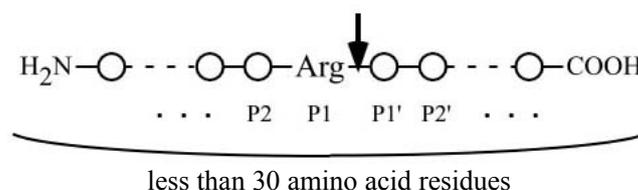


# Characterization of bacterial oligopeptidase B

(細菌のオリゴペプチダーゼ B に関する研究)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Malik Suliman Mohamed Mustafa

[目的] オリゴペプチダーゼ B (OPB, EC 3.4.21.83)サブファミリーは、セリンペプチダーゼであるプロリルオリゴペプチダーゼ (POP)ファミリー (clan SC, S9 ファミリー)の一部門を形成する酵素で、Fig.1 に示すように塩基性アミノ酸残基 (Arg/Lys)のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解するトリプシン様の基質特異性を有する。POP ファミリー酵素は、オリゴペプチダーゼの名が示す通り 30 残基以下のオリゴペプチドのみを加水分解し、この性質は N 末端側の特徴的な  $\beta$ -プロペラ構造の存在により C 末端側で形成される触媒ドメインへのアクセスがブロックされることに起因すると考えられている。OPB はプロテアーゼ II とも呼ばれ、その遺伝子は我々の研究室において *E. coli* よりクローニングされ、初めて POP との相同性があることが示された。OPB の遺伝子は、いくつかの細菌中に見出される他、*Leishmania* や *Trypanosoma* という原生生物、植物にも見出されているが、ほ乳類や古細菌には存在しない。このため、OPB の生理的基質は不明で生理的役割の詳細も明らかにはされていないが、潜在的な創薬ターゲットである。実際、原生生物の OPB は、これら原虫の感染に重要な役割を果たす重要な病原性因子であり、例えば、*T. cruzi* の OPB を欠損させるとマウスでの感染が大幅に阻害されることが示されている他、死滅した原虫由来の OPB が活性を有した状態で宿主の血中に遊離し生理活性を持つペプチドを分解して病態に関与することなども報告されている。OPB の基質認識機構を解析して酵素の特異的阻害剤を開発することは、これらの原虫の感染症である Chagas 病、アフリカトリパノソーマ症の治療につながると期待できるだけでなく、OPB を持つことが知られている日和見感染菌の病態改善につながる可能性もある。本研究では、重要な創薬ターゲットである OPB の詳細な基質認識機構と触媒機構を明らかにすることを目的として、4 種の細菌の OPB 発現系を構築して酵素を精製し、それらの基質特異性を種々の合成基質を用いて解析した。さらに、立体構造の解明を目指した酵素タンパク質の結晶化を行った。



**Fig. 1. OPB substrates and cleavage site.** OPB substrates have a basic amino acid residue, such as Arg and Lys, at the P1 site of cleavage.

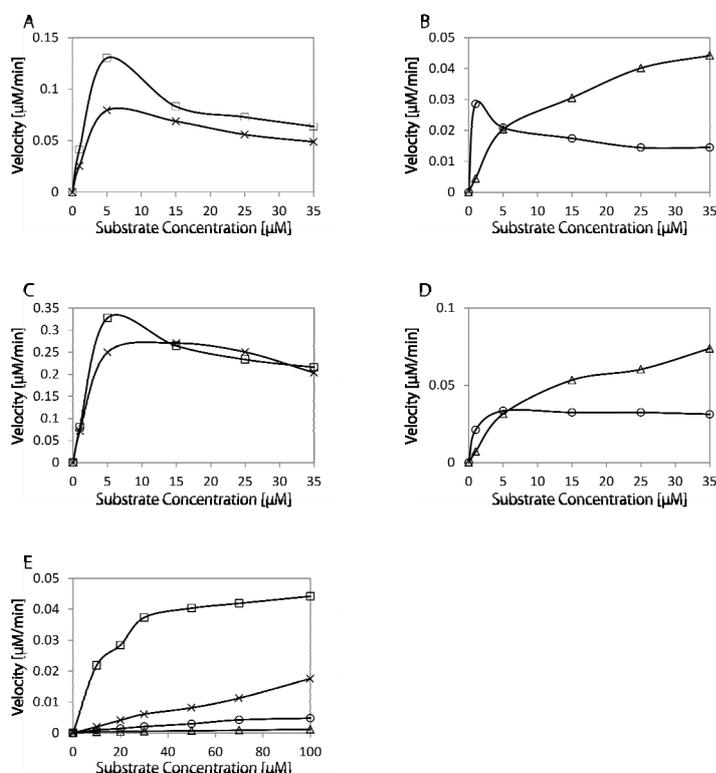
[実験方法] OPB 構造遺伝子は各細菌のゲノム DNA を鋳型として PCR で増幅し、pET22b (+) および pET28a (+) (Novagen)ベクターに組み込んだ発現プラスミド pET28OPB-NTHS (N-terminal His-tag)、pET22OPBWT (wild-type)、pET22OPBCTHT (C-terminal His-tag) をそれぞれ構築し、*E. coli* BL21 (DE3) を宿主として発現させた。Ni<sup>2+</sup>-アフィニティーカラムクロマトグラフィーを主体とした方法で精製し、各種ペプチジル-MCA を基質として、遊離する AMC の蛍光を測定することにより活性を測定した。結晶化条件のスクリーニングは、市販のキット (500 条件) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により行った。

