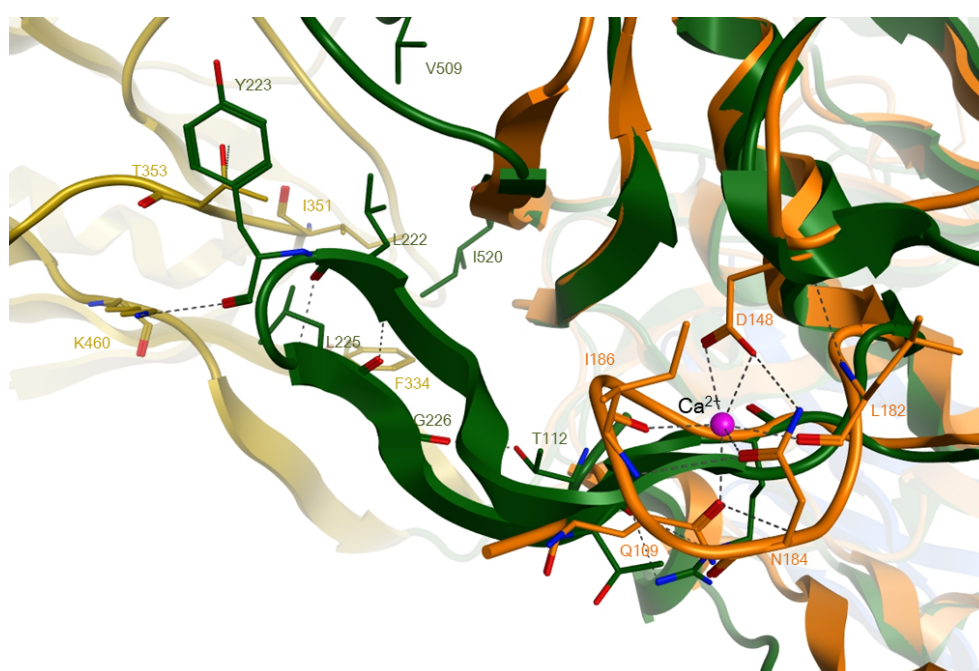


図 2-13 サブチリシン BPN'のカルシウム結合部位 1 とククミシンの構造

緑のリボン：ククミシンの触媒ドメイン

黄のリボン：ククミシンの PA ドメイン

オレンジのリボン：サブチリシン BPN'

マゼンタのボール：サブチリシン BPN'の  $\text{Ca}^{2+}$

点線：水素結合

サブチリシン BPN'のカルシウム結合部位 2 を図 2-14 に示した。サブチリシン BPN'の Gly276-Val281 でできたループに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合しており, Gly276, Tyr278, Val281 の主鎖の酸素と水素結合を形成していると考えられた。ククミシンにおいてもループとその下流の $\beta$ ストランドはよく保存されており,  $\text{Ca}^{2+}$  の代わりに正電荷をもつ Lys490 の側鎖を中心に Ser319, Ser324, Asp491 が水素結合を形成して安定化に寄与しているものと考えられた。

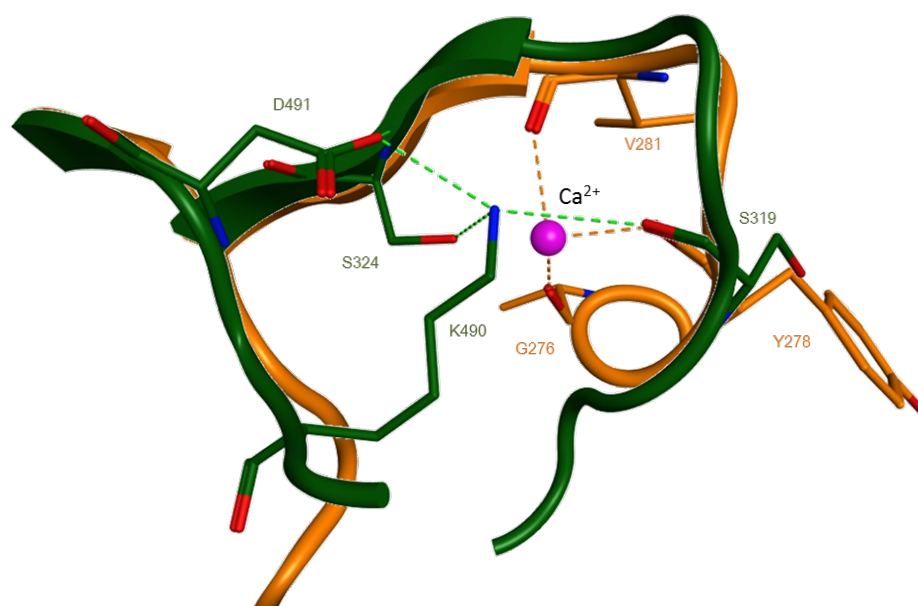


図 2-14 サブチリシン BPN'のカルシウム結合部位 2 とククミシンの構造

緑のリボン：ククミシン

オレンジのリボン：サブチリシン BPN'

マゼンタのボール：サブチリシン BPN'の  $\text{Ca}^{2+}$

点線：水素結合

サーミターゼのカルシウム結合部位3のカルシウム結合ループは、活性Hisがある $\alpha$ ヘリックスと上流の $\beta$ ストランドの間にあり、ククミシンも同じ二次構造を保持していると思われた。ループ領域を見ると7残基長く、カルシウム結合部位2と同様に $\text{Ca}^{2+}$ の代わりにLys243の負電荷を帯びた側鎖を中心にループ領域のアミノ酸Val195, Gly197, Arg199が水素結合を形成して安定化していると思われた。さらに、7残基分長くなったループにはPro189, 192, 198が分布しており、ゆらぎを抑えていると考えられた。ループのアミノ酸は周辺のアミノ酸と水素結合を形成してさらに安定化に寄与していると考えられた。

以上のことから、ククミシンはサブチリシンのカルシウム結合部位に相同なループ領域において安定な構造をとっていることが分かった。これらの構造はSBT3でも観察されており、金属イオンを必要としない植物由来のセリン型プロテアーゼの安定性に寄与していると考えられた。

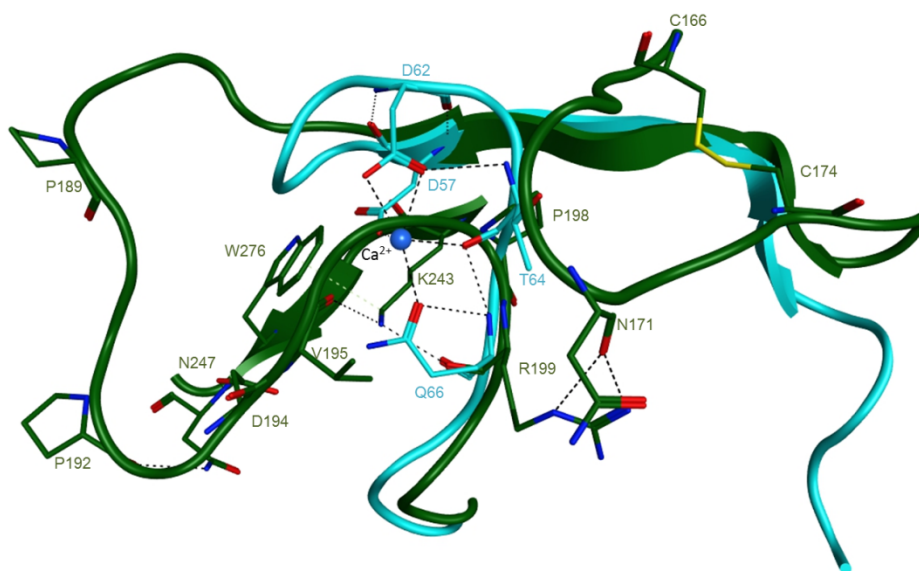


図 2-15 サーミターゼのカルシウム結合サイト3とククミシンの構造

緑のリボン：ククミシン

シアンのリボン：サーミターゼ

青のボール：サーミターゼの $\text{Ca}^{2+}$

点線：水素結合

### 2-3-3-3 ジスルフィド結合

バクテリオファージの T4 リゾチームのジスルフィド結合を 3 つ増やすと  $T_m$  値が  $23^\circ\text{C}$  上昇したという知見があり (37), タンパク質中のジスルフィド結合が安定性に大きく寄与することが知られている。

今回得られたククミシンの結晶構造からは、触媒ドメインと Fn-III ドメインの間のリンカーはゆらぎにより観察できなかったが、先述の 2-2-1 より Cys602-Cys611 でジスルフィド結合を形成していると考えられた。BPN'にはジスルフィド結合は存在していないが、ジスルフィド結合はククミシンに 4 対, SBT3 に 3 対存在しており、安定性に寄与していると考えられた (図 2-16)。ククミシンにも SBT3 にも不安定になりがちな分子表面のループ構造にジスルフィド結合が存在しており、安定化に寄与していた。ククミシン中のジスルフィド結合は SBT3 と同じ場所に 3 対, 活性サイトの近傍に 1 対あり, SBT3 より 1 対多いため, これがククミシンと SBT3 の  $T_m$  値の差に影響しているもののひとつであると考えられた。

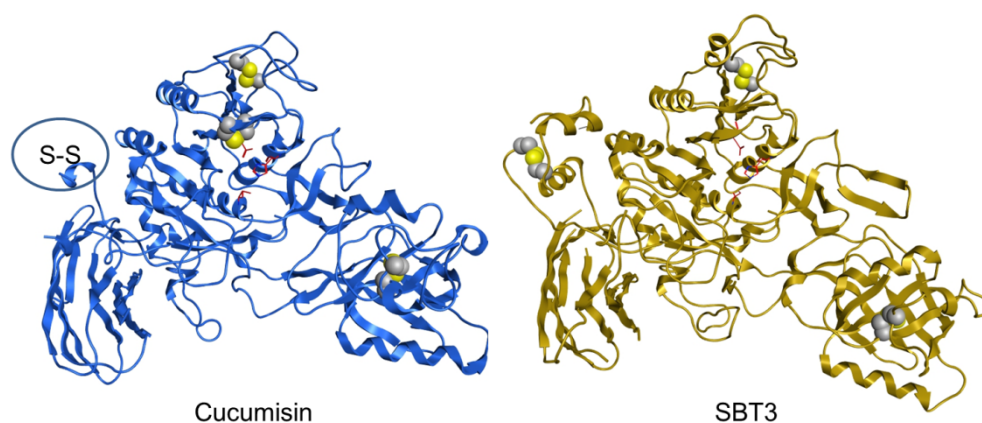


図 2-16 ククミシンと SBT3 のジスルフィド結合  
ボール：システイン (灰：炭素, 黄：硫黄)。

#### 2-3-3-4 安定性に寄与するアミノ酸の分布

芳香環は非局在の $\pi$ 電子系により、2つの芳香環が平行に配置すると $\pi$ - $\pi$ スタッキングを形成し、1つの芳香環と面が垂直な芳香環の水素原子や芳香族以外のアミノ酸のアルキル基や水素原子はT型スタッキングを形成すると思われる。ククミシンと SBT3 の芳香族アミノ酸は BPN' の 22 残基よりはるかに多く、触媒ドメインだけでも 40 残基以上存在していた (表 2-2)。芳香族アミノ酸は主にククミシンの分子表面付近に存在していることから、疎水性アミノ酸による相互作用が酵素全体の安定性に寄与していると考えられた (図 2-17)。

一般的に、超好熱菌タンパク質は分子表面に有電荷のアミノ酸を多くもつ傾向にあり (38)、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のタンパク質 CutA1 ( $T_m=148.5^\circ\text{C}$ ) の高い耐熱性は分子表面のイオン結合のネットワークが寄与していると考えられている (39)。ククミシンや SBT3 は BPN' より有電荷のアミノ酸の割合が多いことから、分子表面で塩橋や水素結合を形成していると考えられた (表 2-2, 図 2-17)。

また、プロリンは主鎖の窒素原子と側鎖が共有結合した環構造をとっており、二面角が固定されている。これにより、二次構造に存在するプロリンは水素結合のネットワークを破壊することからヘリックスブレーカーと呼ばれ、局所的に構造を不安定にする (40)。一方、二次構造に関与していない領域に配置されているプロリンは主にループ領域にあり、ループの可動性を制限している。プロリンは変性状態のタンパク質のエントロピーを減少させ安定化に寄与すると考えられている (41)。ククミシンにおいて 42 残基中 7 残基のプロリンが、また SBT3 において 41 残基中 11 残基のプロリンが二次構造に分布しており、ククミシンの構造の方が安定である傾向にあった。さらに、ククミシンのプロリンは主に分子表面の不安定なループ領域に存在しており、構造の安定化に寄与している可能性が考えられた。BPN' においては 14 残基中 3 残基のプロリンが二次構造に分布していた。また、グリシンの側鎖は水素であり、構造的な自由度が高い。T4 リゾチームのグリシンをプロリンに改変したところ、 $T_m$  値が  $1\sim 2^\circ\text{C}$  上昇したという報告もある (42)。ククミシンや SBT3 は BPN' よりプロリンの割合が高く、一方でグリシンの割合が低かった (表 2-2, 図 2-17)。



表 2-2 ククミシン, SBT3, BPN'のアミノ酸の分布

	Cucumisin		SBT3		BPN' (275)
	whole (621)	catalytic (390)	whole (649)	catalytic (411)	
aromatic amino acid (F, Y, W, H)	11.0% (69)	10.5% (41)	9.6% (63)	9.7% (40)	8.0% (22)
charged amino acid (D, E, R, K, H)	16.5% (102)	17.2% (67)	19.2% (125)	18.0% (74)	12.3% (34)
Proline	6.8% (42)	7.2% (28)	6.3% (41)	7.0% (29)	5.1% (14)
Glycine	9.5 (59)	10.8% (42)	7.9% (51)	8.7% (36)	12.0% (33)

\*() 内の数字はアミノ酸数を示した。

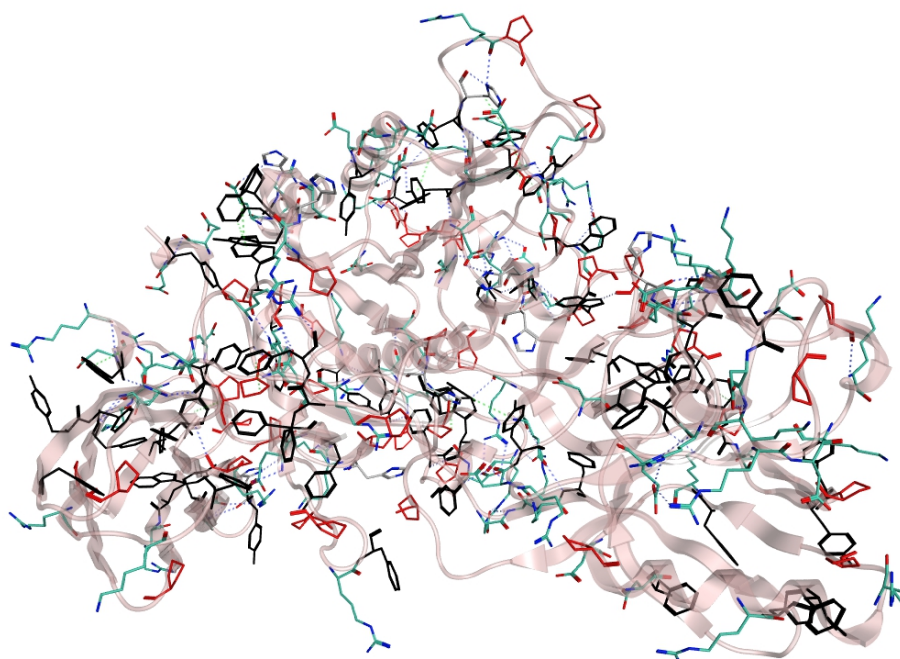


図 2-17 ククミシンのアミノ酸分布

黒：芳香族アミノ酸

緑：電荷アミノ酸

灰：ヒスチジン

赤：プロリン

水素結合：点線

### 第3章 ククミシン-プロペプチド 複合体の結晶構造



### 3-1 小序論

ククミシンは、ククミシン自身のプロペプチドで濃度依存的に阻害されることが報告されている (26)。ククミシンは、プロペプチドによって活性を抑制されていると考えられることから、ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造を解析することによってククミシンの基質認識部位の構造が解明でき、プロペプチドによる阻害機構が説明できると考えた。

