

微生物酵素の生化学的及び構造生物学的研究と医療への応用

芳本 忠

Biochemistry and Structural Biology of Microbial Enzymes and their Medical Applications

Tadashi YOSHIMOTO

Department of Molecular Medicinal Sciences, Division of Biotechnology, Nagasaki University,
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki City 852-8521, Japan

(Received March 22, 2007)

Microbial enzymes were studied from two medicinal viewpoints. First, we examined proline-specific peptidases from pathogenic microorganisms. We found several proline-specific peptidases in pathogenic bacteria. Among them, prolyl tripeptidyl aminopeptidase from *Porphyomonas gingivalis* and prolyl aminopeptidase from *Serratia marcescens* were crystallized. The complex structures of those enzymes and inhibitors were clarified in X-ray crystallography. Aminopeptidase N, which has wide specificity for amino acids, was distributed in the pathogens. The crystal structure of the aminopeptidase N elucidated the reasons for its wide substrate specificity but inertness to the X-Pro bond. It was also revealed that proline-specific peptidases and aminopeptidase N cooperatively degrade collagen for the uptake of amino acids as nutrition when these bacteria infect cells. Second, we applied enzymes from microorganisms to diagnostic analyses. We found a series of creatinine-metabolizing enzymes in *Pseudomonas putida*. Creatininase, creatinase, and sarcosine oxidase were coupled and have been developed for a diagnostic analysis kit that examines renal function. The structures of the native and the Mn^{2+} -activated creatininases were determined in X-ray crystallography. Based on the structure, the activated enzyme was used for an improved assay kit. The structure of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas fragi* was also clarified in crystallography. The enzyme is useful for diagnostic analysis of diabetes mellitus while monitoring ketone bodies.

Key words—structural biology; proline-specific peptidase; microbial enzyme; diagnostic analysis

1. はじめに

近年、新興・再興感染症や抗生物質多剤耐性などの出現が大きな問題となり、抗生物質とは異なる新規治療薬の開発が求められている。われわれはコラーゲンのプロリンに注目し、病原菌の持つプロリン特異的分解酵素の研究を行った。一方、微生物酵素の多様性は臨床診断に有用な面を持ち、診断薬として医療への実用化の研究を行った。

タンパク質分解酵素は生体内で重要な働きをしており、生命科学の基礎から医薬品まで幅広い研究が行われている。筆者はポストプロリン切断酵素¹⁾の研究から始まり、種々のプロリンに特異性を持つペプチダーゼの研究に発展してきた。最初、ほ乳動物

由来のプロリン特異性酵素を主に研究していたが、研究を進めて行く中で病原菌が同様の酵素を持つこと、それめかなり高い活性を共通して持つことを見出し、プロリンのユニークな性質と合わせ分解機構解析から新研究領域を開いてきた。

酵素の基質特異性の高さは分析試薬としての有用性があり色々な測定系が開発されてきた。われわれはクレアチニンの測定法の新規開発から始めた。²⁾クレアチニンはピクリン酸を用いた化学法は非常に簡便であるが、爆薬にも使われた化合物であること、他の生体物質とも反応し精度に問題がある。そのため、酵素法の開発を行い、実用化に成功した。これを最初に種々の測定系を開発してきた。これらの研究は遺伝子組換え法のみならず X 線結晶構造解析法を導入したことで発展できた。

2. ペプチド分解へのプロリン特異性ペプチダーゼの役割

プロリンは他のアミノ酸とは異なり、環状の構造

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系薬品生物工学 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

e-mail: yosimoto@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

を持つことから自由度が少なく特異な性質を示し、シスとトランスの構造をとることが知られている。そのため、タンパク質中にプロリンが存在すると折れ曲がった構造となり、活性部位などの空間を形成したりするのに重要な役割を持っている。またプロリンを多く含むタンパク質としてコラーゲンが知られている。コラーゲンは-(Gly-X-Pro) n -の配列を持ち、3重らせん構造をとり、柔軟で強靱な物性を示し、表皮や血管などの重要な構成成分となっている。興味あることに、プロリンの4位の位置がプロリン水酸化酵素により水酸化されるとヒドロキシプロリンとなる。血管壁を構成するタイプ III のコラーゲンはこのヒドロキシプロリンを多く含み、コラーゲンの3重らせんをより強固にしているとされている。このコラーゲンの水酸化反応にビタミンCが補酵素として必要である。壊血病はビタミンC不足によりプロリンの水酸化が進まず、弱いコラーゲンとなり、血管壁から出血を起こす病気である。一方で、このようなプロリンの性質から、多くのプロテアーゼやペプチダーゼは-X-Pro-やその周辺には作用し難いことが知られている。そのため、生理活性ペプチドの多くはプロリンを含みペプチダーゼからの分解を防御していると考えられている。また、タンパク質の耐熱性について色々な機構があるが、ある種のタンパク質では含まれるプロリンの数と耐熱性の相関を示す報告がある。このようにプロリンは特異なアミノ酸である。

ヒトの子宮にオキシトシン分解酵素として prolyl oligopeptidase (ポストプロリン切断酵素) が Walter によって見出され、共同研究として子羊腎臓から酵素を精製しセリン酵素として性質を初めて明らかにした。^{1,3)} 酵素の高感度合成基質を開発することで生体内に広く分布することや、⁴⁾ dipeptidyl aminopeptidase IV とは異なる酵素であることが明らかになった。⁵⁾ 分子量が8万近くでアミノ酸配列の決定が不可能と思われていたが、遺伝子組換え技術の発展で、塩基配列を決定することができた。^{6,7)} ちょうど大腸菌の protease II についても研究していたが、trypsin と基質特異性が同じで、塩基性アミノ酸を認識しカルボキシル側を特異的に切断する酵素である。しかし、trypsin と異なり低分子基質にしか作用できず、oligopeptidase B と呼ばれている。この酵素についても遺伝子の塩基配列の決定を

行っていた。⁸⁾ 興味あることに、prolyl oligopeptidase は oligopeptidase B と⁸⁾アミノ酸配列のホモロジーがあることを見出した。さらに、dipeptidyl aminopeptidase IV⁹⁾ や acylaminoacyl-peptidase¹⁰⁾ とアミノ酸配列のホモロジーがあることが報告された。特に、配列のカルボキシル末端側に高いホモロジーがみられ、この部分にセリン酵素の触媒3残基 (Ser, His, Asp) が存在した。¹¹⁾

