

トリプシノーゲンの生理的活性化酵素、
エンテロペプチダーゼの構造について

松 嶋 成 志

トリプシノーゲンの生理的活性化酵素、
エンテロペプチダーゼの構造について

松 嶋 成 志

I. 研究の背景、目的

エンテロペプチダーゼ（別名 エンテロキナーゼ、EC 3.4.21.9）は1950年代から知られている、生理的には唯一のトリプシノーゲンを活性化する酵素である¹⁾。このようにして活性化されたトリプシンは、様々な膵酵素前駆体を活性化する。従って、エンテロペプチダーゼは、腸管内蛋白消化の調節機構におけるいわばkey enzymeの役割を果たしているものと考えられる。実際、エンテロペプチダーゼの先天的欠損症の患者においては、著明な消化吸收障害、低栄養、低成長がみられるが、膵酵素製剤投与により劇的な改善が認められることが報告されている²⁾。

以上のような生理的重要性のため、様々な種由来の本酵素の精製及び酵素学的諸性質についての報告が見られる³⁾⁻⁹⁾。これらの報告によれば、本酵素はトリプシン型のセリンプロテアーゼに属し、基質であるウシトリプシノーゲンのアミノ末端配列 (Val¹-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys⁶) から予想されたように、P1位 [この命名法はBerger and Schechter⁶⁾ の論文に依っている] に塩基性アミノ酸残基を、P2～P5位に酸性アミノ酸残基を要求するという特殊で厳密な基質特異性を有するという。その一方、本酵素の構造についての知見はかなり不明確ないし不足している。これまでの報告による本酵素の分子量は種差が大きく、150Kから300Kとされている。また、構成ペプチド鎖数についてもブタ⁴⁾、ウシ^{7), 9)} では2鎖、ヒト¹⁰⁾ では3鎖とされており、いずれも分子量の小さいペプチド鎖 (L鎖) が活性中心を持つ触媒鎖であるとされているが^{4), 10), 11)}、未だ確定的とは言い難い。このように確定性に欠ける理由の多くは、本酵素の一次構造情報がきわめて不十分であることに帰せられるといえよう。

本研究の目的は、本酵素の全一次構造を決定し、今後の本酵素に関わる研究の基礎を築くことにある。このため、精製、各鎖のアミノ末端アミノ酸配列の決定、

cDNAの単離、解析を行うこととした。また、得られた触媒鎖（L鎖）アミノ酸配列から、コンピュータ・モデリングを用いてL鎖高次構造モデルを作成し、本酵素の特殊な基質特異性の説明を試みた。尚、本研究を施行中、1994年、Lavallieらにより、ウシ酵素のL鎖のみの部分的一次構造が発表されている¹²⁾。

II. 研究の方法

1) 蛋白濃度

蛋白濃度は、protein assay kit (Bio-Rad社) を用い、マウス IgG を標準蛋白として、Bradfordの方法^{1,3)} で測定した。

2) 酵素の精製

a) 酵素活性の測定

エンテロペプチダーゼの酵素活性は、Liepnieks and Light⁷⁾ の方法に若干の改変を加えて測定した。原理としては、エンテロペプチダーゼによりトリプシノーゲンを活性化させ、活性化されたトリプシン活性を測定するという2段階反応による。具体的には0.5M CaCl_2 を含む0.1M sodium acetate (pH 5.0) バッファー 100 μl 中に、10 μl のサンプル、10 μl の1mg/ml trypsinogen (Sigma) 溶液 (溶媒: 1mM HCl) を加え、37°Cで10分～60分間反応させ、10 μl の1M HClを加え反応を停止させる。この反応液 5 μl を0.5mlの0.1M Tris (pH 8.0) バッファーに加え、さらに5 μl の10mM ベンゾイル-アルギニル-メチル-クマリンアミドを加えた後、37°C、10分間反応させ、2.5mlの0.1M monochloro-acetic acidを含む0.1M sodium acetate (pH 4.3) を加え反応停止後、蛍光光度計にて370nm excitation, 460nm emissionの波長で測定する。尚、1 E K Uはトリプシノーゲン活性化反応30分あたり、1 μg のトリプシンを発生させる酵素活性として定義した。

b) 精製法

基本的に、全ての精製操作は4°Cにて行った。

40頭のブタ十二指腸を長軸方向に切開し、20mM Tris-HCl (pH 8.0) (以後、A バッファーと呼ぶ) バッファー 500ml中で手指を用いて粘膜をしごいて取り、1/9量の10%デオキシコール酸ナトリウムを加え可溶化、攪拌1時間後、遠心