[結果] 3 種のグラム陰性菌 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* 由来の OPB (それぞれ Stm、Sem、EcOPB) およびグラム陽性菌である *Rhodococcus erythropolis* の OPB を発現させた。18°C で培養することで、3 L 培養液から約 100 mg の酵素が得られ、SemOPB に関しては 16°C での培養も試みたが収率は低かったものの、全ての酵素を調製することができた。一般に、P1 と P2 部位に 2 つの連続する Arg 残基を有する基質 (ダブル Arg 基質) が、P1 部位に 1 つの Arg 残基を有する基質よりも速く加水分解されたが、そのような違いは、P1 部位に Lys を持つ基質では観察されなかった。StmOPB と SemOPB の一次構造は、触媒ドメインである C 末端側では 60% の相同性があるが、MCA 基質に対する活性には大きな差があり、StmOPB がほとんどの基質に対して最も効率よく作用した (Table 1)。例えば、Boc-Gln-Gly-Arg-MCA に対する活性は、StmOPB の 3499 nmol/min に対して Sem、EcOPB では 13、408 nmol/min であった。グラム陽性菌の ReOPB は StmOPB に匹敵する活性を示した。

**Table 1. Specific activity of bacterial OPBs.** Enzyme activity of Stm, Re and EcOPB was determined in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and SemOPB in 0.02 M potassium phosphate (pH 7.8) with various substrates. The amount of enzyme used was approximately 10 ng. Values were shown in nmol/min.

	StmOPB	ReOPB	SemOPB	EcOPB
Bz-Arg-MCA	3130	908	18	105
Z-Leu-Arg-MCA	3440	3498	53	570
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	3499	4258	13	408
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	2470	2996	6	126
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	3055	3688	6	382
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	1333	1849	5	243
Z-Arg-Arg-MCA	1811	1430	337	328
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	1302	663	102	124
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	3275	2228	158	220
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA	1306	645	86	170
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	2380	1230	86	370
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	457	519	6	90

Fig. 2に示すように、ダブルArg残基を持つ基質を用いると、Stm、EcおよびReOPBでは、5  $\mu\text{M}$ 程度で最大の活性を示し、それ以上の濃度では顕著な基質阻害が観察されたが、SemOPBでは、35  $\mu\text{M}$ の基質濃度においてもほとんど阻害は見られなかった。このような強い基質阻害減少はP1部位にLysを持つ基質では観察されなかった。



**Fig. 2 Substrate inhibition of bacterial OPBs.** All enzymes were used at an amount of 10 ng in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), with the exception that SemOPB was prepared in 0.02 M potassium phosphate (pH 7.8) to avoid the activity decrease. Substrates used were Boc-Gly-Arg-Arg-MCA (A and B), Boc-Gln-Arg-Arg-MCA (C and D), Boc-Lys-MCA (E). Stm (□), Re (×), Ec (○) and Sem (Δ) OPB.

[考察] OPBの立体構造の解明には多くの結晶化の努力がされたものの構造決定までには至らず、最近になりようやく *Leishmania major* のOPBの結晶構造が報告された。その結果、酵素上のS1部位は明確になったが、S2、S3部位に関する情報は少なく、ダブルArg基質のP2部位Arg残基との相互作用もTyr499とのスタッキング等が推定されているだけであり、既存の実験結果から予想されていたP2部位の塩基性アミノ酸と相互作用するような部位は見いだせず、その大きな特徴の一つである基質阻害の原因は依然として不明である。本研究で発現系を構築することに成功した細菌のオリゴペプチダーゼBは、この基質阻害現象を解明するための良いモデルになると考えられる。いくつかの結晶を得ることに成功しており、X線結晶構造解析による構造解明へとつなげる実験を継続している。今回の結果は、重要な創薬ターゲットと考えられるオリゴペプチダーゼBの基質結合機構の詳細を解明するための一助になる。

[基礎となった学術論文]

1. Suliman Mohamed Mustafa, M., Nakajima, Y., Oyama, H., Iwata, N., and Ito, K., Assessment of substrate inhibition of bacterial oligopeptidase B. Biol. Pharm. Bull., *in press*.