3. 感染菌の持つプロリン特異性ペプチダーゼ類の研究

プロリン特異性ペプチダーゼに特異的な合成基質を開発し、⁵⁾ 広く微生物をスクリーニングした結果、興味あることに日和見感染症などの病原菌が高い酵素活性を持つことを見出した (Fig. 1)。それらは新生児髄膜炎、敗血症、骨髄炎、心内膜炎、呼吸器感染症など院内感染を起こし、その抗生物質耐性が問題となっている。*Chryseobacterium* (旧名 *Flavobacterium*) *meningosepticum* は病弱な乳幼児に感染し敗血症や脳膜炎を起こす。*Aeromonas hydrophila* は水性菌でヒトに日和見感染する。両菌の由来のプロリルオリゴペプチダーゼをクローニングしてきた。¹²⁻¹⁴⁾ *Stenotrophomonas* (旧名 *Xanthomonas*) *maltophilia* の dipeptidyl aminopeptidase IV,¹⁵⁾ *C. meningosepticum*,¹⁶⁾ *Aeromonas sobria*,¹⁷⁾ *Serratia marcescens*¹⁸⁾ の prolyl aminopeptidase の酵素遺伝子をクローニングし動植物からの酵素とともに、トリプシン・ファミリーやズブチリシン・ファミリーとは異なる新しいプロリルオリゴペプチダーゼ・ファミリーの存在を明らかにした。上述のごとく、塩基性アミノ酸に特異的な oligopeptidase B (protease II) もこのファミリーに含まれる。得られた酵素遺伝子を大腸菌で過剰発現させ酵素を単一に精製し、いくつかの酵素について結晶化に成功した。

3-1. 歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 由



芳本 忠

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授。1945年奈良生まれ。大阪市立大学大学院修士課程修了。1973年長崎大学薬学部講師、1974年助教授、1994年教授。この間イリノイ大学医学部に留学。1991年日本薬学会奨励賞受賞。10年程前より酵素の生化学的研究にX線結晶解析法を加え学術貢献賞受賞の研究とな

った。

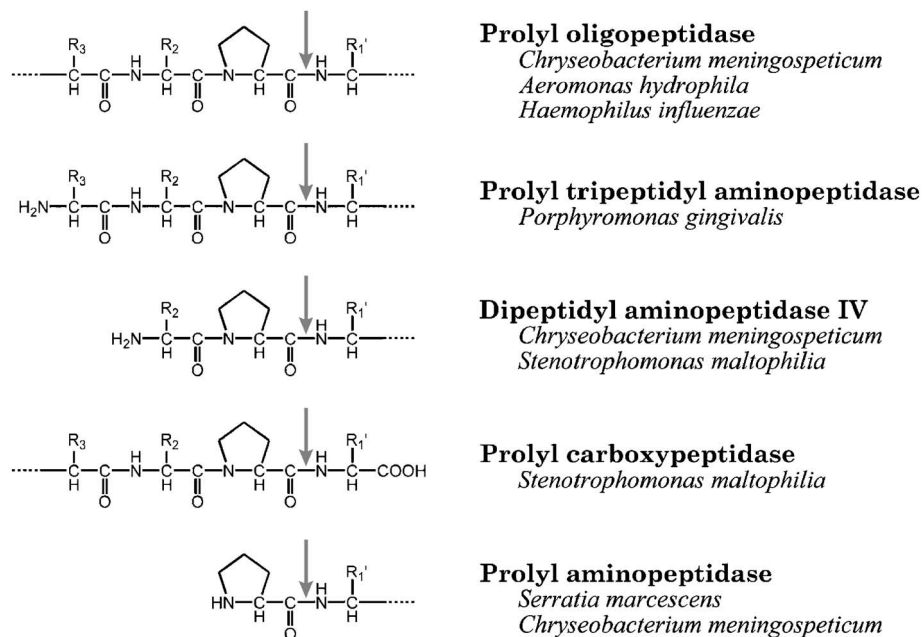


Fig. 1. Proline Specific Peptidases from Pathogenic Microorganisms

来 **Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase** の構造と機能
歯周病の原因菌としては、好気性、嫌気性を含め十数種類の細菌が知られている。日本人成人の 80% が、いずれかの細菌に感染していると言われている (Fig. 2)。さらに、日和見感染として全身に広がると脳膿瘍など重篤となることが知られている。主要な病原菌の 1 つとして知られる嫌気性グラム陰性の *P. gingivalis* は、糖を利用することができず、主に外界のペプチドをエネルギー源、栄養源として利用している。¹⁹⁾ そのため、菌体外に強力なペプチダーゼ群を産生しており、これらが歯周病の原因酵素として知られている。このペプチダーゼ群には、コラゲナーゼ²⁰⁾ とともに dipeptidyl aminopeptidase IV²¹⁾ と prolyl tripeptidyl aminopeptidase²²⁾ のプロリン特異的ペプチダーゼが存在している。Dipeptidyl aminopeptidase IV と prolyl tripeptidyl aminopeptidase は、同じペプチダーゼファミリー S9 に属し、一次構造の相同性を持つ。これら欠損株の病原性が減弱するとの報告もある。われわれは prolyl tripeptidyl aminopeptidase の阻害剤が有効な治療薬となると考え、X 線結晶構造学解析を行った。²³⁾

Prolyl tripeptidyl aminopeptidase は、分子量 82000 の同一サブユニットからなる二量体であり、N 末端に疎水性の膜結合部位を持つ II 型の膜結合酵素である。可溶画分に発現させるため N 末端 39 残基



Fig. 2. X-ray Film of Periodontitis Patient

を除いた酵素を大腸菌の系で大量発現した。組換え酵素を用いて結晶化に成功し、リガンド・フリー型及び活性中心の Ser 残基を Ala に置換した S603A 変異体酵素と基質 Gly-Ala-Pro-βNA との複合体構造をそれぞれ 2.1Å, 2.9Å 分解能で決定することに成功した²⁴⁾ (Fig. 3)。