### 3-2 方法

#### 3-2-1 プロペプチドの合成

##### 3-2-1-1 RNA 抽出

AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) 法を用いてアールスメロンから total RNA を得た。2 g のアールスメロンを RNase 阻害剤であるグアニジンチオシアネートおよび $\beta$ -メルカプトエタノールが含有している RNAgents Denaturing Solution (Promega) 5 mL に入れ、激しく攪拌した。それに 2 M 酢酸ナトリウム 0.5 mL, 酢酸フェノール 5 mL, CIA (クロロホルム: イソアミルアルコール=49: 1) を加え、激しく攪拌した。氷上に 15 分静置後、9,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、水層に CIA 1 mL を添加し、遠心分離した。水層にイソプロパノールを 0.6 倍量加え、遠心分離し、沈殿を 3 mL の RNAgents Denaturing Solution に溶解し、再度イソプロパノールを加え遠心分離した。上清を除去して 70%エタノールを添加し、遠心分離後、上清を除去し、減圧遠心によりエタノールを除去した。沈殿 (total RNA) は DEPC 水に溶解した。

##### 3-2-1-2 cDNA の作成およびクローニング

逆転写反応はランダムヘキサマーをプライマーに用い、MuLV Reverse Transcriptase (Life Technologies) で 1 本鎖の cDNA に逆転写した。プロククミシンをコードしている cDNA のフラグメントを Cucu-F (*Xho*I サイト) と Cucu-R (*Xho*I サイト) プライマー、AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いて PCR で増幅した。その後アガロース電気泳動を行い、目的バンドを切り出し QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲル抽出した。それをテンプレートに再度 PCR を行い *Xho*I 処理後、ゲル抽出し、インサートフラグメント (pro-cucu) を準備した。並行して、クローニング用のプラスミドベクター pBluescript II SK(+) (Agilent Technologies) を *Xho*I 処理後、ゲル抽出し、セルフライゲーションを防止するため Bacterial Alkaline Phosphatase (TaKaRa) で脱リン酸化処理した。

T4 DNA Ligase (TaKaRa) を用いてインサートフラグメントを pBluescript II SK(+) にライゲ

ーションした後、ライゲーション反応液をエレクトロポレーションで大腸菌 XL1-blue MRF' に導入した。X-gal を塗布したアンピシリンおよびテトラサイクリンを含む LB プレートに播種し、37°C で一晩インキュベートした。得られた白いコロニーを液体培地に移植し、さらに一晩培養した。培地から大腸菌を集菌し、アルカリ SDS 法でプラスミド抽出した。

プロククミシン導入プラスミドの塩基配列を確認した後、プロペプチドの配列部分を Pro-F (*NdeI* サイト) および Pro-R1 (*HindIII* サイト) プライマーを用いて TaKaRa Ex Taq polymerase (TaKaRa) で PCR を行った。得られた DNA フラグメントを制限酵素処理し、電気泳動後、ゲルから抽出した。DNA フラグメントを *NdeI*, *HindIII* で処理したプラスミドベクター pET21c(+) (Novagen) に導入した(図 3-1)。cucu-pro-pET21c をケミカル法で大腸菌 BL21-Gold (DE3) pLysS (Agilent Technologies) に形質導入した。今回構築したプラスミドはプロペプチドの前後にタグが付いておらず、このペプチドが発現すると転写開始の Met が付加された 89 残基および 10 kDa のプロペプチドが合成された (図 3-2)。

使用したプライマー (下線は制限酵素サイト)

Cucu-F (5'-ATGCCTCGAGATTGGATTCTGACG-3')

Cucu-R (5'-CTCTCGAGCGATACTTCTTTCCCAC-3')

Pro-F (5'-GACTCATATGAGATTGGATTCTGACGA-3')

Pro-R1 (5'-CCTGCAAGCTTAATGAAGTTCGTTCAATTT-3')

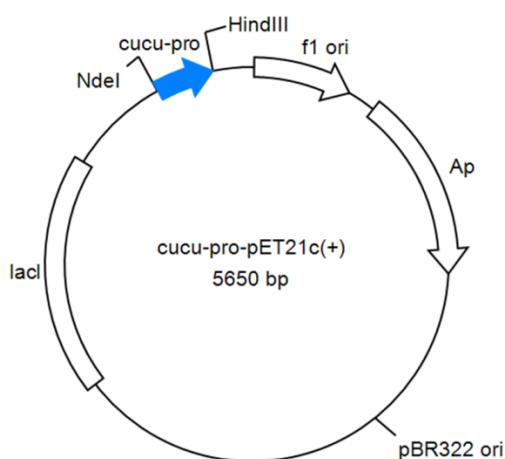


図 3-1 ククミシン-プロペプチド導入 pET21c のコンストラクト

5170	5180	5190	5200	5210	5220
CCTCTAGAAA	TAATTTTGT	TAACTTTAAG	AAGGAGATAT	ACATACTcat	atgAGATTGG
5230	5240	5250	5260	5270	5280
S D D	D G K	N I Y I	V Y M	G R K	L E D P
ATTCTGACGA	TGATGGAAAA	AACATTTATA	TTGTATACAT	GGGAGGAAG	CTAGAGGATC
5290	5300	5310	5320	5330	5340
D S A	H L H	H R A M	L E Q	V V G	S T F A
CTGACTCTGC	TCATTTACAT	CATAGGGCAA	TGTTGGAACA	AGTTGTTGGC	AGCACTTTTG
5350	5360	5370	5380	5390	5400
P E S	V L H	T Y K R	S F N	G F A	V K L T
CTCCAGAATC	TGTGCTCCAC	ACTTACAAGA	GAAGTTTCAA	CGGATTCGCA	GTGAAACTTA
5410	5420	5430	5440	5450	5460
E E E	A E K	I A S M	E G V	V S V	F L N E
CTGAAGAAGA	AGCTGAAAAG	ATTGCCAGTA	TGGAGGGTGT	GGTGTCTGTG	TTTTTAAATG
5470	5480	5490	5500	5510	5520
M N E	L H *				
AAATGAACGA	ACTTCATTaa	gcttGCGGCC	GCACTCGAGC	ACCACCACCA	CCACCACTGA
5530	5540	5550	5560	5570	5580
GATCCGGCTG	CTAACAAAGC	CCGAAAGGAA	GCTGAGTTGG	CTGCTGCCAC	CGCTGAGCAA

図 3-2 プロペプチドの翻訳領域

黄のハイライト：プロペプチド

赤の小文字：制限酵素サイト

### 3-2-1-3 プロペプチドの発現および精製

cucu-pro-pET21c/BL21-Gold (DE3) pLysS を 3 mL の LB-アンピシリン培地でプレインキュベートし、100 mL の LB-アンピシリン培地に移植して本培養した。2 時間後に 1 mM IPTG を添加し、6 時間発現誘導した。5,000×g で 10 分遠心分離後、ペレットを 50 mM リン酸ナトリウムカリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 mL に懸濁し、超音波破碎した。20,000×g で 20 分遠心分離し、これを再度繰り返した。プロペプチドが封入体であるため 8 M 尿素含有緩衝液 5 mL に懸濁し、4°C で 1 時間可溶化した。20,000×g で 20 分遠心分離し、上清を 4 時間透析した。遠心分離後、上清をポアサイズ 0.45 μm のフィルターで濾過した。

可溶化した粗精製プロペプチドを 50 mM リン酸ナトリウムカリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-TOYOPEARL (TOYOBO) カラムに添加し、緩衝液で洗浄した。吸着したタンパク質は、0-250 mM NaCl のリニアグラジェントで溶出した。

溶出画分の 280 nm の吸光度は U-2000 形日立ダブルビーム分光光度計 (株式会社日立製作所) を用いて測定した。

#### 3-2-1-4 阻害活性測定

プロペプチドの DEAE 溶出画分に 10.56 nM の精製ククミシンを添加し、37°C で 10 分インキュベートした。基質として 2 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA (SIGMA) を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした後、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー Infinite M200 FA (TECAN) を用いて測定した。

活性画分のプロペプチドを 0-3.6  $\mu$ M に調製し、ククミシンに対する阻害活性を測定した。各濃度のプロペプチドに 10.56 nM のククミシンを添加し、37°C で 10 分インキュベートした。基質として 2 mM Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*NA (株式会社ペプチド研究所) を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした後、405 nm の吸光度を測定した。20 mM ナトリウムカリウムリン酸緩衝液 (pH 7.0) を濃度調製に用いた。

### 3-2-2 ククミシン-プロペプチド複合体の結晶化

先に精製したプリンスメロン由来のククミシン(30% ショ糖含有)凍結乾燥粉末を 0.05 M NaCl, 1 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) を含んだ 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し, 陽イオン交換 HiTrap SP カラム (GE Healthcare) に添加し, 0.05-0.4 M NaCl のリニアグラジェントで溶出した。タンパク質が含有している画分をゲル濾過 Superdex 200 HR カラム (GE Healthcare) で分画し, 結晶化用に精製した。結晶化に用いたプロペプチドは無細胞合成系で発現させた (43)。反応液を 1 M NaCl と 20 mM イミダゾールを含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した His Trap column (GE Healthcare) に添加し, 同緩衝液で洗浄した。カラムに結合したタンパク質を 0.5 M イミダゾールと 0.5 M NaCl を含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。溶出タンパク質に TEV プロテアーゼを添加し, 1 M NaCl と 20 mM イミダゾール, 1 mM DTT を含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で, 4°C 下で 15 時間透析して His-Tag を切断した。透析内液を 50 mM NaCl と 1 mM DTT を含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した強陰イオンカラム Hi Trap Q HP column (GE Healthcare) に添加し, 同じ緩衝液で洗浄, 0.05-0.5 M NaCl のリニアグラジェントで溶出した。溶出画分を 100 mM NaCl と 0.5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) を含んだ 50 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したゲル濾過カラム Hi Load Superdex75 column (GE Healthcare) に添加した。精製プロペプチドは精製ククミシンと 1.5:1 の割合で混合し, 50 mM NaCl と 0.5 mM TCEP を含んだ 25 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したゲル濾過カラム Hi Load Superdex200 column (GE Healthcare) でククミシン-プロペプチド複合体を精製した。最終的に 12.1 mg/mL の複合体を得た。

ククミシン-プロペプチド複合体の結晶化は, 0.5  $\mu$ L のタンパク質溶液と 0.5  $\mu$ L のリザーバー溶液 [0.05 M 硫酸アンモニウムと 30% ペンタエリスリトールエトキシレートを含んだ 0.05 M Bis-Tris 緩衝液 (pH 6.5)] の液滴を用い, シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。

### 3-2-3 ククミシン-プロペプチド複合体の X 線結晶構造解析

結晶を抗凍結剤である Paraton-N に 1 分間入れ, 110 K の窒素ストリームで瞬間凍結した。結晶の回折データは大型放射光施設 Spring-8 の BL32XU で 100 K で収集した。回折データは分解能 1.95 Å までのデータを使用し, HKL2000 program suite (27) で積分とスケーリングを行った。

### 3-2-4 ククミシン-プロペプチド複合体の X 線結晶構造の位相決定と原子モデルの精密化

ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造は CCP4 Program Suite (44) の molrep を用いて分子置換法 (MR 法: molecular replacement method) で決定した。第 2 章で決定したククミシンの結晶構造 (PDB ID: 3VTA) の座標をモデルに使用した。立体構造は ARP/wARP (45) を用いて構築し, Coot (31) と CNS (30) プログラムを使用して構造の補正と精密化を行った。

最終的なモデルの評価は, Coot を用いたラマチャンドラン・プロットで行った。決定したククミシン-プロペプチド複合体の座標は, 2015 年 3 月 9 日に Protein Data Bank に登録した (PDB ID: 4YN3)。結晶化および X 線結晶構造解析は理化学研究所で行った。

### 3-2-5 結晶構造の解析

結晶構造のレンダリングや計算は菱化システム株式会社の統合計算化学システム MOE 2014.09 (Molecular Operating Environment) を使用した。相同タンパク質の検索は Dali server (32) を用いた。タンパク質の一次構造と二次構造の比較には MOE に搭載されている Clustal X を使用した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 プロペプチドの精製および阻害活性測定

陰イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質の溶出ピークとククミシンの阻害活性はフラクション 11 で最大になった。SDS-PAGE の結果フラクション 11 に目的の 10 kDa のプロペプチドの溶出が確認された (図 3-3)。ククミシンの活性は、プロペプチドによって濃度依存的に阻害された (図 3-4)。

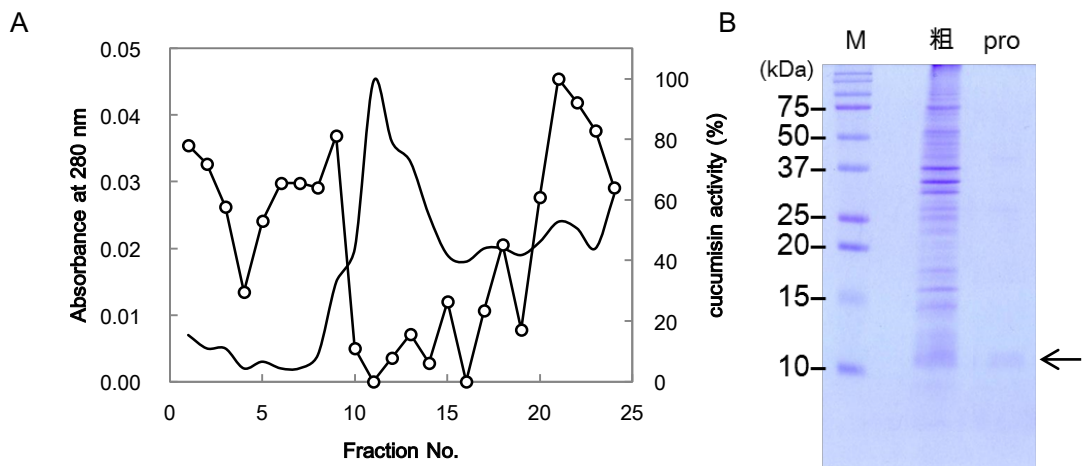


図 3-3 プロペプチドの精製チャートおよび SDS-PAGE

A : プロペプチドの精製チャート

横軸 : フラクシオンナンバー

左縦軸 : 280 nm のタンパク質の吸光度

右縦軸 : ククミシンの残存活性

実線 : タンパク質の吸光度

○ 線 : ククミシンの残存活性

B : 精製画分の SDS-PAGE (15% アクリルアミド)。

M : 分子量マーカー

粗 : 精製前の可溶化画分

pro : 精製プロペプチド



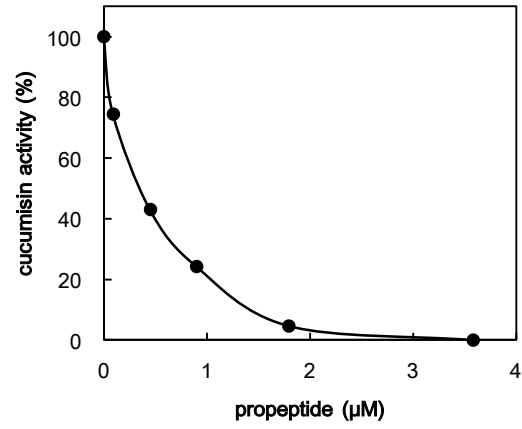


図 3-4 プロペプチドによるククミシンの阻害活性

横軸：プロペプチドの濃度

縦軸：プロペプチド無添加のククミシンの活性を 100%としたときの  
相対活性

### 3-3-2 ククミシン-プロペプチド複合体の原子モデルの構築と精密化

今回の結晶構造解析では、プロペプチドの N 末端 5 残基および Glu43-Phe64, ククミシンの Phe600-Arg628 の残基以外の部分についてはモデル化でき、ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造は  $R_{\text{work}}=0.184\%$ ,  $R_{\text{free}}=0.222\%$ まで精密化できた。回折像統計値と精密化統計値は表 3-1 に示した。

最終的なモデルのラマチャンドラン・プロットの結果、96.37%の残基が好ましい領域 (preferred regions) にあり、3.16%が許容される領域 (allowed regions), 0.47%が許容範囲から外れている残基 (outliers) であった (図 3-5)。ククミシン-プロペプチド複合体構造のゆらぎの大きさを示す温度因子の分布は図 3-6 に示した。

表 3-1 ククミシン-プロペプチド複合体の結晶の回折像統計値および構造精密化統計値

Crystal characteristics						
Space group	$p4_2$					
Unit cell parameters (Å)	$a=97.7$	$b=97.7$	$c=73.4$	$\alpha=90.0$	$\beta=90.0$	$\gamma=90.0$
Molecules per asymmetric unit	1					
Wavelength (Å)	1.00					
Resolution range (Å)	50.00-1.95					
Redundancy	7.3					
Unique reflections	49,147					
Completeness (%)	98.5 (97.8) <sup>a</sup>					
$I/s(I)$	19.5 (3.7)					
$R_{\text{svm}}^b$	0.095 (0.686)					
Refinement statistics						
Resolution range (Å)	34.56- 1.95					
Unique reflections	49,146					
$R$ -factor/ $R_{\text{Free}}^c$	0.184/0.222					
No. of protein atoms	5,047					
No. of water molecules	387					
RMSD from ideal geometry						
Bond lengths (Å)	0.005					
Bond angles (°)	1.30					
Average isotropic $B$ -value (Å <sup>2</sup> )	41.3					

<sup>a</sup> Numbers in parentheses refer to the highest-resolution shell.  
<sup>b</sup>  $R_{\text{svm}} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ .  
<sup>c</sup>  $R$ -factor =  $\sum_h ||F_o| - |F_c|| / \sum_h |F_o|$ . Free  $R$ -factor was calculated using 5% of reflections omitted from refinement.