(9,000 rpm、30分)し、上清を粗抽出物 (crude extract) とした。

この粗抽出液に、Aバッファーに既に平衡化した陰イオン交換樹脂 DE 5 2 (Whatmann) 800ml を加え、吸着させた後、Aバッファー3.5lで3回、40mM NaClを含んだAバッファー (以後、Bバッファー) 3.5lで3回、バッチ法にて洗浄し、カラム (5.4 x 40cm) にバックアップした。Bバッファー10l (300ml/h) でさらに洗浄し、120mM NaClを含むAバッファー (以後、Cバッファー) で、段階的溶出 (200ml/h) を行い、活性画分をプール (約180mlとなる) した。

上記プールに硫酸アンモニウムを25%飽和となるよう加え、緩やかに攪拌、遠心 (12,000 rpm、20分) 後の上清を、1M ammonium sulfate, 5mM calcium chloride を含む20mM Tris-HCl (pH 7.8) (以後Dバッファー) で平衡化されたButyl Toyopearl 650S カラム (2 x 20cm, prepacked, Tosoh) に、1ml/min にてapply し、Dバッファー240mlを用いて洗浄 (4ml/min) 後、硫酸アンモニウムの直線的濃度勾配溶出 (1M→0M/200 min, 4ml/min) をFPLCシステム (Pharmacia) を用いて行った。0.6M付近の一峰性の活性画分をプール (約80ml) した。

上記プールを限外濾過膜遠心システム、セントリセル-20 (カット分子量3万、ナジ) にて濃縮 (約1mlとなる) 後、200mM NaClを含むAバッファー (以後、Eバッファー) にて平衡化されたSephacryl S-300カラム (3.6 x 90 cm, Pharmacia) にapply し、Eバッファーにて溶出 (30ml/h) した。溶出液量440ml付近 (分子量にして約20万) に一峰性の活性ピークを認め、これらの活性画分をプール (約70ml) した。

上記プールを再び遠心濃縮 (約1ml) した後、Eバッファーにて平衡化されたbenzamidine-Sepharose カラム (0.9 x 25 cm, Pharmacia) にapply し、同じバッファーにて溶出 (5 ml/h) した。素通り画分 (10~24ml) には活性はなく、その後のretardation画分 (25~60ml) では、各分画で280nm吸光度と活性の比がほぼ一定である活性のピークが認められた。このretardation 画分をプール

(約35ml)、遠心濃縮(約0.8ml)し、以後の実験に用いた。

3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は、基本的にはLaemmliの方法¹⁴⁾に従い、SDS-PAG plate 4/20とMultigel 15/25(ともに第一化学)を用いて行った。

4) アミノ末端アミノ酸配列解析

精製酵素標品は4-20または15-25%の濃度勾配ゲルを用いてSDS-PAGEを行い、分離されたポリペプチドをLeGendre and Matsudaira¹⁵⁾の方法に従い、Immobilon P またはImmobilon P⁸⁰(ともにミリポア)に電氣的に転写した。転写された膜上のポリペプチドを、自動蛋白配列解析装置(model 477A, Applied Biosystems)及びこれにオンライン接続されたフェニルチオヒダントイン(PTH)誘導体解析装置(model 120A, Applied Biosystems)にて解析を行った。

5) cDNAのクローニングと解析

総RNAは、新鮮なブタ十二指腸粘膜を材料として、グアニジン・イソチオシアネート法により抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心にて精製した¹⁶⁾。ポリA-RNAはOligotex dT-30 super(タカラ)を用いて単離した。二本鎖cDNAは、cDNA合成システム・プラス(アマシャム)を用い、5 μ gのポリA-RNAをテンプレート、ランダム・ヘキサヌクレオチドまたはオリゴdTをプライマーとして合成した¹⁷⁾。cDNAライブラリー作成にはcDNAクローニングシステム(アマシャム)を用いたが、ベクターのみはZAP II/EcoRI(Stratagene)を用いた。結果の項で述べる、53merのオリゴヌクレオチドの合成はサワディー・テクノロジー社に依頼した。このプローブは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$