Prolyl tripeptidyl aminopeptidase は、二量体構造を形成しており、各サブユニットは N 末端 β プロパラドメイン及び C 末端触媒ドメインの 2 つのドメインで構成されている。触媒三残基の Ser603, Asp678, His710 は、触媒ドメインに存在していた。活性部位は 2 つのドメイン境界に位置し各々のサブユニットで独立している。S603A 変異型酵素と基質 Gly-Ala-Pro-βNA との複合体の活性部位構

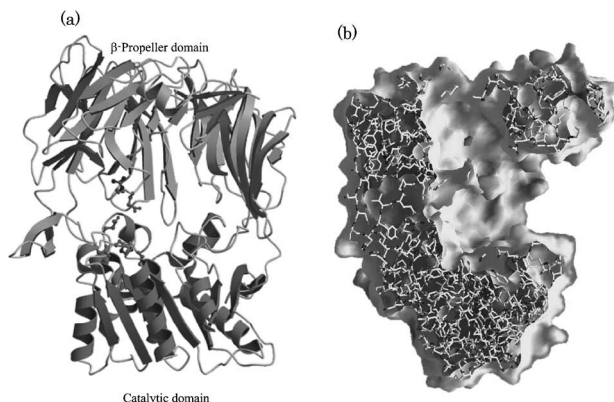


Fig. 3. Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase from *P. gingivalis*. Ribbon model (a) and sectioned model (b).

造を示す (Fig. 4). 活性部位には Tyr518, Tyr604, Trp632, Tyr635, Tyr639, Val680, Val681 で構成された疎水性ポケットが存在し, 基質 Pro 残基はこの疎水性ポケットに結合していた. 基質アミノ基は β -プロペラドメインの Glu205, 触媒ドメインの Glu636 の 2 つの Glu 残基により認識されていた. Dipeptidyl aminopeptidase IV の結晶構造は, ヒト及びブタ由来酵素で報告されている. 両者の全体構造はよく似ており, 特に触媒ドメインの構造がよく一致する. ブタ由来酵素 (PDB code: 1ORW) を最小二乗法によって prolyl tripeptidyl aminopeptidase に重ね合わせた結果, 活性部位の触媒三残基と基質 Pro 残基を収容する疎水性ポケットを構成する残基の位置は, ほぼ一致していた. Dipeptidyl aminopeptidase IV で基質 N 末端アミノ基は, β -プロペラドメインの Glu205*及び Glu206*によって認識される. これらグルタミン酸残基が位置する領域はヘリックス構造を形成していた. 一方, prolyl tripeptidyl aminopeptidase で相当する領域は, dipeptidyl aminopeptidase IV から 3 残基欠損し, ループ構造であった. Glu206*に相当する Glu205 のみが保存されており, Glu205 は Glu206*より活性中心の Ser 残基から 1.57 Å 遠い位置にみつかった. この結果, 基質の N 末端残基を認識し, X-X-Pro を活性部位に結合させ, トリペプチジルアミノペプチダーゼ活性が生じることが明らかとなった (Fig. 5).

3-2. セラチア菌 (*Serratia marcescens*) 由来 Prolyl Aminopeptidase の構造と機能 *S. marcescens* はグラム陰性嫌気性桿菌であり, 院内感染に

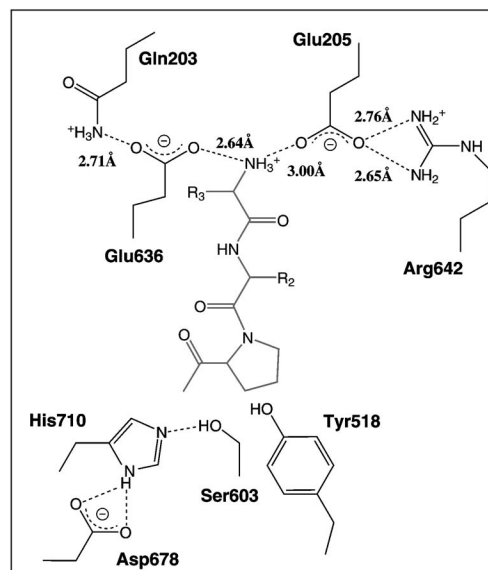


Fig. 4. Scheme Diagram of Substrate Binding at the Active Site of Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase

よる日和見感染症の原因菌の 1 つとして知られる. この *S. marcescens* 由来 prolyl aminopeptidase (EC 3.4.11.5) は分子量 36000, アミノ酸 317 残基からなる単量体酵素で, ペプチダーゼファミリー S33 に属するセリンペプチダーゼである.

この酵素は, N 末端残基がプロリンであるペプチド基質に対して特異的に活性を示す. またアラニン, ギルコシンに対しても活性を示す. われわれは, セラチア菌から prolyl aminopeptidase 遺伝子をクローニングし, 大腸菌を用いた大量発現系を確立した.¹⁸⁾ X 線結晶学的手法を用いて研究を行った結果, 酵素の立体構造を決定することに成功した²⁵⁾ (Fig. 6).

Prolyl aminopeptidase は, α, β -hydrolase fold を持つ触媒ドメイン (Met1-Thr140, Phe241-Lys317) と 6 本の α -ヘリックスで構成されるヘリックスドメイン (Leu141-Gly240) の 2 つのドメインで構成されている. 2 つのドメイン間にはトンネル状のキャビティが形成されており, この空間が活性部位である. 触媒三残基は Ser113, Asp268, His298 であり, これらは触媒ドメインに位置する. 活性部位の内部には, 触媒ドメインの Phe139, Ala270, Cys271 及びヘリックスドメインの Tyr149, Tyr150, Phe236 で構成された疎水性ポケットが明らかになった.²⁶⁾

3 つの阻害剤 (Pro-2-*tert*-butyl-(1,3,4)-oxadiazole (TBODA), Ala-TBODA, Sar-TBODA) を合成