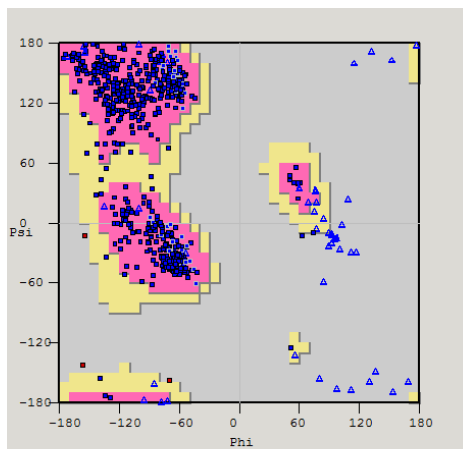


図 3-5 ククミシン-プロペプチド複合体のラマチャンドラン・プロット

ピンク：好ましい領域

黄：許容される領域

赤▲：許容な範囲から外れた残基

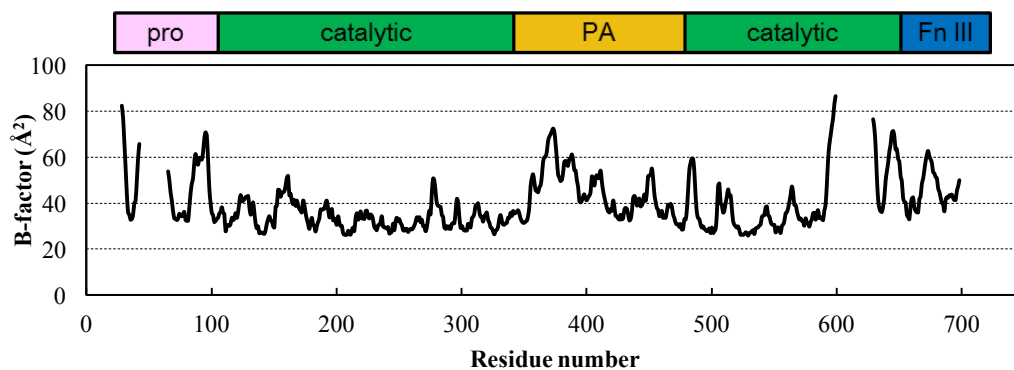


図 3-6 ククミシン-プロペプチド複合体のドメイン構造と主鎖の温度因子分布

図上部に各ドメインを示した。

### 3-3-3 ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造

#### 3-3-3-1 全体構造

ククミシン-プロペプチド複合体の全体構造を図 3-7 に示した。ククミシン-プロペプチド複合体は1:1でククミシンの活性サイトにプロペプチドのC末端が挿入する形で複合体を形成していた。

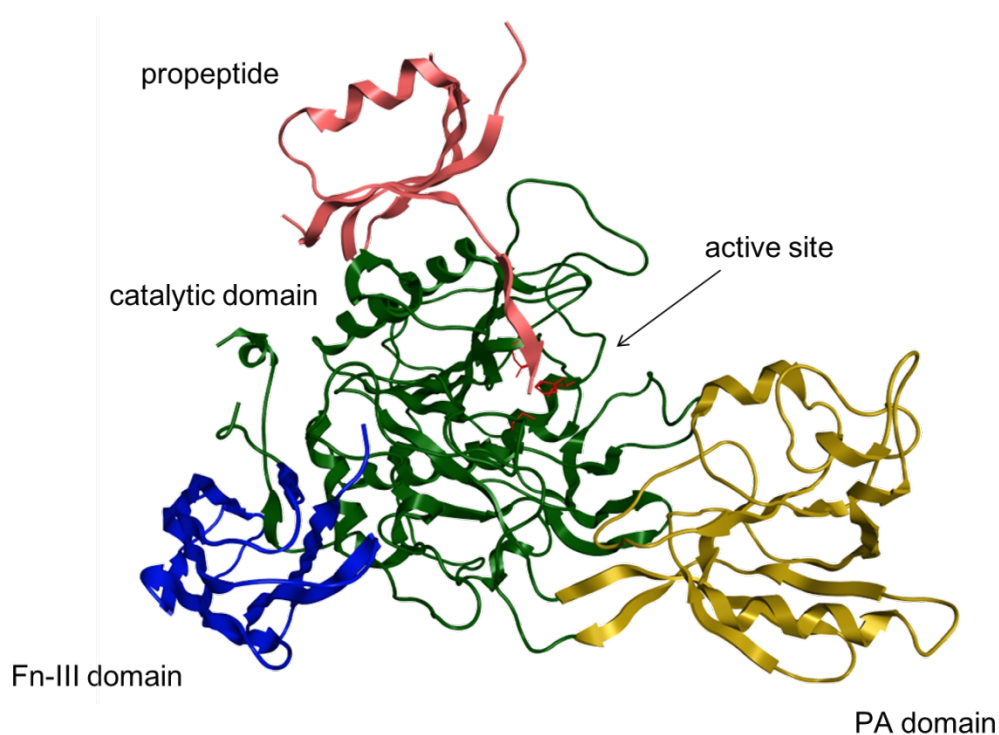


図 3-7 ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造

ピンクのリボン：プロペプチド

緑のリボン：ククミシンの触媒ドメイン

黄のリボン：ククミシンの PA ドメイン

青のリボン：ククミシンの Fn-III ドメイン

赤：触媒残基

ククミシン-プロペプチド複合体のプロペプチドの構造は、4本の $\beta$ ストランド ( $\beta$ 1: 32-40,  $\beta$ 2: 69-73,  $\beta$ 3: 77-84,  $\beta$ 4: 100-103) と2本のヘリックス ( $\eta$ 1: unclear-40,  $\alpha$ 1: 86-94), C末端で構成されていた (図 3-8A)。N末端5残基とヘリックスを含む Glu43-Phe64 の間は、電子のゆらぎのために観察することができなかった。プロペプチドの温度因子の平均は  $46.3 \text{ \AA}^2$  と高く、特にヘリックスの周辺は  $60 \text{ \AA}^2$  以上あった (図 3-6)。プロペプチドの構造は $\alpha$ - $\beta$ サンドイッチグループのスプリット $\beta\alpha\beta$ に分類される。プロペプチドは Val36, Val69, Phe80, Val82, Leu84, Ile92, Val98, Val101 の側鎖を巻き込んで疎水性コアを形成していた (図 3-8B)。

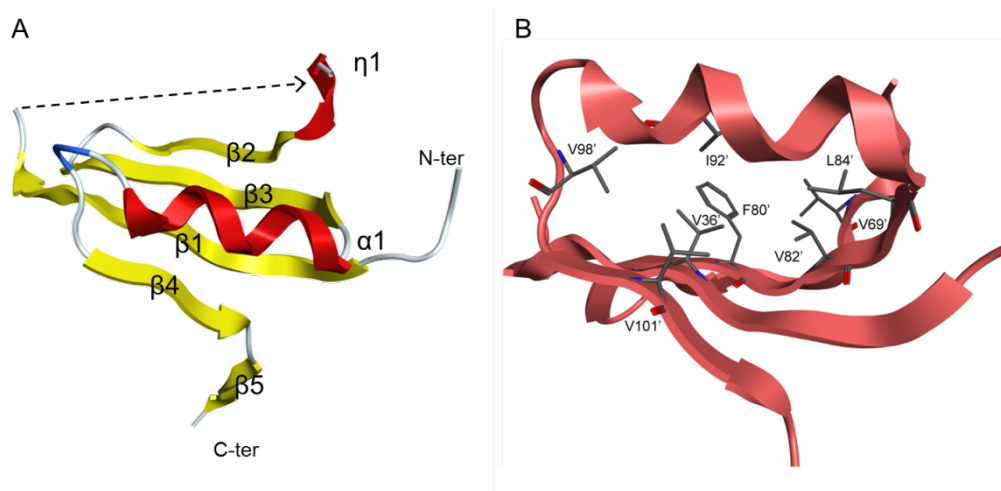


図 3-8 プロペプチドの構造

- A : プロペプチドの二次構造
- 黄 : ストランド
- 赤 : ヘリックス
- B : プロペプチドの疎水性コア

### 3-3-3-2 ククミシン-プロペプチド複合体の相同性検索

ククミシン-プロペプチドの立体構造は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来の Tk-サブチリシン-プロペプチド複合体 (PDB ID: 2Z2Y), *Bacillus* 属のサブチリシン E-プロペプチド複合体 (PDB ID: 1SCJ), サブチリシン BPN'-プロペプチド複合体 (PDB ID: 1SPB) の各プロペプチドと相同性が高く, Z-score は 7.0, 6.6, 6.4, RMSD は 1.42, 1.85, 1.84 Å であった。各複合体の RMSD は, サブチリシン E (2.70 Å), サブチリシン BPN' (2.77Å), Tk-サブチリシン (3.23 Å) の順でククミシン-プロペプチド複合体と相同性が高かった。これら細菌性サブチリシンは触媒ドメインだけをもち, PA ドメインや Fn-III ドメインは保持していなかった。MOE を用いてプロペプチドの一次構造および二次構造の比較を行うと, アミノ酸配列の相同性はサブチリシン E が 15.9%, サブチリシン BPN' が 12.5%, Tk-サブチリシンが 13.6%と低いにもかかわらず, プロペプチドの構造の保持に必要な疎水性コアを形成するアミノ酸とプロテアーゼ本体と疎水性相互作用を形成するアミノ酸の位置が保存されていた (図 3-9)。ナットウキナーゼプロペプチドにおいて, フォールディングに重要とされる 4 残基 (サブチリシン E では Tyr39, Gly42, Gly63, Gly64) が確認されており (46), サブチリシン E や BPN' などの *Bacillus* 属で保存されているが, Tk-サブチリシンでは Val32, Ser35, Gly50, Gly52, ククミシンでは Tyr34, Tyr37, Val60, Gly61, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のサブチラーゼ ARA12 では Tyr32, His35, Leu56, Arg57, イネ (*Oryza sativa*) 由来のサブチラーゼ RSP1 では Tyr32, Tyr35, Leu59, Gly60 と保存されていなかった (図 3-10)。

ククミシン-プロペプチド複合体の構造は細菌由来のプロペプチドの構造と類似しており, 立体構造の保持や酵素間の疎水性相互作用に重要なアミノ酸は保存されていた。サブチリシン E プロペプチドはククミシンを阻害しないが, 植物由来のサブチラーゼである ARA12 と RSP1 はククミシンの活性を阻害することができる (26)。立体構造は明らかにされていないが, アミノ酸配列は 30%以上ククミシンと類似しており, 細菌由来と同様に構造の保持や疎水性相互作用に重要なアミノ酸も保存されていた (図 3-10)。

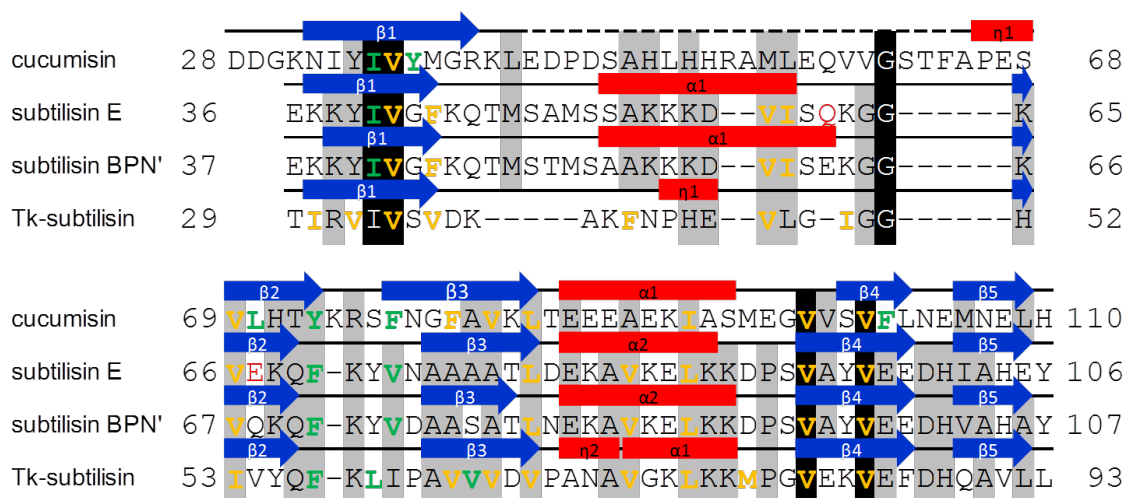


図 3-9 ククミシン-プロペプチドとサブチリシンプロペプチドの一次構造と二次構造の比較

サブチリシン E は PDB ID: 1SCJ.B, サブチリシン BPN' は PDB ID: 1SPB.P, Tk-サブチリシン は PDB ID: 2Z2Y.B を使用した。

赤のバー： $\alpha$ ヘリックスおよび  $3_{10}$  ( $\eta$ ) ヘリックス

青矢印： $\beta$ ストランド

破線：観察されなかった構造

黒と灰色のハイライト：相同なアミノ酸残基

オレンジの文字：疎水性コアを形成するアミノ酸残基

緑の文字：プロテアーゼとの疎水性相互作用に関与するアミノ酸残基

赤の文字：変異アミノ酸残基

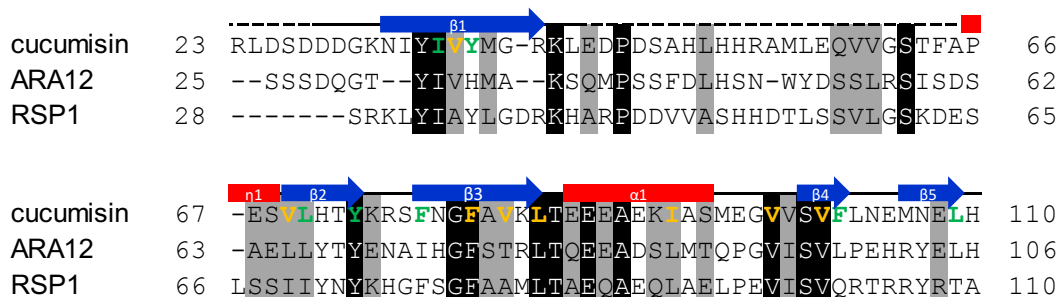


図 3-10 ククミシン-プロペプチドとサブチラーゼプロペプチドの一次構造の比較

Clustal X を用いて各種プロペプチドの一次構造の比較を行った。

凡例は図 3-9 と同じである。

### 3-3-3-3 ククミシン-プロペプチド複合体における活性サイトの構造

ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造解析の結果、プロペプチドの C 末端はククミシンの活性サイトのクレフトにはまり込んでいた (図 3-11)。触媒部位を観察すると、プロペプチドの C 末端の His110' (以降プロペプチドの残基には「'」を付加して表記した) のカルボキシ基が活性 His204, 活性 Ser525 とセリン型プロテアーゼの活性化に重要なオキシアニオンホールパートナーである Asn307 と水素結合を形成する距離に位置し、基質の P1 残基のように振る舞っていると考えられた。よってククミシンはプロペプチドの C 末端が活性サイトを塞いでいたことから、ククミシン自身のプロペプチドで活性が阻害されると考えられた。