ATP (6000 Ci/mmol, アマシャム) 及び Megalabel labeling kit (アマシャム) を用い、5' 末端標識法にて標識した。DNA断片のプロープについては、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (3000 Ci/mmol, アマシャム) 及び Megaprime labeling kit (アマシャム) を用いて、マルチプライム法にて標識した。ブランク・ハイブリダイゼーション法に用いる転写膜としてハイボンドN (アマシャム) を採用し、転写、固定、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションの条件は、この転写膜の推奨条件に従った。但し、53merのオリゴヌクレオチド・プロープを用いる際には、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションの温度は45°Cとし、最終洗いの条件は $2\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 、50°Cとした。クローン化されたcDNA/ファージベクターDNAは、pBluescript ファージミッドに自動切り出しにて変換し、この2本鎖ファージミッドDNAをDNA配列解析のテンプレートとして用いた。DNA配列解析はSanger法¹⁸⁾にてTaq dye primer sequencing kit、サーマル・サイクラー (model PJ 480, Perkin-Elmer) 及び自動DNA配列解析装置 (model 370A, Applied Biosystems) を用いて行った。

6) L鎖三次構造のコンピュータ・モデリング

L鎖のホモロジー・サーチは、Brookhaven Protein Data Bankのデータに対し、検索プログラム、the multiple alignment system for protein sequences¹⁹⁾を用いて行った。L鎖配列を、三次構造既知の一次構造上ホモロジーの高い28の蛋白の配列と比較し、挿入・欠損のパターンが近い蛋白が存在するように13のsegmentに分割した。各々のsegmentに対し、第一に挿入・欠損が最小となるように、第二にホモロジーが最大となるようにとの基準で、ホモロジー蛋白のリストより一蛋白を選択した。このようにして、13のsegmentをつなぎ合わせた、いわばカメラ参照蛋白が作成された。具体的には以下の通りである[PDBコード (蛋白名), アミノ酸残基番号の順で記す]: 1HNE (human neutrophil

elastase), 800-814, 815-825, 839-856; 1DWB (human thrombin) 826-838, 869-892; 3RP2 (A chain, rat mast cell protease II), 857-868; 4CHA (A chain, bovine α -chymotrypsin), 893-930, 988-1003, 1018-1034; 3EST (porcine pancreatic elastase), 931-944; 1SGT (*Streptomyces griseus* trypsin), 945-971; 1TLD (bovine β -trypsin), 972-987, 1004-1017. Gly⁸⁴⁴-Arg⁸⁴⁵については、6TIM (triose-phosphate isomerase) 中の Leu²²²-Tyr-Gln-Gln-Arg-Asp-Val-Asn²²⁹ の Gln-Arg の主鎖座標を用いて、参照蛋白 1HNE に挿入した。このようにして作成されたキメラ参照蛋白をもとに、Kajihara らの方法¹⁹⁾ に従って L 鎖の三次構造モデルを構築した。L 鎖と Val-(Asp)₄-Lys との結合モデルについては、上記モデルを基礎として、3SGB (proteinase B from *S. griseus* complexed with the third chain of turkey ovomucoid inhibitor) 中の阻害剤部分中の Lys¹³-Pro-Ala-Cys-Thr-Leu¹⁸ の主鎖座標を Val-(Asp)₄-Lys の初期配置座標として用い、同様の方法でモデル作成を行った。

III. 結果

1) 精製及び構造的性質について

ブタ十二指腸40頭分より、0.42mgの酵素が、収率6.4%、729倍に精製された(表1)。ゲル濾過法にて、精製酵素の分子量は約20万と推定された。図1aに示すように、還元条件下でのSDS-PAGE(4~20%濃度勾配ゲル)では分子量152KのH鎖、48KのL鎖に加え、色素泳動先端部近くに数本のバンドのクラスターが再現性をもって観察され、このクラスターをミニ鎖(M鎖)と命名した。15~25%濃度勾配ゲルにて泳動すると、図1bに示すように、M鎖は分子量16Kから19Kにわたる5本以上のバンドより成ることが判明した。非還元条件下でのSDS-PAGEでは、M鎖と分子量200Kのバンドが観察された(図1c)。従って、精製酵素は共有結合したH鎖、L鎖及び、この2鎖の両方またはいずれかと非共有結合したM鎖より成るものと結論された。