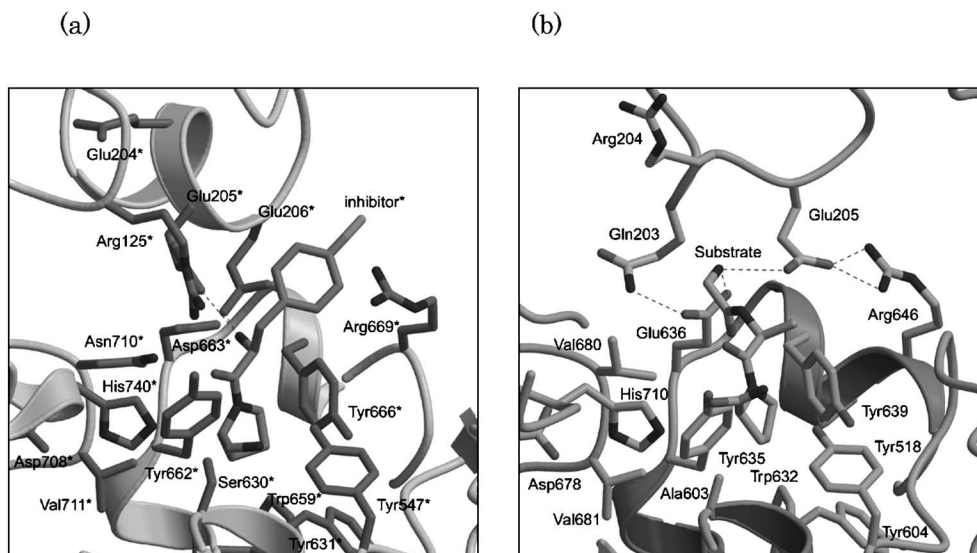


Fig. 5. Comparison of the Active Site in Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase (a) with that in Dipeptidyl Aminopeptidase IV (b)



Fig. 6. Structure of Prolyl Aminopeptidase from *S. marcescens* Complex with Pro-TBODA

し、これら阻害剤との複合体構造をそれぞれ明らかにした²⁶⁾ (Fig. 7(A)). Pro-TBODA 複合体構造において、阻害剤の Pro 残基はこの疎水性ポケットに収容され、そのイミノ基は Glu204, Glu232 と水素結合を形成していた。3つの複合体を重ね合わせた活性部位の構造を Fig. 3 に示す。活性部位の触媒三残基の位置と疎水性ポケットを構成する残基の位置は、非常によく一致していた。阻害剤の Pro, Ala, Sar 残基のイミノ基あるいはアミノ基は Glu204, Glu232 と水素結合を形成し認識され、その側鎖は Pro と同じ疎水性ポケットに結合してい

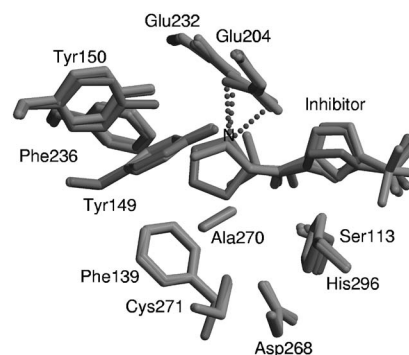


Fig. 7. Structure of Superimposed Enzyme-Pro-TBODA, Ala-TBODA and Sar-TBODA

た。²⁷⁾ 基質特異性は異なるが、pyroglutamyl peptidase の疎水ポケットと形状的には似ていた。²⁸⁾

一般に基質の結合部位ポケットは、その特異性を発揮するのに適した大きさや形状を有する。*S. marcescens* 由来 prolyl aminopeptidase の活性部位には、基質の Pro 残基を収める疎水性ポケットが見つかった。しかしながら、この疎水性ポケットには、Pro 残基のピロリジン環 4 位の位置に空間が存在することが判明した (Fig. 8)。

コラーゲンはその 3 重ヘリックス構造を安定化するため、ピロリジン環の 4 位あるいは 3 位がヒドロキシル化したヒドロキシプロリン残基を含む。われわれは、4-ヒドロキシプロリン- β ナフチルアミド (Hyp- β NA) とその 4-ヒドロキシル基をアセチル化した 4-アセトキシプロリン- β ナフチルアミド

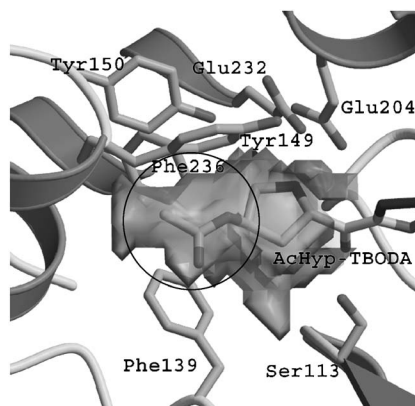


Fig. 8. Computer Designed Enzyme AcHyp-TBODA Complex Model.

It was suggested that the 4-acetyloxy group was fitted into the unusual extra space.

(AcHyp- β NA) を合成し, *S. marcescens* 由来酵素と *Bacillus coagulans* 由来酵素のそれぞれの合成基質に対する活性を比較した. *B. coagulans* 由来酵素が Pro- β NA に特異的に活性を示し, Hyp- β NA, AcHyp- β NA に対しては Pro- β NA の 1.2%, 0.46% と非常に低い活性しか示さなかった. 一方, *S. marcescens* 由来酵素は, Hyp- β NA で Pro- β NA の 26% と比較的良好に作用し, さらにアセチル化された基質に対して非常に強力に作用するという新しい機構を見出した.²⁹⁾ 阻害剤複合体構造に基づいて, AcHyp-TBODA 複合体モデルを構築したのが Fig. 8 である. AcHyp の 4-アセトキシ基は活性部位ポケットに結合していた. *S. marcescens* 由来 prolyl aminopeptidase の AcHyp 基質に対する高い活性は, 活性部位の基質ポケットが, 4-アセトキシプロリンを結合するに適した形状と大きさを有することに由来することが判明した.²⁹⁾

3-3. 大腸菌由来 Aminopeptidase N の構造とペプチド分解へのプロリン特異性ペプチダーゼとの相互作用 Aminopeptidase N (EC : 3.4.11.2) は, 活性部位に亜鉛を 1 個含有する金属プロテアーゼであり,³⁰⁾ ペプチダーゼ M1 ファミリーに属する. Aminopeptidase N は, 非常に幅広い生理的役割を担うことから興味を持たれてきた. しかしながら, これまで酵素の立体構造は不明であった. ヒト aminopeptidase N の分子量は約 150000 である. 967 残基のアミノ酸とその分子量の約 30% に当たる糖鎖を持つ糖結合タンパク質であり, N 末端領域が膜にアンカーリングした II 型の膜結合酵素であ