さらに、単体のククミシンにおいてループ領域だった活性サイト付近の Gly275 の主鎖原子とプロペプチドの Glu108' 主鎖原子が水素結合をつくり、短い逆平行 $\beta$ シート構造を形成していた。この構造はセリン型プロテアーゼでよく見られる構造で触媒反応中の遷移状態の安定化に寄与していると考えられている。さらに、その上流の Asn107' の主鎖も Cys250 と水素結合をつくり、短い逆平行の $\beta$ シート構造を形成していた。このように基質を両サイドから保定する構造は、サブチリシンでは確認されており、トリプシンやキモトリプシンでは確認されていない。この構造が酵素-基質間の安定性を一層向上させると考えられた。



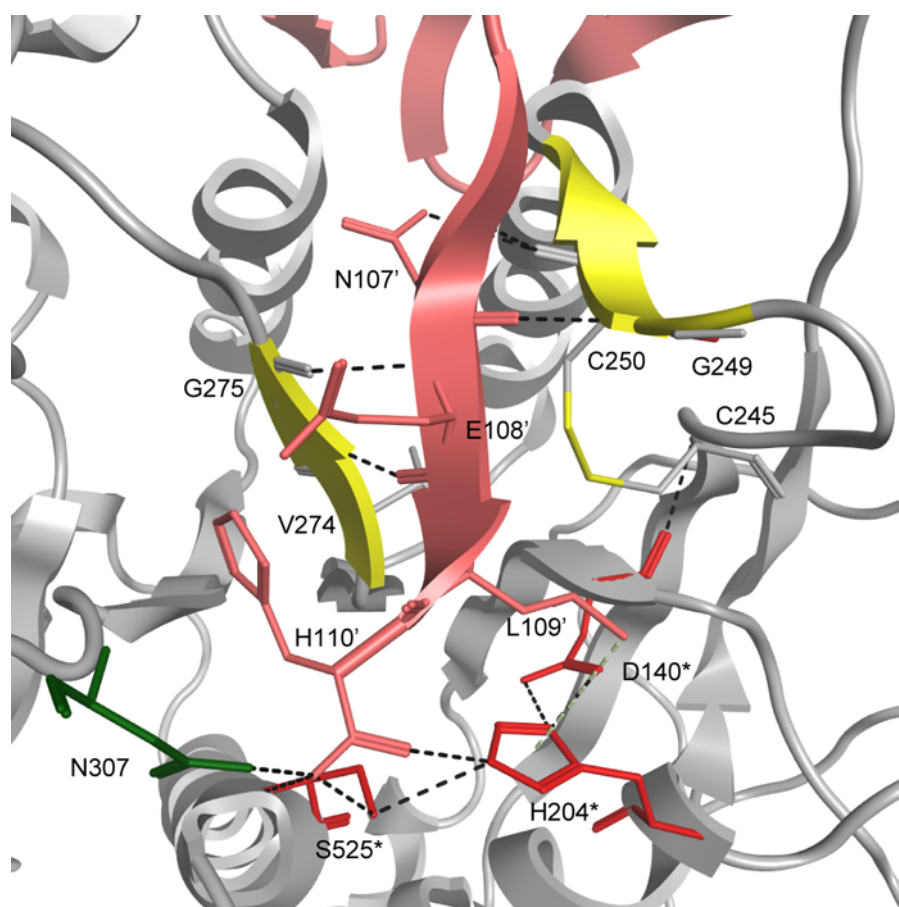


図 3-11 ククミシン-プロペプチド複合体の活性サイト周辺の構造

灰色のリボン：ククミシン

黄のリボン：プロペプチドと $\beta$ シートを形成するククミシンの領域

ピンクのリボンおよびスティック：プロペプチド

赤のスティック：触媒残基

緑のスティック：オキシアニオンホールパートナーの Asn307

黄のスティック：ジスルフィド結合

黒の点線：水素結合

緑の点線：CH/ $\pi$ 相互作用

### 3-3-4 ククミシンのサブサイトと基質特異性

1-2-4 で述べたように、ククミシンの基質特異性は幅広いものである。今回得られた複合体の構造から、ククミシンの基質結合クレフトはククミシンの $\beta 6$  と  $\beta 7$  と  $\alpha 5$  の間のループの間隙にあり、ククミシン-プロペプチド複合体のプロペプチドの C 末端がククミシンのクレフトに結合していたことから、ククミシンのサブサイト（基質結合ポケット）を特定することができた (図 3-12)。

ククミシンのサブサイト (S) 1 はその他のサブチリシンに対して縦に広く、奥に深いポケットであり入口に Asn307, Ser273, サイドに Ser304, Ala305, Gly306, Thr524, ポケットの底に Ser317 があり、プロペプチド P1 残基 His110' の側鎖は Ser304 の側鎖と水素結合を形成していた。極性非電荷のアミノ酸が主に分布していたことから、極性非電荷のアミノ酸を好み、有電荷のアミノ酸は好まないと考えられた。実際にククミシンはヒスチジンを除いて P1 位に電荷をもつアミノ酸 (Asp, Glu, Arg, Lys) を好まない (表 1-4)。さらに、オキシアニオンホールペアの Asn307 がポケットの入口を狭くしているため、Thr を除いて $\beta$ 炭素から枝分かれしているアミノ酸 (Val, Ile, Trp) を好まないと考えられた。また、ククミシンの S2 ポケットは広く、Thr141, Asn202, Val274, 活性 His204\*, Cys245-Cys250 間のジスルフィド結合も基質特異性に影響していると思われた。プロペプチド P2 残基の Leu109' の側鎖は、活性 His204\* のイミダゾリウム環と CH/ $\pi$ 相互作用を形成していた。ククミシンでは、基質の P2 位にプロリンか非極性のアミノ酸を好む傾向がある (図 1-7)。基質の P2 位がプロリンであると、二面角が制限され、P1 残基の側鎖が基質結合ポケットに結合しやすくなると考えられた。さらに、S2 は近傍の活性中心の  $pK_a$  に影響を与えないように疎水性のポケットとなっているため、基質の P2 位に疎水性の残基を好むと考えられた。S3 についてはポケットではなく、Gly275 とプロペプチドの P3 残基 Glu108' と主鎖で水素結合を形成していた。S4 は Cys250, Asp252, Ile255, Asp280, Ile287 で構成され、大きなポケットを形成していた。Cys250 主鎖はプロペプチドの P4 残基 Asn107' の主鎖と水素結合を形成しており、Asn107' の側鎖は Cys250, Asp252 と水素結合を形成していた。S5 ポケットは広く空いており、Arg188, Asp248, Gly249, Ser251 で構成されていた。以上のことから、全体的にサブサイトには大きく深いクレフトがあり、S3 と S4 で側鎖の構造に影響されにくい非特異的な短い逆平行の $\beta$ シート構造を形成することがククミシンの広い基質特異性に影響していると考えられた。

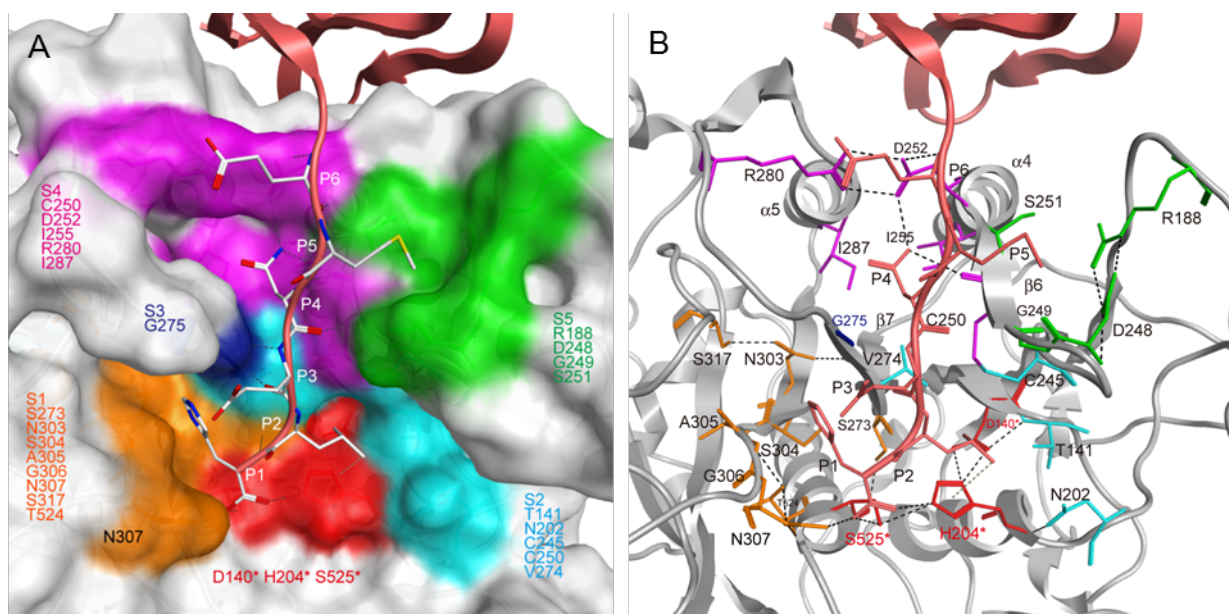


図 3-12 ククミシンのサブサイト（基質結合ポケット）の構造

A：ククミシンの活性サイトの分子表面

オレンジ：S1

シアン：S2

青：S3

マゼンタ：S4

黄緑：S5

赤：触媒残基

ピンクのリボン：プロペプチド

黒の点線：水素結合

緑の点線：CH/π相互作用

B：Aと同様にサブサイトを各色のスティックで示した。

### 3-3-5 ククミシンの構造変化

第2章で同定した成熟型ククミシンの立体構造 (PDB ID: 3VTA) とククミシン-プロペプチド複合体の立体構造 (PDB ID: 4YN3) を比較すると、RMSDが0.84 Åで全体の構造は非常に類似していたが、一部に構造の差異を確認した (図 3-13, 3-14)。この領域 (Gly276-Asp285) における RMSD は 7.62 Å であり、成熟型ククミシンでは2回巻きの $3_{10}$ ヘリックス構造が存在しており、この領域のアミノ酸は他の領域のアミノ酸と干渉していないことが考えられた (図 3-15)。一方、複合体ではヘリックス構造が緩んで、ループ (Gly276-His281) と1回巻きの $3_{10}$ ヘリックス (Tyr282-Val284) になる。Phe283はプロペプチドの Ser100' と Tyr282 は Thr483 と水素結合を形成し、Arg280の側鎖は120°以上回転して Asp252 と向かい合って、2本の水素結合を形成し、複合体の形成に役立っていた。このことから、プロペプチドの結合に適した構造にククミシンが変化していることが考えられた。言い換えれば、ククミシン前駆体のプロペプチドが遊離し、成熟型になるとこのループ領域が酵素によって切断を受けにくい構造に安定化していると考えられた。また、基質が結合すると複合体の構造に変化し、そのことが基質を捉える Asp252 の配置に、大きく影響すると考えられる。この領域における構造変化は Tk-サブチリシン (PDB ID: 2Z2X, 2Z2Y) で観察されたが、ククミシンとは異なり、Ala239-Asp241のクレフトの内側を向いていた側鎖がプロペプチドの結合により外向きに回転し、プロペプチドの His64 と CH/ $\pi$ 相互作用で結合する Tyr193 の側鎖の移動範囲を広くしていると考えられた。

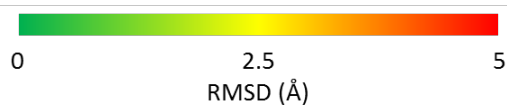
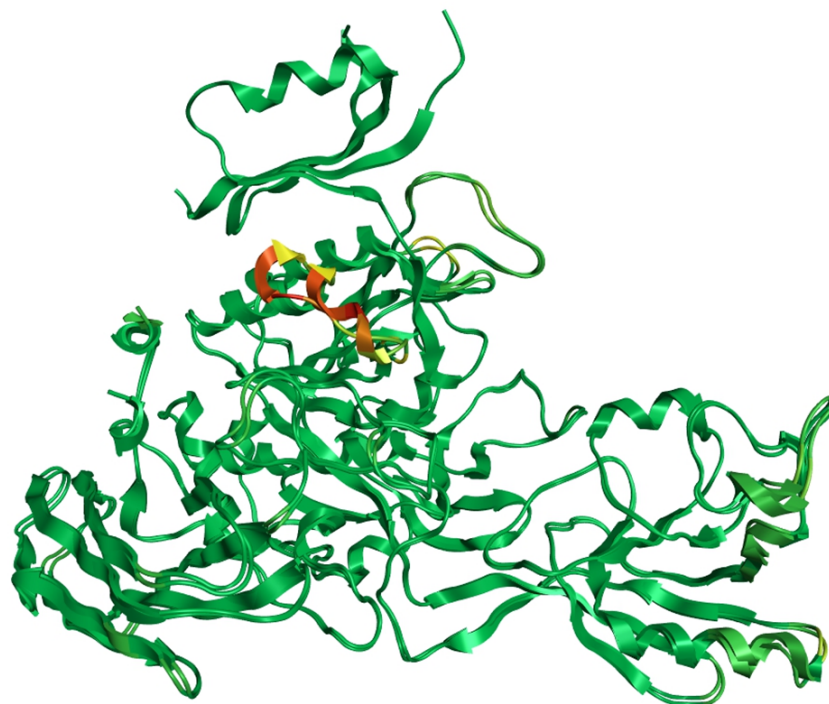


図 3-13 成熟型ククミシンとククミシン-プロペプチド複合体の構造比較

成熟型ククミシン (PDB ID: 3VTA) とククミシン-プロペプチド複合体 (PDB ID: 4YN3) を C<sup>α</sup>原子で重ね合わせた。緑から赤のグラデーションは RMSD。