H鎖およびL鎖のアミノ末端アミノ酸配列は、各々、SVIVIFDLLFAQWVSDENIKEELIQGIEA(29残基)およびIVGGXDSREGAXPXVVALYYNGQLLXGASLV(31残基)であった。M鎖については、電気泳動的に分離された3本のバンドにつき解析を行ったが、すべてLGKSHEARGTMKITXGVTYNPNL(23残基)と同一の配列であった。アミノ酸配列分析におけるH、L、M鎖のPTH誘導体の収量のモル比は、平均して、約1:0.6:0.7であった。各鎖の転写収率および配列解析中のPTH誘導体収率のばらつきを考慮すれば、各鎖は等モル量で本酵素を形成しているものと考えられた。

2) ブタエンテロペプチダーゼcDNAクローンの単離及びその解析

H鎖アミノ末端配列の一部(Phe¹⁰~Ile²⁷)をもとに、16塩基のイノ

シンを含む、縮重度8倍、コード鎖の相補鎖側となる53merのオリゴヌクレオチドプローブをデザインし合成した: 5'-ATICCTGTATIA(A/G)ITCITCITTIATITTITCITCI(C/G)(T/A)IACCCAITGIGCIAA-3'。はじめに、このオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ランダムプライマーにて作製したcDNAライブラリーをスクリーニングした。約50万の独立したクローンから2つの陽性クローン(EKR-1および-2)が単離された。次に、EKR-1の挿入cDNA断片をプローブとして、オリゴdTプライマーにて合成したcDNAを1.5kb以上となるように分画した後に作製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。約50万の独立したクローンから11の陽性クローンを単離したが、このうち7クローンは、解析中に他のcDNAと融合した人工産物であると判明したため除外した。残る4クローン、EK-2, -3, -7, -11およびEKR-1, -2の両端の塩基配列解析および制限酵素地図作成の結果を図2に示す。これら6クローンはEK-7のEcoRIサイトを除き、基本的に同一の制限酵素地図を示した。また、EK-2が最長のクローンであると判定されたため、以降の配列解析は、EK-2を用いて行った。

3) EK-2の塩基配列及び推定アミノ酸配列

EK-2の塩基配列及び推定アミノ酸配列を図3に示す。本cDNAクローンは3597塩基対より成り、第3559塩基よりポリA付加シグナル及び3'末端にポリAが存在する。最も5'末端よりのATGコドンは真核生物の開始コドンの条件²⁰⁾を満たしており、このコドンを開始コドンとすればopen reading frameは3102塩基対、従って推定アミノ酸配列は1034残基となった。図内の囲み配列(第19-43残基)は、配列中、最も疎水性の高い領域である。M, H, L, 各鎖のアミノ末端配列は、各々、第52、118、800残基からの配列と一致した。従って、本酵素は分子量114,763の一本鎖の前駆体蛋白として合成されるものと考えられた。各鎖のカルボキシル末端側にさらにプロセシ

ングが起こらないものと仮定すると、M, H, L, 各鎖は、各々、66、682、235残基のアミノ酸より成ることとなる。このアミノ酸配列より計算にて求めた分子量は、SDS-PAGEより推定された分子量より相当小さい値となるが(表2参照)、この差はおそらく糖鎖修飾によるものと思われる。