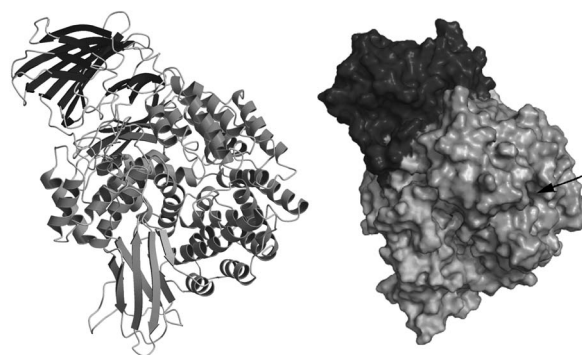


Fig. 9. Overall Structure of Aminopeptidase N

Ribbon (left) and surface (right) models. Arrow indicates the hole for the entry of substrate into the active site of the enzyme.

る. 一方, 大腸菌 aminopeptidase N は 870 残基のアミノ酸で構成された細胞質酵素である. ヒトの酵素は, N 末端が Ala である基質を最も好む (N 末端が Lys である基質との Km が最も高い) が, 大腸菌酵素は, 基質 N 末端の残基が順に Arg, Lys, ついで Ala を好む. 両酵素の一次構造の相同性は 13.6% であり, 基質特異性の違いは, 活性部位の構造の違いによると考えられる. そのため, 両者の構造の比較は, 基質認識機構やレセプターとしての機能を解明する重要な手掛かりになる.

われわれは酵素遺伝子を大腸菌で高発現し酵素を精製し結晶化して,³¹⁾ 初めて aminopeptidase N の立体構造を明らかにすることに成功した³²⁾ (Fig. 9). Aminopeptidase N は 4 つのドメインからなり, 活性ドメインはサーモライシンと類似する. この aminopeptidase N の一番の特徴は他に類をみない広い基質特異性にある. 酵素阻害剤である Bestatin との酵素複合体の X 線結晶解析を行ったのが Fig. 10 である. 基質の側鎖の大きさに合わせ活性ドメインの Met260 側鎖が動き基質の側鎖を収納する空間の大きさを変化させ, 疎水性や塩基性アミノ酸までも取り込む機構が明らかになった (Fig. 11). もう 1 つの成果は X-Pro 結合が全く切断できない理由が初めて解明された点にある. その立体構造から活性部位の S1, S1' サイトには X-Pro 残基は結合できない. このことは, ペプチドの最終分解で aminopeptidase N がアミノ酸を順次切り出す, プロリンが存在するとプロリンの手前で反応が停止する. プロリン特異性ペプチダーゼはそのプロリンを除去することにより, aminopeptidase N による

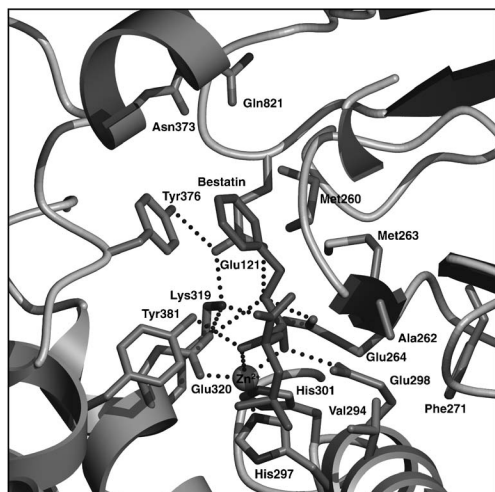


Fig. 10. Active Site of Aminopeptidase N

The bestatin at the active site is shown. A zinc ion in the complex is five-coordinated by His²⁹⁷, His³⁰¹, Glu³²⁰, and two oxygen atoms of bestatin.

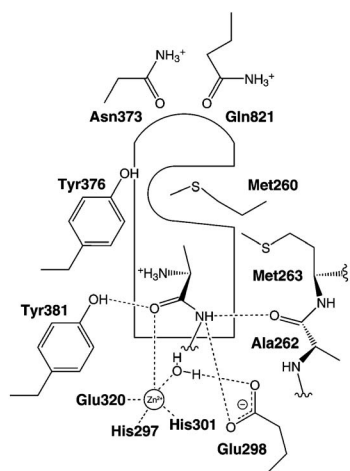


Fig. 11. Substrate-binding Model of Aminopeptidase N

Met²⁶⁰ is expected to function as a cushion for substrates with N-terminal residues of different sizes: such changes in conformation would in turn alter the size of the pocket.

アミノ酸の遊離反応が再開される機構を酵素の構造からも明らかになった³²⁾ (Fig. 12).

病原菌の多くはアミノ酸要求性である。感染と増殖にプロリンの多いコラーゲンを分解するためにはアミノペプチダーゼとプロリン特異性ペプチダーゼの作用が必要であることと、ヒドロキシプロリンへの作用も理にかなったものである。このことは抗生物質耐性の日和見感染菌に対する新たな治療薬として、プロリン特異性酵素の阻害剤の有用性を示すものである。

4. 微生物酵素の臨床検査への応用

酵素の高い基質特異性から、glucose oxidase は尿

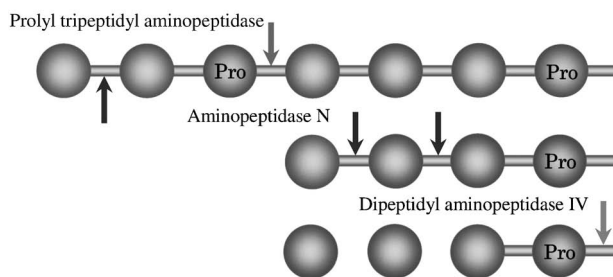


Fig. 12. Proposed Mechanism of Hydrolysis of Proline Containing Peptide by Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase, Dipeptidyl Aminopeptidase IV and Aminopeptidase N