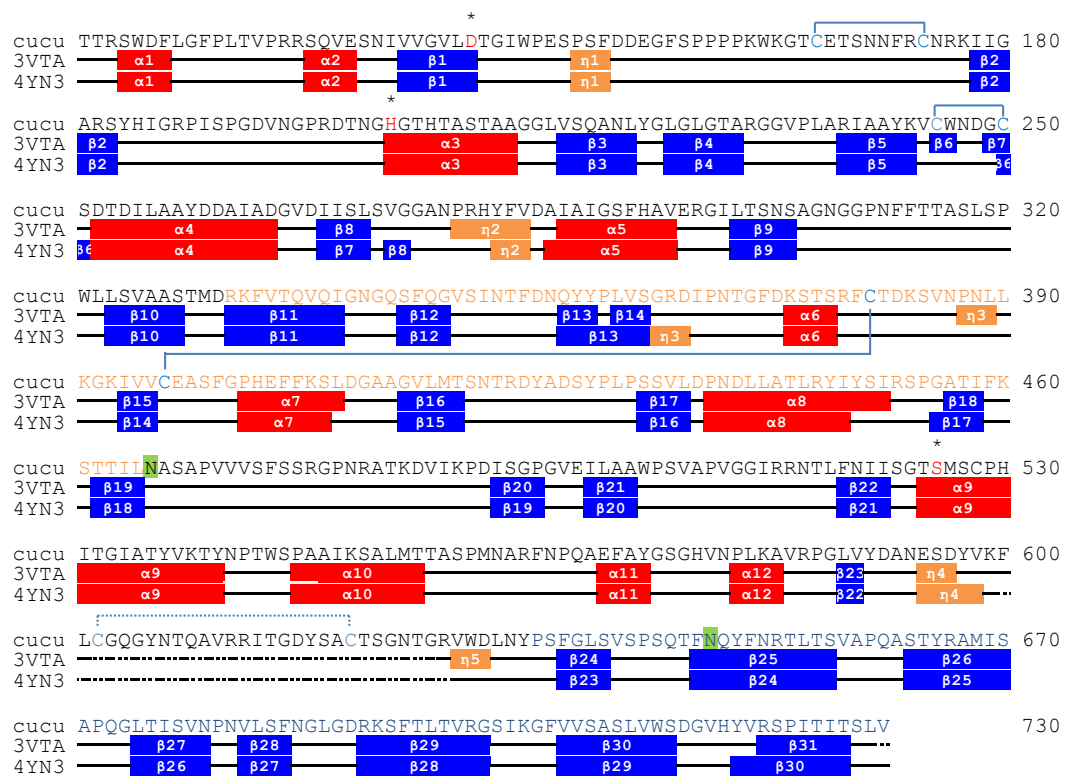


図 3-14 成熟型ククミシンとプロペプチド複合体のククミシンの二次構造の比較

3VTA : 成熟型ククミシン

4YN3 : ククミシン-プロペプチド複合体

赤 : αヘリックス

青 : βストランド

オレンジ :  $3_{10}(\eta)$  ヘリックス

オレンジの文字 : PA ドメイン

青の文字 : Fn-III ドメイン

青のライン : ジスルフィド結合

赤の文字およびアスタリスク : 触媒残基

緑のハイライト : 糖鎖修飾されるアミノ酸

二点鎖線 : 観察されなかった構造

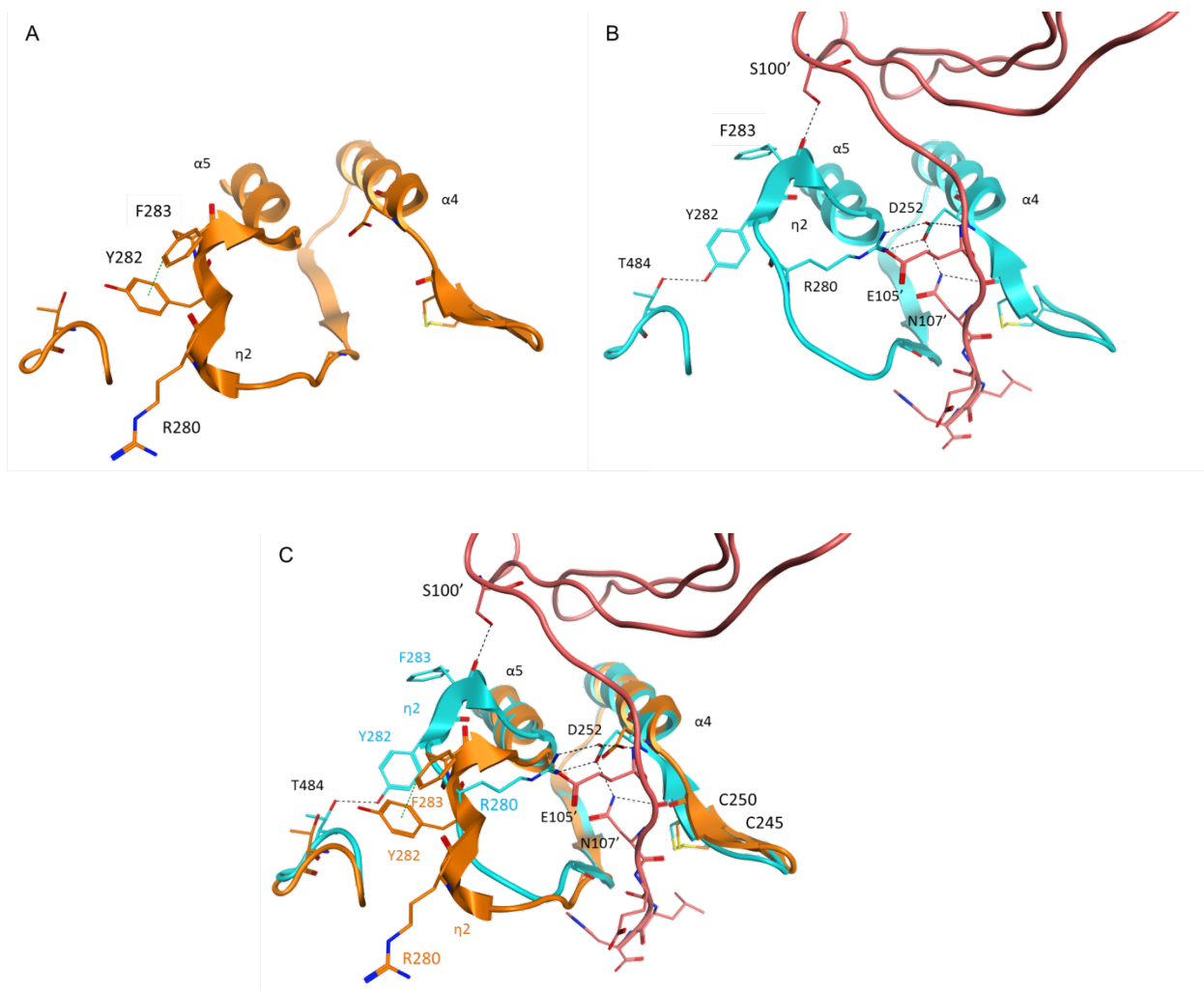


図 3-15 ククミシンの構造変化

A : 成熟型ククミシン, B : ククミシン-プロペプチド複合体, C : A と B の構造の比較

オレンジ : 成熟型ククミシン (PDB ID: 3VTA.A)

シアン : プロペプチド複合体形成時のククミシン (PDB ID: 4YN3.A)

ピンク : プロペプチド (PDB ID: 4YN3.B)

## 第4章 プロペプチドによる ククミシンの阻害機構



#### 4-1 小序論

第3章で解明したククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造に基づき、プロペプチドによるククミシンの阻害機構について考察した。また、中川らの報告における変異体解析の結果 (26) と結晶構造に基づいたプロペプチドの阻害機構の相違を実験的に確認した。さらに、結晶構造からククミシン前駆体の活性化機構について考察した。

#### 4-2 方法

##### 4-2-1 C末端欠損プロペプチドの合成

###### 4-2-1-1 C末端欠損プロペプチドの発現系の構築

C末端7残基欠損プロペプチド (pro $\Delta$ C7) の合成のために、3-2-1で合成したcucu-pro-pET21cをテンプレートにPro-FとPro-R2 (*Hind*III サイト) プライマーを用いてTaKaRa Ex Taq polymerase (TaKaRa) でPCRを行った。得られたDNAフラグメントを制限酵素処理し、電気泳動後、抽出キットGel/PCR<sup>TM</sup>DNA Isolation System (Viogene) を用いてゲルから抽出した。DNAフラグメントを*Nde*I, *Hind*III で処理したプラスミドベクターpET28c(+) (Novagen) に導入した。cucu-pro $\Delta$ C7-pET28cをケミカル法で大腸菌BL21-Gold (DE3) pLysS (Agilent Technologies) に形質導入した。構築したプロペプチドのN末端にはHis-Tagを付加した。

使用したプライマー (下線は制限酵素サイトを示す)

Cucu-F (5'-ATGCCTCGAGATTGGATTCTGACG-3')

Pro-R2 (5'-ATGCAAGCTTTATAAAAACACAGACACCAC-3')

###### 4-2-1-2 C末端欠損プロペプチドの発現と精製

cucu-pro $\Delta$ C7-pET28c/ BL21-Gold (DE3) pLysS を3 mLのLB-カナマイシン培地でプレインキュベートし、100 mLのLB-カナマイシン培地に移植して本培養した。2時間後に1 mM IPTGを添加し、6時間発現誘導した。5,000×gで10分遠心分離後、ペレットを溶菌緩衝液 [20 mM リン酸ナトリウム (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 緩衝液 (pH 7.4) + 0.5 M NaCl] 10 mLに懸濁し、超音波破碎した。10,000 rpmで10分遠心分離し、これを再度繰り返した。プロペプチドは封入体であったため、尿素含有緩衝液 [6M 尿素 + 結合緩衝液 (溶菌緩衝液 + 10 mM イミダゾール)] 5 mLに懸濁し、4°Cで1時間可溶化した。10,000 rpmで20分遠心分離後、上清をポアサイズ0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過して可溶化画分を得た。

可溶化画分を尿素含有緩衝液で平衡化した Ni<sup>2+</sup>キレート HiTrap Chelating HP カラム (GE Healthcare) に流速 1 mL/min で添加し、尿素含有緩衝液で洗浄後、リフォールディングのため、6-0 M 尿素グラジエントをかけ、結合緩衝液で洗浄した。吸着したタンパク質は 10-500 mM イミダゾールグラジエントで溶出し、SDS-PAGE で確認した。

#### 4-2-2 C 末端ヘプタペプチドの合成

プロペプチド C 末端のヘプタペプチド H-(Asn-Glu-Met-Asn-Glu-Leu-His)-OH (C7) については Fmoc 固相合成法で合成した。

合成したペプチドは、CAPCELL PAK C18 (4.6 mm φ × 250 mm) カラム (資生堂) を用い、逆相 HPLC クロマトグラフィー [流速 1.0 mL/min, 溶出液 A (5% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA) および溶出液 B (95% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA)] で精製した。HPLC のプログラムは表 4-1 に示した。

表 4-1 C 末端ヘプタペプチド精製のための HPLC の溶出条件

	溶出液 A	溶出液 B
0 min	100%	0%
50 min	50%	50%
55 min	0%	100%

#### 4-2-3 プロペプチド変異体およびペプチドの阻害活性測定

0.2  $\mu\text{M}$  の pro $\Delta$ C7 または C7, に 10 nM の精製ククミシンを添加し, 37°C で 30 分インキュベートした。基質として 0.2 mM Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA を添加し, さらに 60 分インキュベートした後, 405 nm の吸光度を測定した。20 mM ナトリウムカリウムリン酸緩衝液 (pH 7.0) + 0.3M NaCl を濃度調製に用いた。比較のために野生型のプロペプチドについても同様の操作を行った。

#### 4-2-4 プロペプチドによる阻害ククミシンの再活性化

ククミシンを阻害するプロペプチドがククミシンや他のプロテアーゼで分解され、ククミシンが活性化するという仮説を証明するために、プロペプチド阻害ククミシンに他のプロテアーゼを添加してククミシンの活性化について検討した。用いるプロテアーゼとしては、ククミシンの基質である Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA を分解せず、ククミシンのプロペプチドを分解可能であるトリプシンを本実験に使用した。

2  $\mu\text{M}$  のプロペプチドに 0.5  $\mu\text{M}$  の精製ククミシンを添加し、37°C で 60 分インキュベートした。基質として 50  $\mu\text{M}$  の Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA を添加し、さらに 16 分インキュベートしながらペルチェ式温度コントローラーETC-505T を装備した V-550 スペクトロメーター（日本分光社）を用いて 405 nm の吸光度をモニターした。0.3  $\mu\text{M}$  ブタ由来トリプシン（和光純薬工業株式会社）を添加し、引き続き吸光度をモニターした。濃度調製には、20 mM ナトリウムカリウムリン酸緩衝液 (pH 7.0) + 0.3M NaCl を用いた。対照として、プロペプチド非添加のククミシンによる基質の分解活性をモニターし、比較した。さらに、基質とククミシンに対するトリプシンの影響を確認するため、0.5  $\mu\text{M}$  の精製ククミシンと 0.3  $\mu\text{M}$  のトリプシンの混合液で基質の分解をモニターした。

## 4-3 結果と考察

### 4-3-1 ククミシン-プロペプチド間の相互作用

第3章で解明したククミシン-プロペプチド複合体の構造は、ククミシンの基質結合部位にプロペプチドのC末端が結合し、活性サイトを塞いでいたことから、ククミシンはククミシン自身のプロペプチドで活性が阻害されると考えられた(第3章, 3-3-3-3)。しかし、複合体を形成しているククミシンとプロペプチドの結合領域は、プロペプチドのC末端とククミシンの基質結合部位だけではなく、C末端フラグメント上流のプロペプチド本体の $\beta$ シートもククミシンの平行な2本のヘリックス( $\alpha 4$ : 252-265 および $\alpha 5$ : 286-295)に結合していた(図4-1)。この2本のヘリックスは、単体のククミシンにおいて溶媒に露出する部分であるにもかかわらず、ククミシンのLeu256, Ile263, Val284, Ile289の疎水性側鎖の影響で疎水性領域になっており、プロペプチドのIle35', Tyr37', Tyr73', Phe77', Phe102'の疎水性側鎖が疎水性相互作用によって結合していた。

さらに、ククミシンとプロペプチドの間には27個もの水素結合を形成することができ、大部分が疎水性結合の周りを囲むように2本のヘリックスの両端で形成されていた(表4-2)。以上のことから、プロペプチドは疎水性領域の相互作用によってククミシンに結合し、そのことが、プロペプチドが強い阻害作用を示す理由だと考えられた。