PIR蛋白データベースにおいてFASTAプログラムにより本酵素の推定アミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、触媒鎖(L鎖)はトリプシン型、キモトリプシン型等のセリンプロテアーゼの触媒鎖とホモロジーが高いことが判明した(図4)。ヒトヘブシン²¹⁾、ヒト血漿カリクレイン²²⁾とは40%を超える残基の一致率を、また、ウシ酵素¹²⁾とは89.8%の一致率を示した。一方、H鎖については、いくつかの領域において、他の蛋白の一部分とのホモロジーが認められた。第195-236、及び654-692残基の2領域は互いにホモロジーがあり、かつ、補体C9²³⁾、low density lipoprotein (LDL) 受容体²⁴⁾等とのホモロジーが認められた(図5a)。第240-353および539-653残基の2領域についても、互いにホモロジーが認められ、かつ、dorsal ventral patterning protein²⁵⁾、補体C1r²⁶⁾、C1s²⁷⁾等とのホモロジーが認められた(図5b)。第772-788残基については、第X因子²⁸⁾ プロテインC²⁹⁾、ヘブシン²¹⁾等とホモロジーが認められた(図5c)。

4) コンピュータ・モデリングにより作成されたL鎖三次構造モデルについて

方法の項で述べた如く、キメラ参照蛋白を用いてL鎖及びウシトリプシノーゲンアミノ末端Val¹-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys⁶との複合体モデルを構築した。用いたキメラ参照蛋白は、前述の如く第839-856残基の第4区域内に2残基の挿入を伴っており、L鎖とは38.7%の残基の一致を示した。こうして作成された複合体モデル[座標データは請求により開示可]を図6aに示す。図6bには、L鎖活性部位付近の、ウシトリプシノーゲンアミノ末端6残基との相互作用領域を示す。酵素内の水素結合(His⁸⁴⁰N^{δ1}-Asp

$^{891}\text{O}^{\delta 1}$ 、 $\text{His}^{840}\text{N}^{\epsilon 2}-\text{Ser}^{986}\text{O}^{\gamma}$) およびイオン結合 ($\text{Arg}^{887}\text{N}^{\eta 2}-\text{Glu}^{962}\text{O}^{\epsilon 2}$) の計算上の距離は、各々、2.74, 3.06, 2.65 Å となった。基質・酵素側鎖間のイオン結合 ($\text{Arg}^{1015}\text{N}^{\eta 2}-\text{Asp}^2\text{O}^{\delta 1}$, $\text{Arg}^{886}\text{N}^{\eta 1}-\text{Asp}^3\text{O}^{\delta 1}$, $\text{Lys}^{888}\text{N}^{\zeta}-\text{Asp}^5\text{O}^{\delta 1}$) および主鎖間の水素結合 ($\text{Tyr}^{1008}\text{N}-\text{Asp}^2\text{O}$, $\text{Gly}^{1007}\text{N}-\text{Asp}^4\text{O}$, $\text{Gly}^{984}\text{N}-\text{Lys}^6\text{O}$) の距離は、各々、2.66, 2.76, 2.51 Å 及び 2.76, 2.77, 2.69 Å であった。

IV. 考察

本酵素のブタ組織からの精製法については、これまでいくつかの報告^{3)~5)}がみられる。このうちの一部^{3)~4)}はイオン交換、ゲル濾過のみで精製されており、精製酵素の電気泳動の結果もなく、純度にやや疑問があると思われる。また、他の報告⁵⁾では、我々も用いたbenzamidino-sepharoseをアフィニティー・カラムとして用いているが、ブタ酵素との結合性が低いため、リガンド密度を高くし、数種のバッファーで溶出するなど、微妙な実験条件を必要としている。我々の改変精製法は、イオン交換、ゲル濾過に加え、原理の異なる疎水性クロマトグラフィーを採用している点、benzamidino-sepharoseカラムにおいて、本カラム以前のステップで純度を20~30%に上げておき、retardation効果のみにて分離することで結合性の低さをカバーしている点が特徴であり、これらの改良により、容易に、再現性よく精製できるようになったものと考えられる。

こうして精製された酵素蛋白のアミノ末端配列情報をもとにして、EK-2なるcDNAをクローニングできたわけであるが、本cDNAが真にエンテロペプチダーゼのcDNAであるか否かについては若干の考察が必要である。EK-2の推定アミノ酸配列のうちL鎖にあたる配列は、図4に示した如く、他のセリンプロテアーゼ触媒鎖と相似であり、活性中心付近の構造も、後述のようにトリプシン型セリンプロテアーゼの条件を満たしていた。また、LaVallieら¹⁴⁾はウシ酵素のL鎖部分のみのcDNAクローニングを行い、この部分のみ、大腸菌にて発現させたところ、活性は低いもののエンテロペプチダーゼ特異的な活性がみられたと報告している。当然ではあるが、ウシ酵素と今回得られたブタ酵素の配列は89.8%と高い一致率を示しており、以上より、今回精製された蛋白、クローニングされたcDNAはブタエンテロペプチダーゼのものであるといえよう。