や血清のグルコースの測定に用いられ、糖尿病診断に利用されてきた。われわれは微生物酵素を広くスクリーニングすることにより新規に特異性のユニークな酵素を見出してきた。それら酵素の基質特異性や安定性を利用し、種々の測定キットを開発するとともに、酵素の構造をX線結晶構造解析により明らかにし、改変することにより、より有用な酵素キットとして開発してきた。

4-1. クレアチニン代謝系酵素と腎機能検査試薬の開発

クレアチンの合成は、腎、膵臓においてグリシンとアルギニンから生じるグアニジノ酢酸に、肝臓でS-アデノシルメチオニンからのメチル基が転移される反応によって行われる。さらに creatin kinase の作用によりリン酸化されてクレアチンリン酸として高エネルギーの貯蔵の役割を果たすが、クレアチンはクレアチンリン酸から非酵素的に生成されるクレアチンの最終代謝産物であり、ヒトは合成、分解どちらの代謝酵素も持たない。われわれは、奈良の土壤中より単離した *Pseudomonas putida* の菌株はクレアチニンからクレアチン、サルコシンを経由して尿素とグリシンとホルムアルデヒドに分解する一連の酵素系を持つことを明らかにした。²⁾ それぞれ、creatininase,³³⁾ creatinase,³⁴⁾ sarcosine dehydrogenase³⁵⁾ を精製しその性質を明らかにした。さらにこの菌からは、ホルムアルデヒドからグルタチオンを必要とせずにギ酸へ酸化する活性を有するユニークな酵素も単離し構造決定している。³⁶⁻³⁸⁾ これら酵素を利用して開発したクレアチニン測定キットを開発した。それまでは化学法である Jaffe 法が用いられてきたが、血清中の夾雑物で発色するなど特異性に問題があることが指摘されていた。現在ではこの酵素法による腎機能の検査に臨床

の場で広く利用されている。

4-2. Creatininase の X 線結晶構造解析 クレアチナーゼを結晶化し,³⁹⁾ X 線結晶解析により構造を明らかにした。⁴⁰⁾ 酵素は、EC 3.5.2.10 に分類され、環状アミド化合物を加水分解する酵素の 1 つである。16 種類の酵素が EC 3.5.2. に分類されているが、creatininase との相同性はなく、明らかにした立体構造も Fig. 13 に示すようにクローバー型の 6 量体構造を有する新規の構造であった。基質のクレアチニンに対する Km 値はやや大きく 50 mM 程度であるが、血液試料中のクレアチニンのみを認識し正確な測定を行うことが可能である。*P. putida* より単離した野生型の creatininase は活性部位に 2

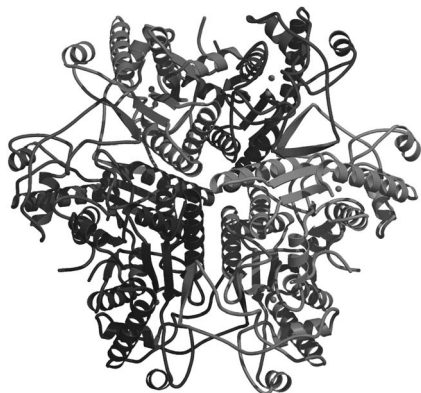


Fig. 13. Structure of the Hexamer of the Mn Activated Creatininase

個の亜鉛を持つ金属酵素であるが、マンガン溶液で透析すると、活性が上昇すると同時に安定性が増した。これらの creatininase の結晶構造を X 線結晶構造解析の手法を用いて明らかにした結果、Fig. 14 に示すように、Mn- 活性型酵素は、一方の Zn が Mn で置換されていることが明らかとなった (Figure の左側の Zn が Mn で置換されている)。置換されない Zn (右側) は両者ともに His36, Asp45, Glu183, 及び WAT1 による正四面体配位となっているのに対し、(左側の) Zn 及び Mn の配位は異なっていた。Zn が Glu34, Asp45, His120, 及び WAT3 によりゆがんだ正四面体構造となっているのに対し、Mn は Glu34, Asp45, His120, 及び WAT1, WAT2 による正方ピラミッド配位をとっていた。Mn に比べ、Zn の温度因子が有意に高く、安定性の活性中心部分の安定性が増していることが分かる。また、Mn と水分子との距離が Zn のそれと比較して短くなっていたことから、水分子の求核性が上がって活性化されている可能性を考えている。臨床検査試薬には高い活性と安定性が求められるので、Mn- 置換型酵素が、現在診断試薬として利用されている。

P. putida は常温で成育する菌であるが、creatininase の熱安定性は、同菌の他のクレアチニン代謝酵素と比べて有意に高かった。これは Fig. 15 に示すように、プロリンに富む β ストランド領域

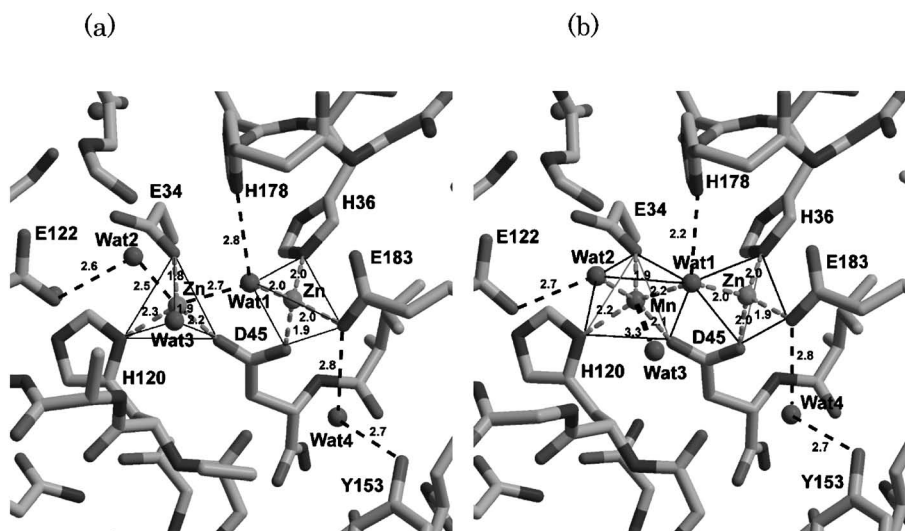


Fig. 14. Coordination of the Binuclear Metal Center of Creatininase

(a) Native creatininase. The Zn (left) has distorted tetrahedral geometry, whereas the Zn (right) has ordered tetrahedral geometry, and (b) The Mn-activated creatininase. The Mn has a square-pyramidal geometry, whereas the Zn is revealed as having ordered tetrahedral geometry.