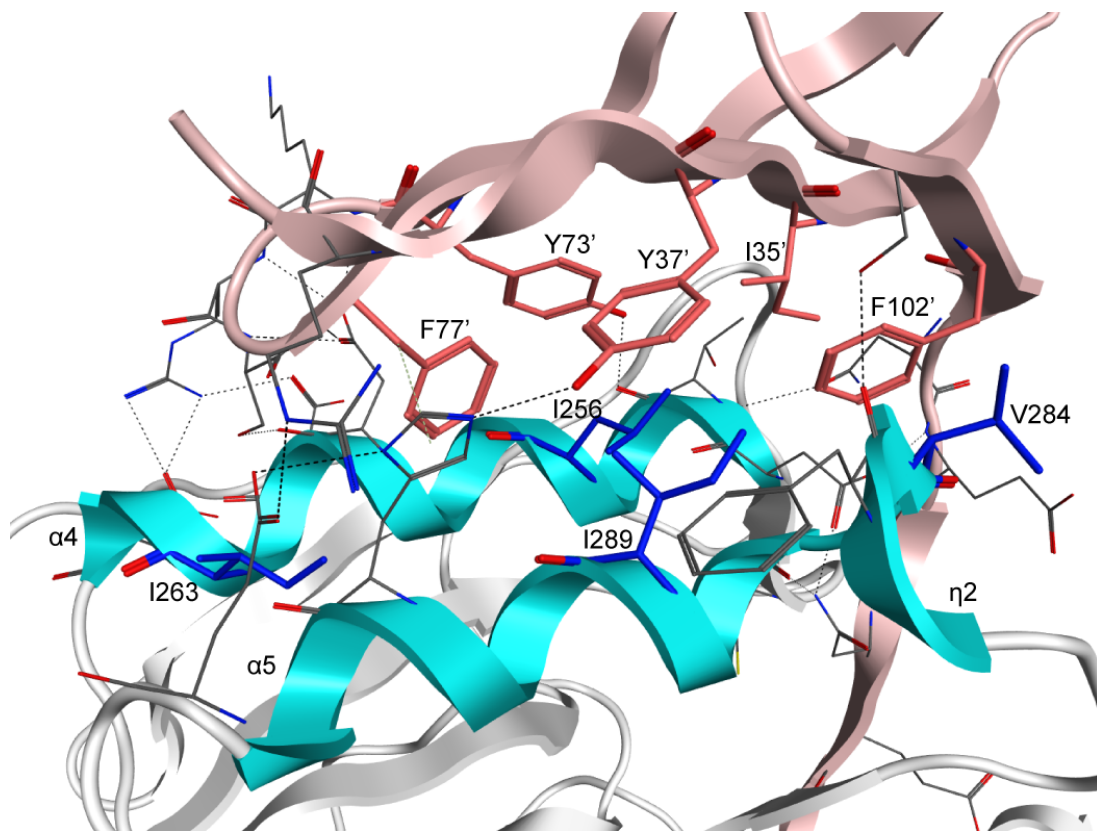


図 4-1 ククミシン-プロペプチド間の相互作用

ピンクのリボン：プロペプチド

シアンのリボン：ククミシンの $\alpha 4$  と $\alpha 5$

青のスティック：疎水性の残基

ピンクのスティック：プロペプチドの疎水性残基

黒の点線：水素結合

緑の点線：CH/ $\pi$ 相互作用

表 4-2 ククミシン-プロペプチド間の水素結合

propeptide		cucumisin	
residue	atom	residue	atom
Hydrogen bonds			
Try37'	O <sup>η</sup>	His293	N <sup>ε2</sup>
Arg40'	N <sup>ε</sup>	Glu296	O <sup>ε1</sup>
Tyr73'	O <sup>η</sup>	Thr253	O
Lys74'	N	Asp260	O <sup>δ2</sup>
Arg75'	N	260	O <sup>δ2</sup>
75'	N <sup>η1</sup>	261	O <sup>δ1</sup>
75'	N <sup>η1</sup>	265	O <sup>δ1</sup>
75'	N <sup>η2</sup>	265	O <sup>δ1</sup>
Ser76'	N	260	O <sup>δ1</sup>
76'	O <sup>γ</sup>	260	O
Phe77'	N	260	O <sup>δ1</sup>
Ser100'	O <sup>γ</sup>	Phe283	O
Asn104'	O <sup>δ1</sup>	Thr253	N
Glu105'	N	Asp252	O <sup>δ2</sup>
105'	O	252	N
Asn107'	N	Cys250	O
107'	N <sup>δ2</sup>	250	O
107'	O	250	N
107'	N <sup>δ2</sup>	Asp252	O <sup>δ1</sup>
Glu108'	N	Gly275	O
108'	O	275	N
His110'	N	Ser273	O
110'	N <sup>δ1</sup>	304	O <sup>γ</sup>
110'	O <sup>α</sup>	His204	N <sup>ε2</sup>
110'	OXT <sup>α</sup>	Ser525	O <sup>γ</sup>
110'	OXT <sup>α</sup>	525	N
110'	OXT <sup>α</sup>	Asn307	N <sup>δ2</sup>
Bridging water			
Lys41'	N	Glu296	O <sup>ε2</sup>
Ser76'	O	296	O <sup>ε2</sup>
Leu103'	O	Arg280	N <sup>η1</sup>
Glu105'	O <sup>ε2</sup>	280	N <sup>η1</sup>
Met106'	O	Ala277	N
Asn107'	O <sup>δ1</sup>	Arg280	N <sup>η2</sup>
Glu108'	O <sup>ε2</sup>	Asn307	N
His110'	O <sup>α</sup>	Ser525	O <sup>γ</sup>
110'	C <sup>δ1</sup>	304	O

Hydrogen bonds are under 3.3 Å.

<sup>α</sup> C-terminal carboxylate group

#### 4-3-2 先行研究のプロペプチド変異体との構造相関

第 1 章に記した中川らの報告における変異体実験 (26) (図 1-8) と本研究のククミシン-プロペプチド複合体の立体構造を精査した (図 4-2)。

- **cuc-pro $\Delta$ N9** ( $K_i$ : 14.7 nM)  
プロペプチドの $\alpha$ - $\beta$ サンドイッチ構造に関与しない部分であるため、阻害に影響しない。
- **cuc-pro $\Delta$ N16** ( $K_i$ : 5500 nM)  
 $\beta$ 1 がなくなるため、プロペプチドの構造が保てない。
- **cuc-pro $\Delta$ C7** ( $K_i$ : 52.6 nM)  
 $\beta$ 5 がなくなるため、活性サイトを塞げなくなる。
- **cuc-pro $\Delta$ C14** ( $K_i$ : N.I.)  
 $\beta$ 4,  $\beta$ 5 とその上流のループがなくなるため、プロペプチドの構造が保てない。
- **I33A** ( $K_i$ : 7.4 nM)  
構造に影響のない部分の変異であるため、阻害に影響しない。
- **I35A** ( $K_i$ : 9.2 nM)  
ククミシン本体と疎水性相互作用している残基であるが、1 残基変異では阻害に影響しなかった。
- **V36A** ( $K_i$ : 37.4 nM)  
プロペプチドの疎水性コアの中心残基であるため、 $\alpha$ - $\beta$ サンドイッチ構造の形成に影響した。
- **Y37A** ( $K_i$ : 9.0 nM)  
ククミシン本体と疎水性相互作用している残基であるが、1 残基変異では阻害に影響しなかった。
- **I35A/V36A/Y37A** ( $K_i$ : 200 nM)  
プロペプチドの疎水性コアの中心残基 (**Val36**) とククミシン本体と疎水性相互作用している 2 残基 (**Ile35**, **Tyr37**) であるため、プロペプチドの構造とククミシン本体との結合に大きく影響した。



- **V98A ( $K_i$ : 10.7 nM)**  
プロペプチドの疎水性コアを形成するアミノ酸であるが、1 残基変異では阻害に影響しなかった。
- **V101A ( $K_i$ : 9.9 nM)**  
プロペプチドの疎水性コアを形成するアミノ酸であるが、1 残基変異では阻害に影響しなかった。
- **V98A/V101A ( $K_i$ : 21.2 nM )**  
プロペプチドの疎水性コアを形成するアミノ酸であるため、複数残基の変異はプロペプチドの構造の保持に影響した
- **V36A/V98A/V101A ( $K_i$ : 72.5 nM)**  
プロペプチドの疎水性コアを形成するアミノ酸であるため、複数残基の変異はプロペプチドの構造の保持に影響した。

ククミシン-プロペプチドの阻害に重要とされる 2 つの疎水性領域 Asn32'-Met38'および Gly97'-Leu103'は $\beta$ 1 および 4 と上流のループに含まれており、この領域にはプロペプチドの疎水性コアを形成する残基やククミシンとの疎水性相互作用を形成する残基が含まれているため、阻害作用に影響した。

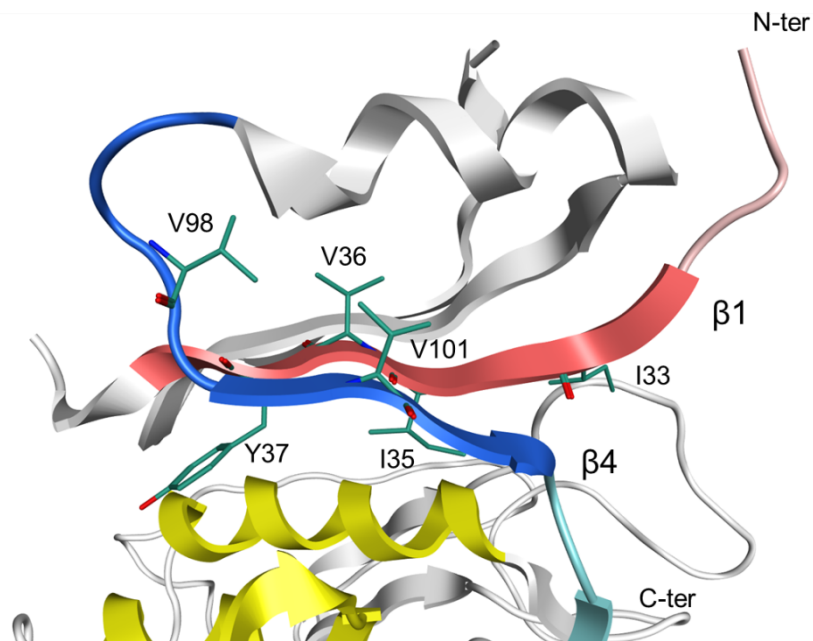


図 4-2 先行研究におけるプロペプチドの変異箇所の立体構造

ピンクのリボン：欠損された N 末端側の領域

青のリボン：欠損された C 末端側の領域

緑のスティック：変異を入れたアミノ酸残基

### 4-3-3 C末端欠損プロペプチドの合成

C末端欠損プロペプチドのアフィニティクロマトグラフィーの結果、目的タンパク質(11.4 kDa)がフラクション13から21にかけて溶出し、電気泳動的に単一に精製された(図4-3)。

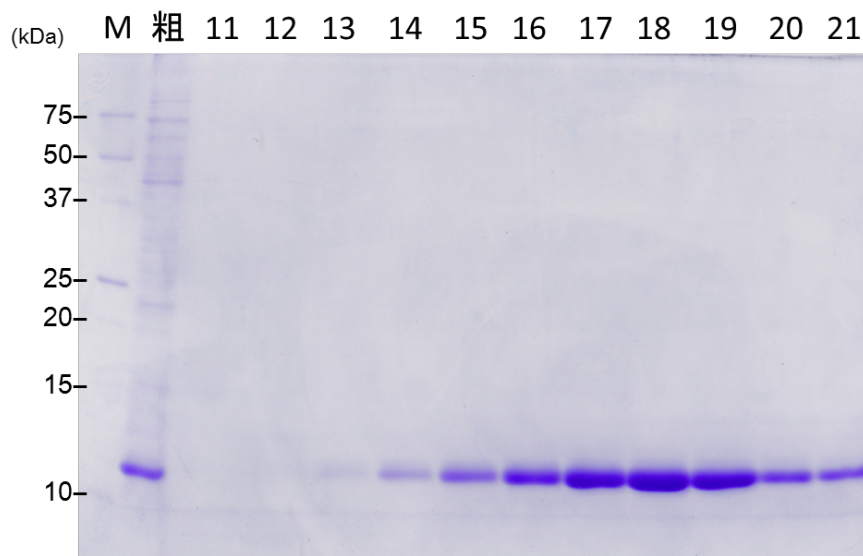


図 4-3 C末端欠損プロペプチドの精製

C末端欠損プロペプチド溶出画分の SDS-PAGE (15% アクリルアミド)

M: 分子質量マーカー

粗: 精製前の可溶化画分

数字: フラクシオンナンバー

#### 4-3-4 C末端ヘプタペプチドの合成

逆相 HPLC クロマトグラフィー分析の結果，合成および精製した C 末端ヘプタペプチド H-(Asn-Glu-Met-Asn-Glu-Leu-His)-OH (C7) は単一に精製された (図 4-4)。MALDI TOF-MS による分子量測定の結果，理論値  $[M+H]^+$  886.98 に対し，測定値 886.8 が得られた。

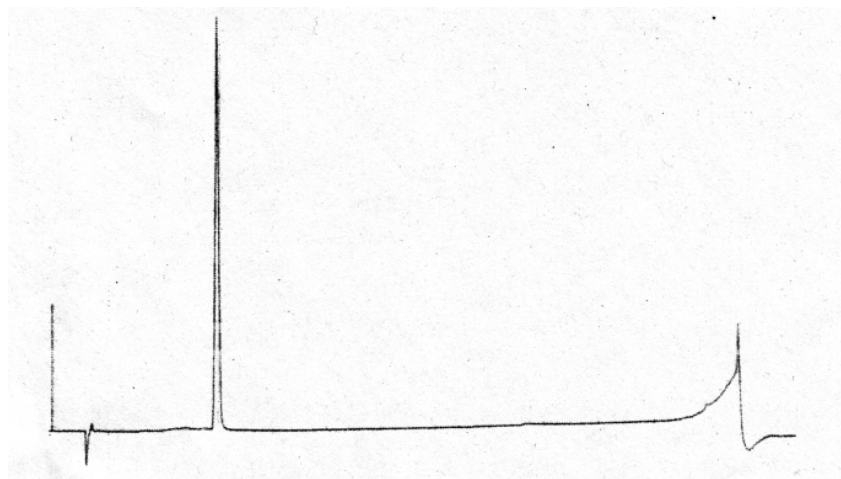


図 4-4 精製ヘプタペプチドの逆相 HPLC による分析  
カラム : CAPCELL PAK C18

#### 4-3-5 プロペプチド変異体と構造相関と阻害機構

ククミシン-プロペプチドの C 末端はククミシンの基質結合部位に充填されており、阻害に重要であると考えられるが、中川らの先行研究における C 末端 7 残基欠損プロペプチド変異体は強い阻害活性を保持したままであった。ここで、**pro $\Delta$ C7** と **C7** がククミシンの活性に影響を与えるか確認した。

その結果、野生型のプロペプチドは強い阻害活性を示したが、**pro $\Delta$ C7** では阻害活性が失われており、先行研究とは異なる結果となった。さらに、**C7** ペプチドも阻害活性を示さなかった (図 4-5)。プロペプチド変異体によるククミシンの阻害実験において、阻害活性のないペプチドがククミシンの基質となりうる点に注意する必要がある。先行研究において **pro $\Delta$ C7** が阻害活性を示した原因として、阻害活性のない **pro $\Delta$ C7** がククミシンの残存活性を検出するための蛍光基質の活性サイトへの接近を妨げ、見かけ上阻害能力のあるペプチドとして検出された可能性が考えられる。

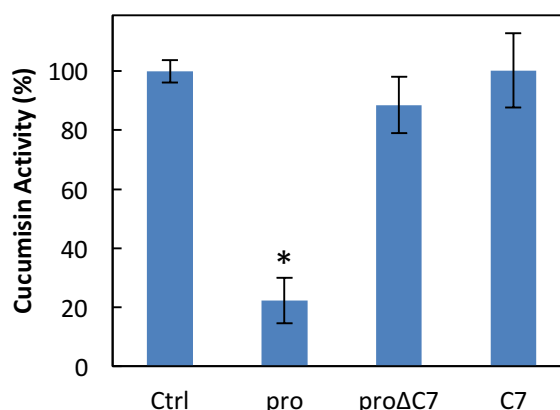


図 4-5 プロペプチド変異体によるククミシンの阻害実験

プロペプチド (**pro**), C 末端欠損プロペプチド (**pro $\Delta$ C7**), C 末端 7 残基ペプチド (**C7**) のククミシンへの影響を 0.2 mM の Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA 基質を用いて測定した。ククミシンの活性 (**Ctrl**) を 100%として相対活性を示した。試行回数  $n=4$ , \*はコントロール (**Ctrl**) に対する有意差を示した ( $p<0.01$ )。

以上のことから、プロペプチドがククミシンを強力に阻害するメカニズムは、プロペプチドの C 末端が基質結合部位および触媒サイトを塞いでいるだけでなく、プロペプチド本体がククミシンと疎水性相互作用と多数の水素結合を形成し、プロペプチドがククミシンから遊離することを困難にしているからであると結論付られた。

#### 4-4 ククミシン前駆体の活性化機構

##### 4-4-1 ククミシン前駆体の活性化機構の予測

メロン果実組織内において、ククミシン前駆体がどの段階で活性型に変化するのかわについては不明な点が多い。本研究ではククミシン-プロペプチド複合体の構造を明らかにしたが、成熟型ククミシンの N 末端とプロペプチドの C 末端は近接した関係になかった。しかし、プロペプチド C 末端の His110<sup>o</sup>がククミシンの S1 ポケットに結合していたことから、ククミシン前駆体のプロペプチドは今回得られた構造と同じ位置に結合しており、それに続くククミシン N 末端の Thr111 と触媒サイトを塞ぎ、基質の接近を抑制していると考えられる。大腸菌で発現させたオオムギプロテアーゼ BAJ93208 前駆体のプロペプチドは分子内自己分解で切断される (47)。ククミシンも分子内自己分解により His110<sup>o</sup>と Thr111 の間が切断される可能性がある。