(204–224, 21 残基中 8 残基) が隣のサブユニットの中央の平行 β シートと逆平行 β シートを形成して強く結合しているために、6 量体構造が安定化されていると考えられる。

4-3. その他の臨床検査用酵素の開発 わが国の糖尿病患者は急速に増加の傾向にある。このうち 1 型糖尿病は 5% 未満ではあるが、インスリン注射が絶対的に必要である。1 型糖尿病患者では、インスリン不足のためグルコースを利用できず、脂肪酸代謝が亢進してアセチル CoA を生産する。しかし、クエン酸回路の中間体であるオキサロ酢酸が不足するために処理しきれず、過剰分がケトン体に変

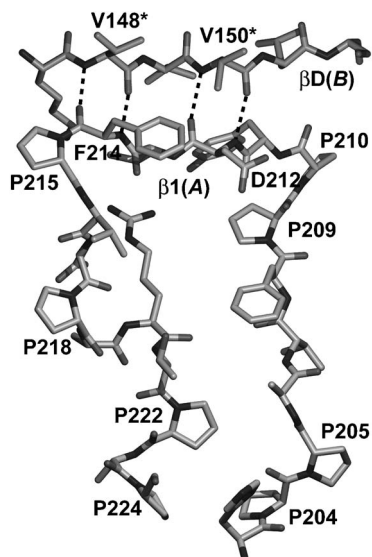


Fig. 15. Closed View of the Interface between Subunits

換されてしまう。著明に増加したケトン体はケトアシドーシスを引き起こし危険な昏睡状態となることから、治療に際しケトン体をモニターすることが推奨される。ケトン体の中でも D-3-ヒドロキシ酪酸濃度がインスリン作用不足とよく相関することから、D-3-ヒドロキシ酪酸を NAD^+ 存在下、酵素的に酸化することでケトン体量をモニターできる。われわれはケトン体測定キットの開発を目指し、特異的測定のための酵素として *Pseudomonas* 属細菌から D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase 遺伝子をクローニングし、酵素の過剰発現系を構築して、その立体構造を明らかにした (Fig. 16)。酵素は 4 量体で、ヌクレオチド結合タンパク質でみられるロスマン・フォールドをとり、基質類似物との複合体の X 線結晶解析に成功した。⁴¹⁾

5. おわりに

抗生物質多剤耐性菌による院内感染や新興感染症など感染症は短期間に爆発的に広がることから常に大きな社会問題となっている。これまで、新規抗生物質の開発との繰り返しであったが、限界にきていると言われている。われわれは病原菌の持つプロリン特異性ペプチダーゼの構造生物学的研究から、コラーゲンを含むタンパク質を分解しアミノ酸とし栄養源としていることを明らかにした。今後、構造に基づく特異的な阻害剤の開発は抗生物質とは異なる、いわゆる兵糧攻めの戦略による新規治療剤の開発が期待される。一方、微生物酵素を臨床検査へ利用することを行ってきた。実用化に至ったものは腎

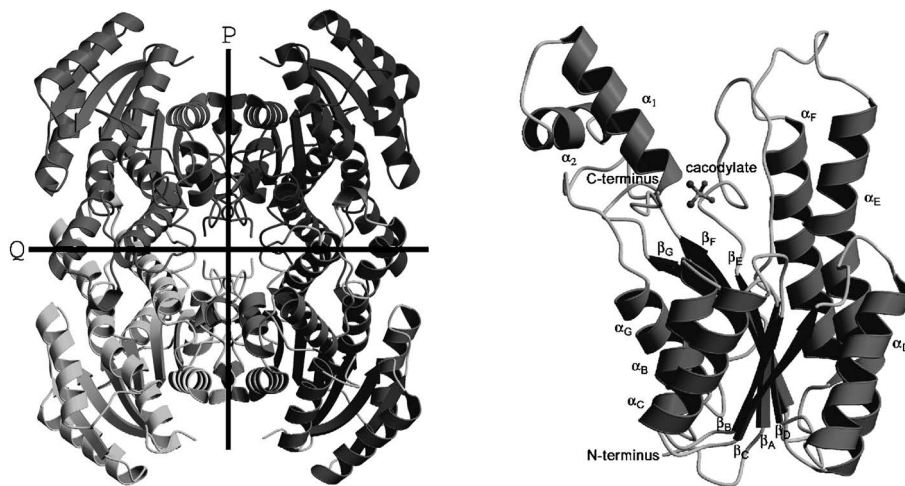


Fig. 16. Structure of D-3-hydroxybutyrate Dehydrogenase from *Pseudomonas fragi*
(a) Tetramer and (b) Monomer with cacodylate.

機能検査で、糖尿病のケトン体測定キットは開発中で、前者の creatininase に関してはその立体構造情報から金属の置換の確認と活性化機構の解明に成功した。

謝辞 本研究は、長崎大学薬学部薬品生物工学研究室にて行ったものであり、伊藤 潔准教授、中嶋義隆助教の成果でもあります。常にご指導と励ましをいただいた前教授の鶴 大典名誉教授に心より御礼申し上げます。また、薬品生物工学研究室の院生及び学生により行われたものであり感謝いたします。本研究の一部は共同研究によるところがあり、長崎大学薬学部畑山 範教授、昭和大学薬学部田中 信忠講師に深謝いたします。本研究は文部科学省科学研究費基盤研究 (B) 他、文部科学省タンパク 3000 プロジェクトによるものです。

REFERENCES

- 1) Yoshimoto T., Orłowski R. C., Walter R., *Biochemistry*, **16**, 2942–2948 (1977).
- 2) Tsuru D., Oka I., Yoshimoto T., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1011–1018 (1976).
- 3) Walter R., Yoshimoto T., *Biochemistry*, **17**, 4139–4144 (1978).
- 4) Yoshimoto T., Fischl M., Orłowski R. C., Walter R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 3708–3716 (1978).
- 5) Yoshimoto T., Ogita K., Walter R., Koida M., Tsuru D., *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 184–192 (1979).
- 6) Rennex D., Hemmings B. A., Hofsteenge J., Stone S. R., *Biochemistry*, **30**, 2195–2203 (1991).
- 7) Yoshimoto T., Miyazaki K., Haraguchi N., Kitazono A., Kabashima T., Ito K., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1047–1050 (1997).
- 8) Kanatani A., Masuda T., Shimoda T., Xu S. L., Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Biochem.*, **110**, 315–320 (1991).
- 9) Ogata S., Misumi Y., Ikehara Y., *J. Biol. Chem.*, **264**, 3596–3601 (1989).
- 10) Mitta M., Asada K., Uchimura Y., Kimizuka F., Kato I., Sakiyama F., Tsunazawa S., *J. Biochem.*, **106**, 548–551 (1989).
- 11) Ito K., Kitazono A. A., Yoshimoto T., “Handbook of Proteolytic Enzymes,” 2nd ed., eds. by Barret et al., Elsevier Ltd., 2004, pp. 1897–1900.
- 12) Yoshimoto T., Walter R., Tsuru D., *J. Biol. Chem.*, **255**, 4786–4792 (1980).
- 13) Yoshimoto T., Kanatani A., Shimoda T., Inaoka T., Kokubo T., Tsuru D., *J. Biochem.*, **110**, 873–878 (1991).
- 14) Kanatani A., Yoshimoto T., Kitazono A., Kokubo T., Tsuru D., *J. Biochem.*, **113**, 790–796 (1993).
- 15) Kabashima T., Ito K., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **120**, 1111–1117 (1996).
- 16) Kitazono A., Kabashima T., Huang H.-S., Ito K., Yoshimoto T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **336**, 35–41 (1996).
- 17) Kitazono A., Kitano A., Tsuru D., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **116**, 818–825 (1994).
- 18) Kabashima T., Kitazono A., Kitano A., Ito K., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **122**, 601–605 (1997).
- 19) Shah H. N., Williams R. A., *Curr. Microbiol.*, **15**, 241–246 D (1987).
- 20) Mayrand D., Grenier D., *Can. J. Microbiol.*, **31**, 134–138 (1985).
- 21) Grenier D., McBride B. C., *Infect. Immun.*, **55**, 3131–3136 (1987).
- 22) Banbula A., Mark P., Bugno M., Silberring J., Dubin A., Nelson D., Travis J., Potempa J., *J. Biol. Chem.*, **274**, 9246–9252 (1999).
- 23) Nakajima Y., Ito K., Xu Y., Yamada N., Onohara Y., Ito T., Yoshimoto T., *Acta Cryst.*, **F61**, 1046–1048 (2005).
- 24) Ito K., Nakajima Y., Ichihara E., Ogawa K., Egawa T., Xu Y., Yoshimoto T., *J. Mol. Biol.*, **362**, 228–240 (2006).
- 25) Yoshimoto T., Kabashima T., Uchikawa K., Inoue T., Tanaka N., Nakamura K. T., Tsuru M., Ito K., *J. Biochem.*, **126**, 559–565 (1999).
- 26) Ito K., Inoue T., Kabashima T., Kanada N., Huang H.-S., Ma X., Azmi N., Azab E., Yoshimoto T., *J. Biochem.*, **128**, 673–678 (2000).
- 27) Inoue T., Ito K., Tosaka T., Hatakeyama S., Tanaka N., Nakamura K. T., Yoshimoto T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **416**, 147–154 (2003).
- 28) Ito K., Inoue T., Takahashi T., Huang H.-S., Esumi T., Hatakeyama S., Tanaka N., Nakamura K. T., Yoshimoto T., *J. Biol.*

- Chem.*, **276**, 18557–18562 (2001).
- 29) Nakajima Y., Ito K., Sakata M., Xu Y., Nakashima K., Matsubara F., Hatakeyama S., Yoshimoto T., *J. Bacteriol.*, **188**, 1599–1606 (2006).
- 30) Yoshimoto T., Tamesa Y., Gushi K., Murayama N., Tsuru D., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 217–225 (1988).
- 31) Nakajima Y., Ito K., Xu Y., Yamada N., Onohara Y., Ito T., Yoshimoto T., *Acta Cryst.*, **F61**, 1046–1048 (2005).
- 32) Ito K., Nakajima Y., Onohara Y., Takeo M., Nakashima K., Matsubara F., Ito T., Yoshimoto T., *J. Biol. Chem.*, **281**, 33664–33676 (2006).
- 33) Rikitake K., Oka I., Ando M., Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Biochem.*, **86**, 1109–1117 (1979).
- 34) Yoshimoto T., Oka I., Tsuru D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 508–515 (1976).
- 35) Oka I., Yoshimoto T., Rikitake K., Ogushi S., Tsuru D., *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1197–1203 (1979).
- 36) Ando M., Yoshimoto T., Ogushi S., Rikitake K., Shibata S., Tsuru D., *J. Biochem.*, **85**, 1165–1172 (1979).
- 37) Ito K., Takahashi M., Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Bacteriol.*, **176**, 2483–2491 (1994).
- 38) Tanaka N., Kusakabe K., Ito K., Yoshimoto T., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **324**, 519–533 (2002).
- 39) Ito K., Kanada N., Inoue N., Furukawa K., Yamashita K., Tanaka N., Nakamura K. T., Nishiya Y., Sogabe A., Yoshimoto T., *Acta Cryst.*, **D58**, 2180–2181 (2002).
- 40) Yoshimoto T., Tanaka N., Kanada N., Inoue T., Nakajima Y., Haratake M., Nakamura K. T., Yue X., Ito K., *J. Mol. Biol.*, **337**, 399–416 (2004).
- 41) Ito K., Nakajima Y., Ichihara E., Ogawa K., Katayama N., Nakashima K., Yoshimoto T., *J. Mol. Biol.*, **355**, 722–733 (2006).