今回得られた結晶構造からククミシンの活性化機構を予測した (図 4-6)。

- 1) プロククミシンの予想構造: 活性サイト上に His110<sup>o</sup>-Thr111 ペプチド結合が存在している。
- 2) His110-Thr111 間で自己のククミシンにより分解が起こる。
- 3) 新たにできた N 末端が 16 Å ほど移動し、短いヘリックスを形成し、ククミシン本体に収まる。この状態でククミシン-プロペプチド複合体の構造をとっており、ククミシン活性は強く阻害されている。
- 4) プロペプチドのβ1-η1の間は電子のゆらぎが大きく、前後の温度因子も非常に高く (図 3-6), 結晶構造を観察することができなかったことから、ククミシンの活性部位を塞いだ状態のプロペプチドは、よりゆらぎの大きいヘリックスやループの部分で他のククミシンやプロテアーゼにより切断を受け、ククミシンから遊離し活性型ククミシンとなる。

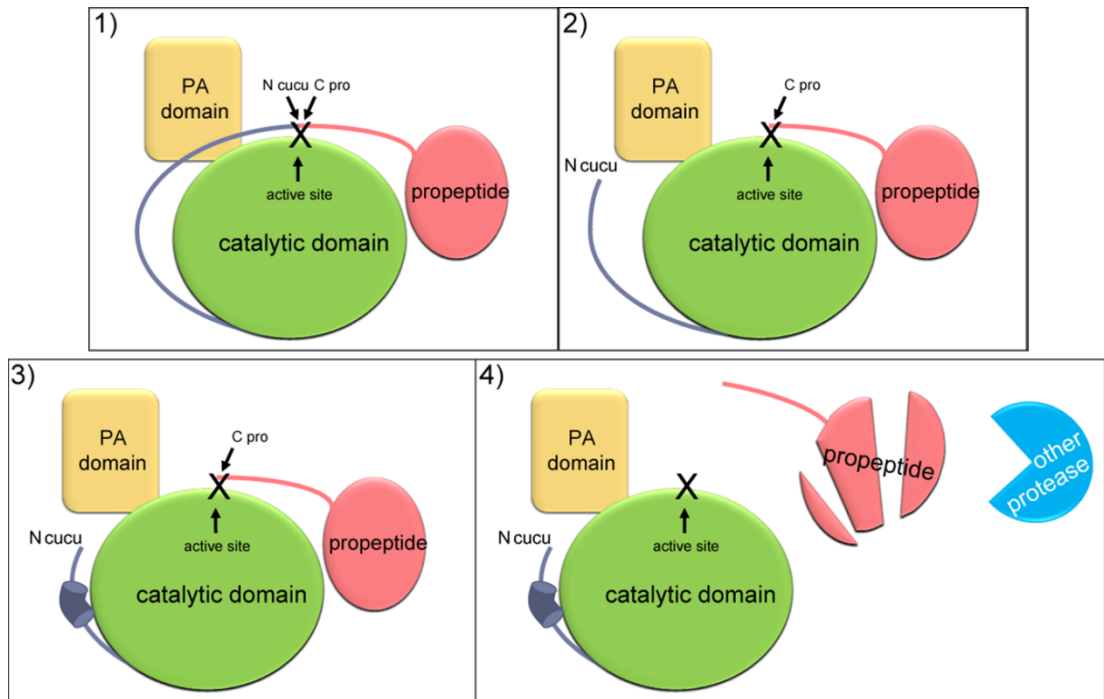


図 4-6 ククミシン前駆体の予測活性化機構のモデル

1) 成熟型ククミシンの N 末端 (N cucu) とプロペプチドの C 末端 (C pro) 間のペプチド結合が活性サイトの上を横切っている。2) 自己分解によりククミシンの N 末端ができ、3) 16 Å ほど移動して、短いヘリックスを形成する。4) 第 2 のククミシンや他のプロテアーゼによりプロペプチドの切断が起こり、活性型ククミシンができる。

#### 4-4-2 プロペプチドによる阻害ククミシンの再活性化

ククミシンを阻害しているプロペプチドがククミシンや他のプロテアーゼで分解され、ククミシンが活性化するという仮説を証明するために、プロペプチド阻害ククミシンにブタ由来トリプシンを添加した。その結果、プロペプチド非添加のククミシンの反応は10分で基質の分解が最大になったのに対し、ククミシンとトリプシンを同時に添加した場合、反応速度がわずかに遅くなった。プロペプチドの添加によりククミシンの阻害が確認できた後にトリプシンを添加すると、基質の分解が促進され、反応速度は1.7倍に上昇した (図 4-7)。

トリプシンによって基質の分解が起きないこと、トリプシンによるククミシンの活性に大きな影響がないことは事前に確認した。このことから、トリプシンはプロペプチドを分解し、ククミシンを活性化したと考えられた。また、ククミシンを阻害しているプロペプチドが他のプロテアーゼによって除去されることによってククミシンの活性化が起こる可能性があることが示唆された。



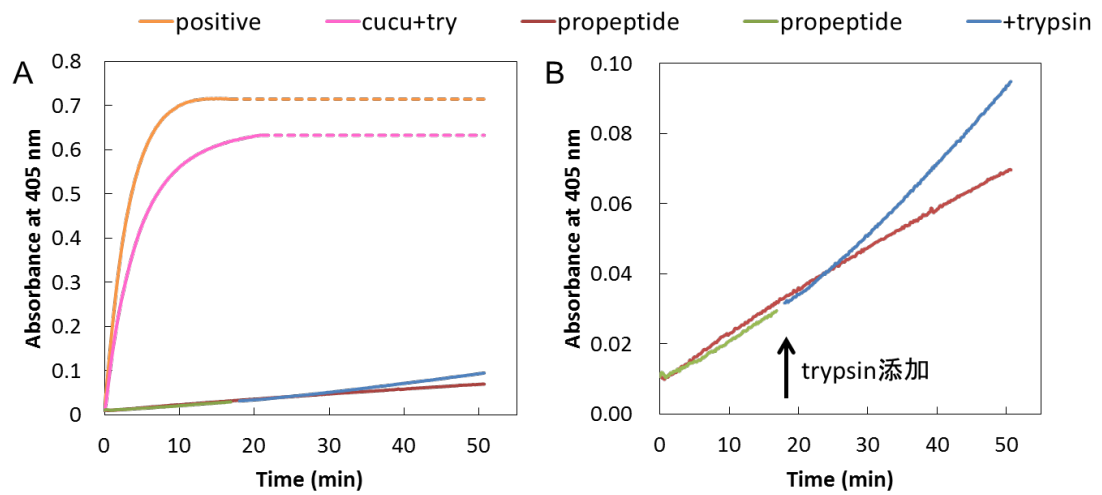


図 4-7 ククミシン-プロペプチド複合体におけるトリプシンの影響  
 positive (オレンジ) : ククミシンのみ  
 cucu+try (ピンク) : positive にトリプシンを加えたもの  
 propeptide (赤および緑) : positive にプロペプチドを加えたもの  
 +trypsin (青) : propeptide の 16 分後にトリプシンを加えたもの

## 第5章 総括

本研究では、メロン由来タンパク質分解酵素ククミシンの高度な熱安定性や基質特異性の構造的特徴の解明を目的とし、X線結晶構造解析法により成熟型ククミシンの構造決定を行った。さらにククミシンのプロペプチドによるククミシンの阻害機構や基質認識機構およびククミシン前駆体の活性化機構の解明を目的とし、無細胞系を用いて合成したプロペプチドとメロンから直接精製した成熟型ククミシンの複合体の構造をX線結晶構造解析により決定した。さらにプロペプチド変異体やペプチドを合成し、ククミシンに対する阻害活性を測定した。

第1章では、これまでの研究をもとにセリン型プロテアーゼの反応機構やククミシンの機能と特徴を述べた。生物からのタンパク質を精製するに当たって、さまざまな性質の樹脂を用いたクロマトグラフィーを行って進めた。ククミシンはDEAE樹脂を素通りさせることで夾雑物を除去することができ、引き続きCM陽イオン交換クロマトグラフィーを行うことで容易に精製することができた。ククミシンのタンパク質としての安定性は、高温に対しては70°Cまで安定で、80°Cでも活性が残存しているほど高い熱安定性を持ち、pHによる安定性への影響はほとんどなかった。ククミシンの基質特異性は、P1位にMet, Leu, Glu, Asn, Thrを好み、Gly, Ile, Proは切断せず、Asp, Glu, Arg, Lysなどの有電荷のアミノ酸は好まないという結果が得られた。ククミシンのP1位の基質特異性は広く、P2位には非極性のアミノ酸やプロリンを好んだ。

第2章では、第1章に記した方法でメロンから精製した成熟型ククミシンの結晶化と結晶構造解析と、構造に基づいたククミシンの安定性の評価を行った。結晶化したククミシンのX線結晶構造解析の結果、分解能2.75 Åまでの回折データが得られ、重原子誘導体を用いたMAD法により位相決定し、最終的に2.75 Åの分解能であった。ククミシンの結晶構造は触媒ドメイン、PAドメイン、Fn-IIIドメインの3つで構成されており、PAドメインは触媒ドメインの中ほどに挿入されていた。触媒ドメインの構造は7本のβストランドからなる大きなβシートとそれを上下から挟んだ4本のαヘリックスで典型的なサブチリシンファミリーのα/β構造をとっていた。ククミシンの熱安定性の評価は示差走査蛍光定量法を用いてククミシンの融解温度T<sub>m</sub>を測定し、結果は81.0°Cであった。この結果は、相同な構造をとっていたトマト由来SBT3や細菌由来のサブチリシンBPN'よりも10°C以上も高く、ククミシンは分子的に安定であることが示された。ククミシンの結晶構造をもとに、細菌性サブチリシンの安定性に寄与するカルシウム結合部位に相当する構造の安定化やジスルフィド結合の数、芳香族アミノ酸、有電荷のアミノ酸、プロリン、グリシンの分布からククミシンの安定性について議論した。ククミシンはサブチリシンのカルシウム結合部位に相同なループ領域で、カルシウムイオンに代わりリシンの側鎖の正電荷を中心とした周辺のアミノ酸との水素結合で安定化していた。サブチリシンBPN'にはジスルフィド結合は存在しないが、ククミシンには4対存在しており安定性に寄与していた。さらに、安定性に寄与すると考えられている芳香族アミノ酸、有電荷アミノ酸、プロリンの割合も、サブチリシンBPN'より高かった。また、自由度が高く安定化に寄与しないグリシンの割合は低かった。

第3章では、ククミシンを阻害する自身のプロペプチドを合成し、ククミシンとの複合体の結晶化と結晶構造解析を行い、その結果得られた構造をもとにしてククミシンのサブサイト、基質特異性を考察した。野生型プロペプチドは無細胞発現系で発現させ、結晶化に適した純度に精製した。ククミシン-プロペプチド複合体のX線結晶構造解析の結果、分解能1.95 Åまでの回折データが得られ、第2章で得たククミシンの結晶構造の座標をモデルに分子置換法で構造決定を行った。ククミシン-プロペプチド複合体の構造は植物セリン型プロテアーゼとしては初の報告である。ククミシン-プロペプチド複合体はククミシンの活性サイトにプロペプチドのC末端が挿入している形で結合しており、プロペプチドは4本のβストランドからなる逆平行のβシートと2本のヘリックスとC末端のフラグメントで構成されていた。

プロペプチドは成熟型のククミシンの活性を阻害するが、DFPのような不可逆的な合成阻害剤とは異なり、基質と同様に作用していたため、ククミシンのサブサイトを特定することができ、基質特異性の構造相関が解析できた。サブサイト1は広く深いポケットであり、主に極性非電荷のアミノ酸が分布していたことから、極性非電荷のアミノ酸を好み、有電荷のアミノ酸は好まないという基質特異性の結果に一致した。また、オキシアニオンホールペアのAsn307がポケットの入口付近に位置しており、立体障害によって、β炭素から枝分かれしているアミノ酸も好まないと考えられる。この点においてもククミシンの基質特異性の特徴と一致していた。

第4章では、第3章で得たククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造とプロペプチド変異体および合成ペプチドによるククミシンの阻害実験からプロペプチドによる阻害機構について議論した。さらにククミシン前駆体の活性化機構を議論した。

ククミシン-プロペプチド間の相互作用を精査すると、プロペプチドのC末端がククミシンの活性サイトを塞いでおり、ククミシン-プロペプチド間に疎水性相互作用と多くの水素結合が形成されていたことから、プロペプチドはククミシンの活性を阻害したと考えられる。

また、プロペプチドのC末端がS1ポケットに結合していたことから、前駆体であるプロククミシンの構造を予想することができた。ククミシン前駆体は分子内自己分解でプロペプチドのC末端とククミシンのN末端の間を切断して、今回得られた複合体の構造に至ると考えられる。さらに、プロペプチドで阻害されているククミシンをトリプシンで再活性化することができたことから、すでに活性化されているククミシンやその他プロテアーゼによりプロペプチドが分解されてククミシンの活性化が起こる可能性が示唆された。

植物由来プロテアーゼの構造解析の報告はまだ少ない。本研究が、他の植物セリン型プロテアーゼの機能解析のための基礎となり、今後、植物組織内でのプロテアーゼの役割や反応経路の解明につながることを期待したい。

## 記号・略号

### アミノ酸の略号

略号		英語表記	日本語表記
1文字	3文字		
A	Ala	Alanine	アラニン
R	Arg	Arginine	アルギニン
N	Asn	Asparagine	アスパラギン
D	Asp	Aspartic Acid	アスパラギン酸
C	Cys	Cysteine	システイン
Q	Gln	Glutamine	グルタミン
E	Glu	Glutamic Acid	グルタミン酸
G	Gly	Glycine	グリシン
H	His	Histidine	ヒスチジン
I	Ile	Isoleucine	イソロイシン
L	Leu	Leucine	ロイシン
K	Lys	Lysine	リシン
M	Met	Methionine	メチオニン
F	Phe	Phenylalanine	フェニルアラニン
P	Pro	Proline	プロリン
S	Ser	Serine	セリン
T	Thr	Threonine	トレオニン
W	Trp	Tryptophan	トリプトファン
Y	Tyr	Tyrosine	チロシン
V	Val	Valine	バリン

## その他の略号

略号	英語表記	日本語表記, 意味
<b>DFP</b>	diisopropyl fluoro phosphate	ジイソプロピルフルオロリン酸
<b>PMSF</b>	phenylmethylsulfonyl fluoride	フッ化フェニルメチルスルホニル
<b>STI</b>	soybean trypsin inhibitor	大豆トリプシン阻害剤
<b>RNA</b>	ribonucleic acid	リボ核酸
<b>mRNA</b>	messenger RNA	伝令 RNA
<b>TCA</b>	trichloroacetic acid	トリクロロ酢酸
<b>DEAE</b>	diethylaminoethyl	ジエチルアミノエチル
<b>CM</b>	carboxymethyl	カルボキシメチル
<b>CBB</b>	coomassie brilliant blue	クーマシーブリリアントブルー
<b>Suc</b>	Succinyl	スクシニル
<b>Glt</b>	Glutaryl	グルタリル
<b>pNA</b>	p-nitroaniline	パラニトロアニリン
<b>DTT</b>	dithiothreitol	ジチオトレイトール
<b>Hepes</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動
<b>MAD</b>	multi-wavelength anomalous dispersion	多波長異常分散
<b>PDB</b>	Protein Data Bank	プロテインデータベース
<b>RMSD</b>	root mean square deviation	平均二乗偏差
<b>PA</b>	protease-associated	プロテアーゼ関連
<b>Fn</b>	fibronectin	フィブロネクチン
<b>DSF</b>	Differential Scanning Fluorimetry	示差走査蛍光定量法
<b>Tm</b>	Melting temperature	変性中点温度 (融解温度)
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応法
<b>ROX</b>	Rhodamine Red X	ローダミンレッド X
<b>AGPC</b>	acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform	酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム
<b>RNase</b>	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
<b>CIA</b>	chloroform-isoamyl alcohol	クロロホルムイソアミルアルコール
<b>DEPC</b>	diethylpyrocarbonate	ジエチルピロカーボネート
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
<b>cDNA</b>	complementary DNA	相補的 DNA
<b>LB</b>	Luria-Bertani	ルリア-ベルターニ
<b>IPTG</b>	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	イソプロピルチオガラクトシド
<b>Fmoc</b>	9-fluorenylmethyloxycarbonyl	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
<b>TFA</b>	trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
<b>MALDI</b>	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
<b>TOF-MS</b>	Time of Flight Mass Spectrometry	飛行時間型質量分析法
<b>TCEP</b>	tris(2-carboxyethyl)phosphine	トリス(2-カルボキシエチル)

		ホスフィン
<b>Bis-Tris</b>	2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol	2-[ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール
<b>MR</b>	molecular replacement	分子置換

## 参考論文

1. 長谷川 慎, 石水 毅, 有馬 一成, 前田 衣織 (2014) *生体高分子の基礎: はじめてのバイオ分子化学*, 実教出版株式会社
2. Kaneda, M. a. T., N. (1975) Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *Journal of Biochemistry* **78**, 1287-1296
3. Kaneda, M., Ohmine, H., Yonezawa, H., and Tominaga, N. (1984) Amino acid sequence around the reactive serine of cucumisin from melon fruit. *J. Biochem.* **95**, 825-829
4. Yamagata, H., Ueno, S., and Iwasaki, T. (1989) Isolation and characterization of a possible native cucumisin from developing melon fruits and its limited autolysis to cucumisin. *Agricultural and biological chemistry* **53**, 1009-1017
5. Uchikoba, T., Yonezawa, H., and Kaneda, M. (1995) Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. *J. Biochem.* **117**, 1126-1130
6. Yamagata, H., Masuzawa, T., Nagaoka, Y., Ohnishi, T., and Iwasaki, T. (1994) Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *J. Biol. Chem.* **269**, 32725-32731
7. Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., and Barrett, A. J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D320-325
8. Choi, J. W., Kimi, G. B., Huh, Y. C., Kwon, M. R., Mok, I. G., Kim, J. W., Lee, T. S., Kim, S., and Im, K. H. (2004) Cloning of genes differentially expressed during the initial stage of fruit development in melon (*Cucumis melo* cv. Reticulatus). *Mol. Cells* **17**, 237-241
9. Cuesta-Herranz, J., Pastor, C., Figueredo, E., Vidarte, L., De las Heras, M., Duran, C., Fernandez-Caldas, E., de Miguel, J., and Vivanco, F. (2003) Identification of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 827-833
10. Kunitz, M. (1947) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor : II. General Properties. *J Gen Physiol* **30**, 291-310
11. Kaneda, M., Yonezawa, H., and Uchikoba, T. (1995) Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22 ( Pt 2)**, 215-222
12. Yonezawa, H., Kaizuka, H., Uchikoba, T., Arima, K., and Kaneda, M. (2000) Substrate specificity of cucumisin on synthetic peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2104-2108
13. Arima, K., Yonezawa, H., Uchikoba, T., Shimada, M., and Kaneda, M. (2000) Cleavage specificity of cucumisin, a serine protease, with synthetic substrates. *Phytochemistry* **54**, 451-454
14. Yonezawa, H., Uchikoba, T., and Kaneda, M. (1997) Substrate specificity of honeydew melon protease D, a plant serine endopeptidase. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1277-1280



15. Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H. D., and Garten, W. (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell Biol.* **127**, 1829-1842
16. Nebes, V. L., and Jones, E. W. (1991) Activation of the proteinase B precursor of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by autocatalysis and by an internal sequence. *J. Biol. Chem.* **266**, 22851-22857
17. Power, S. D., Adams, R. M., and Wells, J. A. (1986) Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3096-3100
18. Baker, D., Silen, J. L., and Agard, D. A. (1992) Protease pro region required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. *Proteins* **12**, 339-344
19. Baker, D., Sohl, J. L., and Agard, D. A. (1992) A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature* **356**, 263-265
20. Marie-Claire, C., Yabuta, Y., Suefuji, K., Matsuzawa, H., and Shinde, U. (2001) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: the structural and functional characterization of the aqualysin I propeptide. *J Mol Biol* **305**, 151-165
21. Smith, S. M., and Gottesman, M. M. (1989) Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 20487-20495
22. Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A., and Roques, B. P. (1999) The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **285**, 1911-1915
23. Zhu, X. L., Ohta, Y., Jordan, F., and Inouye, M. (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* **339**, 483-484
24. Gallagher, T., Gilliland, G., Wang, L., and Bryan, P. (1995) The prosegment-subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific 'foldase'. *Structure* **3**, 907-914
25. Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, B. M., Pfannstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A., and Schaller, A. (2009) The protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SISBT3). *J. Biol. Chem.* **284**, 14068-14078
26. Nakagawa, M., Ueyama, M., Tsuruta, H., Uno, T., Kanamaru, K., Mikami, B., and Yamagata, H. (2010) Functional analysis of the cucumisin propeptide as a potent inhibitor of its mature enzyme. *J. Biol. Chem.* **285**, 29797-29807
27. Otwinowski, Z. M., W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**, 307-326
28. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 849-861
29. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved Methods for

- Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallogr., A, Found. Crystallogr.* **47**, 110-119
30. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography.* **54**, 905-921
  31. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501
  32. Holm, L., and Rosenstrom, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research* **38**, W545-W549
  33. Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., and Schaller, A. (2009) Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17223-17228
  34. Bryan, P. N., Rollence, M. L., Pantoliano, M. W., Wood, J., Finzel, B. C., Gilliland, G. L., Howard, A. J., and Poulos, T. L. (1986) Proteases of enhanced stability: characterization of a thermostable variant of subtilisin. *Proteins* **1**, 326-334
  35. Smith, C. A., Toogood, H. S., Baker, H. M., Daniel, R. M., and Baker, E. N. (1999) Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: The crystal structure of *Bacillus* Ak.1 protease at 1.8 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1027-1040
  36. Gallagher, T., Bryan, P., and Gilliland, G. L. (1993) Calcium-Independent Subtilisin by Design. *Proteins-Structure Function and Genetics* **16**, 205-213
  37. Matsumura, M., Signor, G., and Matthews, B. W. (1989) Substantial Increase of Protein Stability by Multiple Disulfide Bonds. *Nature* **342**, 291-293
  38. Cambillau, C., and Claverie, J. M. (2000) Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* **275**, 32383-32386
  39. Tanaka, T., Sawano, M., Ogasahara, K., Sakaguchi, Y., Bagautdinov, B., Katoh, E., Kuroishi, C., Shinkai, A., Yokoyama, S., and Yutani, K. (2006) Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150 degrees C. *Febs Letters* **580**, 4224-4230
  40. Prajapati, R. S., Das, M., Sreeramulu, S., Sirajuddin, M., Srinivasan, S., Krishnamurthy, V., Ranjani, R., Ramakrishnan, C., and Varadarajan, R. (2007) Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **66**, 480-491
  41. Vieille, C., and Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1-43
  42. Matthews, B. W., Nicholson, H., and Becktel, W. J. (1987) Enhanced Protein Thermostability from Site-Directed Mutations That Decrease the Entropy of Unfolding. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 6663-6667

43. Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., and Yokoyama, S. (2004) Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J Struct Funct Genomics* **5**, 63-68
44. Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763
45. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., and Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* **3**, 1171-1179
46. Jia, Y., Cao, X. H., Deng, Y., Bao, W., Tang, C. Y., Ding, H. J., Zheng, Z. L., and Zou, G. L. (2014) Four residues of propeptide are essential for precursor folding of nattokinase. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **46**, 957-964
47. Plattner, S., Gruber, C., Altmann, F., and Bohlmann, H. (2014) Self-processing of a barley subtilase expressed in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* **101**, 76-83

## 研究業績

### 主論文

- Kazutaka Murayama, Miyuki Kato-Murayama, Toshiaki Hosaka, Ami Sotokawauchi, Shigeyuki Yokoyama, Kazunari Arima\*, and Mikako Shirouzu\*\*. Crystal Structure of Cucumisin, a Subtilisin-Like Endoprotease from *Cucumis melo* L. *Journal of Molecular Biology*. 2012; 423 (3): 386-396
- Ami Sotokawauchi, Miyuki Kato-Murayama, Kazutaka Murayama, Toshiaki Hosaka, Iori Maeda, Michio Onjo, Noboru Ohsawa, Dai-ichiro Kato, Kazunari Arima\*, and Mikako Shirouzu\*\*. Structural Basis of Cucumisin Protease Activity Regulation by Its Propeptide. *Journal of Biochemistry*. Accept (27-Jul-2016)

### 学会報告

- 村山和隆, 村山-加藤美幸, 保坂俊彰, 外川内亜美, 横山茂之, 有馬一成, 白水美香子, メロン由来セリン型プロテアーゼククミシンの結晶構造, 平成 24 年度 日本結晶学会 年会および総会, 宮城県, 10 月・2012 年 (ポスター発表)
- 外川内亜美, 村山和隆, 村山 (加藤) 美幸, 保坂俊彰, 小野美香, 渡邊法子, 前田衣織, 横山茂之, 白水美香子, 有馬一成, タンパク質分解酵素ククミシンの結晶構造と阻害ペプチドの結合解析, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡県, 12 月・2012 年 (ポスター発表)
- Shuuichi Nakaya, Ami Sotokawauchi, Yohei Kamijyo, Kazutaka Murayama, Kazunari Arima, Glycosylation analysis of Cucumisin, a Subtilisin-Like serine protease from *Cucumis melo* L. using MALDI-QIT-TOF MS, 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry, Minneapolis, June, 2013 (poster)
- 小野美香, 稲富太志, 渡邊法子, 外川内亜美, 有馬一成, 前田衣織, 機能解析を目的としたククミシン阻害ペプチドの合成, 第 50 回化学関連支部合同九州大会, 福岡県, 7 月・2013 年 (ポスター発表)
- 黒木隆生, 岩下和樹, 瀬戸上徹, 上條陽平, 外川内亜美, 伊東祐二, 有馬一成, オオイタビ (*Ficus Pumila*) 乳液由来プロテアーゼの構造解析, 2013 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部講演会, 広島, 9 月・2013 年 (口頭発表)
- 小倉梨那, 高山亜衣, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, アコウ (*Ficus surperb* var. *japonica*) 乳液由来プロテアーゼの構造解析, 2013 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部講演会, 広島, 9 月・2013 年 (口頭発表)
- 中村信孝, 赤瀬優也, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, イヌビワ (*Ficus erecta* Thunb.) 由来セリン型プロテアーゼの精製と性質, 2013 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部講演会, 広島, 9 月・2013 年 (口頭発表)

- 外川内亜美, 村山和隆, 村山 (加藤) 美幸, 保坂俊彰, 前田衣織, 伊東祐二, 横山茂之, 白水美香子, 有馬一成, メロン由来プロテアーゼであるククミシンとそのプロペプチド複合体の構造, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀, 9 月・2014 年 (口頭発表)
- 黒木隆生, 瀬戸上徹, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) 乳液由来プロテアーゼの一次構造解析, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀, 9 月・2014 年 (口頭発表)
- 小峯卓士, 小倉梨那, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, アコウ (*Ficus superba* var. *japonica*) 乳液由来プロテアーゼの性質, 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀, 9 月・2014 年 (口頭発表)
- 外川内亜美, 村山和隆, 村山 (加藤) 美幸, 保坂俊彰, 伊東祐二, 横山茂之, 白水美香子, 有馬一成, タンパク質分解酵素ククミシン-プロペプチド複合体の結晶構造, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10 月・2014 年 (ポスター発表)
- 下長奏介, 中村信孝, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, 山口泰平, コレステロール誘導体を用いた Intermedilysin のコレステロール認識機構の解析, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10 月・2014 年 (ポスター発表)
- 黒木隆生, 瀬戸上徹, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, サツマイモ (*Ipomoea batatas* L.) 乳液由来プロテアーゼの精製と遺伝子解析, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10 月・2014 年 (ポスター発表)
- 小峯卓士, 小倉梨那, 外川内亜美, 上條陽平, 伊東祐二, 有馬一成, アコウ (*Ficus superba* var. *japonica*) 乳液由来新規プロテアーゼの精製と性質, 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 10 月・2014 年 (ポスター発表)
- Ami Sotokawauchi, Kazutaka Murayama, Miyuki Kato-Murayama, Toshiaki Hosaka, Ito Yuji, Shigeyuki Yokoyama, Shirouzu Mikako and Kazunari Arima, Purification, Characterization and Crystal Structure of Proteolytic Enzyme Cucumisin, Protein Discovery Summit 2014-2nd Protein Expression, Purification & Characterization Conference, Boston, October, 2014 (poster)
- Takao Kuroki, Tetsu Setoue, Ami Sotokawauchi, Yohei Kamijo, Michio Onjo, Yuji Ito, Kazunari Arima, Purification and characterization of a protease in latex of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), Protein Discovery Summit 2014-2nd Protein Expression, Purification & Characterization Conference, Boston, October, 2014 (poster)
- Takahito Komine, Rina Ogura, Ami Sotokawauchi, Yohey Kamijo, Michio Onjo, Yuji Ito, Kazunari Arima, Purification and characterization of novel protease from latex of Banyan tree (*Ficus superba* var. *japonica*), Protein Discovery Summit 2014-2nd Protein Expression, Purification & Characterization Conference, Boston, October, 2014 (poster)
- 外川内亜美, 村山 (加藤) 美幸, 村山和隆, 保坂俊彰, 前田衣織, 遠城道雄, 大沢登, 加藤太一郎, 有馬一成, 白水美香子, タンパク質分解酵素ククミシンとそのプロペプチ

ド複合体の結晶構造解析, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島, 5 月・2016 年 (ポスター発表)

- 下長奏介, 中村信孝, 外川内亜美, 上條陽平, 有馬一成, 山口泰平, *Streptococcus intermedius* が産生する溶血毒素 *Intermedilysin* のコレステロール認識機構の解析, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島, 5 月・2016 年 (ポスター発表)
- 宅野美月, 尾辻由衣, 外川内亜美, 上條陽平, 有馬一成, アコウ (*Ficus superba*) 乳液由来プロテアーゼの精製と性質, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島, 5 月・2016 年 (ポスター発表)
- 中溝瑛久, 外川内亜美, 上條陽平, 有馬一成, オオカラスウリ (*Trichosanthes bracteata*) 果実由来ククミシン様プロテアーゼの構造と機能解析, 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島, 5 月・2016 年 (ポスター発表)

## 謝辞

本論文は、鹿児島大学大学院理工学研究科システム情報科学専攻博士後期課程有機生化学講座タンパク質化学研究室に在学中の研究をまとめたものである。

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多大なご支援とご指導を賜りました、指導教員である准教授・有馬一成先生に深く感謝申し上げます。学部1年生の時より担任していただき、有馬研究室に配属されてからも卒業論文、修士論文、学位論文と10年もの歳月を指導していただきました。人間としても研究者としても至らない私に辛抱強く指導して下さいましたこと、日本国内外さまざまな土地へ学会や出張に同行させていただいた経験は今後の人生の糧となります。

また、大変お忙しい中、副査として熱くご指導いただきました、教授・伊東祐二先生、ならびに内海俊樹先生、准教授・濱田季之先生に心より感謝申し上げます。さらに、共同研究において、タンパク質の結晶化、X線結晶構造解析でご協力とご指導を賜りました国立研究開発法人理化学研究所の横山茂之先生、白水美香子先生、東北大学医工学研究科の准教授・村山和隆先生、ペプチド合成でご協力いただいた九州工業大学情報工学研究院の准教授・前田衣織先生、研究機器の提供、ご指導をいただいた株式会社バイタルリソース応用研究所所長（九州工業大学名誉教授）・岡元孝二様、研究員・畠中登志也様、研究材料の提供いただいた、ヒノン農業株式会社社長・影山雅也様に心より感謝申し上げます。

そして、研究室生活の苦楽を共にした多数の先輩、同期、後輩の皆様のおかげで、かけがえのない充実した時間を過ごすことができましたこと、感謝申し上げます。

最後に、博士課程に進学する機会を与えて下さり、私を温かく見守り、辛抱強く支援し続けてくれた両親・家族に深く感謝いたします。

ここに重ねて厚く謝意を表し、謝辞といたします。

平成28年9月  
外川内 亜美