精製酵素蛋白は3本鎖であるが、これは、M, H, L鎖がこの順でコードされた1本鎖前駆体よりペプチド結合切断にて生ずるものと考えられる。以前の報告

⁴¹⁾によれば、ブタ酵素は134KのH鎖、62KのL鎖の2本鎖とされていた。また、ヒト酵素については3本鎖と報告されている¹⁰⁾。このうち2本の鎖の分子量は140K、54Kであり、ブタ酵素のH鎖、L鎖に相当するものと考えられる。しかしながら、第3の鎖の分子量は120Kと報告されており、ブタM鎖の16-19Kとは大きく異なっている。従って、M鎖は、今回、初めて指摘された本酵素の構成成分であると考えられる。但し、本酵素の機能に果たす役割については不明である。

さて、このM鎖が精製過程における人工産物である可能性についてはどうであろうか。純度が低く、精製過程での人工変化が生ずる可能性が高いと考えられる抽出・初期精製過程については、プロテアーゼ阻害剤も使われていないことを含め、これまでの報告³⁾⁻⁵⁾と本質的には同様の条件であった。また、M鎖は分子量が小さく、数本のバンドに分離しているため検出はかなり困難であり、30 μ gとかなり多くの精製酵素蛋白を、比較的高いゲル濃度(15-25%の濃度勾配ゲル)で泳動してようやく明瞭に検出される。従って、これまでの報告ではM鎖が検出できず、見逃されていた可能性が高いものと考えられる。各段階のクロマトグラフィーのパターンもすべて一峰性であり、分子的多型性を示唆する結果は得られていない。しかしながら、精製過程での人工変化の可能性は否定できず、今後、抗体を用いた未精製サンプルの検討などを通じて明らかになっていくものと思われる。

本酵素前駆体蛋白の推定アミノ酸配列のアミノ末端側には、成熟型酵素からは失われた51残基の配列が存在する。さらに、この配列中には膜貫通に十分な長さを持った疎水性領域(Val¹⁹-Ile⁴³)が存在する。本前駆体配列中には他には膜貫通領域ないし典型的シグナル配列は存在しないため、この疎水性領域はおそらくinternal signal sequence³⁰⁾⁻³²⁾であり、この領域を介して膜結合しているものと考えられた。エンテロペプチダーゼは十二指腸ないし上部小腸粘膜の冊子縁に局在していると報告されており³³⁾⁻³⁴⁾、また、その機能上、触媒

ドメインが細胞外（腸管腔内）のトリプシノーゲンと自由に接触できる向きで、膜を貫通していると考えられる。従って、前駆体蛋白のアミノ末端側が細胞内に、カルボキシル末端側が細胞外となる形、すなわち、Type II integral membrane protein [この命名法は、von Heijne and Gavel⁶¹⁾ による] として存在するものと考えられた。また、このType II の配置の形成には、細胞内への残留シグナルとして、膜貫通領域のアミノ末端側が陽電荷を帯びることが重要であると報告されているが^{3, 6)}、本前駆体蛋白の膜貫通領域及びその周辺配列もこの条件を満たしていた。

図7に模式的に示したように、精製ブタ酵素は、前駆体から、少なくとも3ヶ所のペプチド結合の切断により生ずると考えられる。また、Ala⁵¹-Leu⁵²間の切断により、本酵素は冊子縁膜より遊離し、可溶型となるものと推定される。興味深いことに、Toyotaらによれば、エラスターゼによりエンテロペプチダーゼ活性は冊子縁膜より遊離し、可溶画分に移行するという^{3, 6)}。また、このAla⁵¹-Leu⁵²間の切断については、周囲の配列を含め、エラスターゼの基質特異性に合致する。従って、膵より十二指腸内に多量に分泌されている点も考慮に入れると、エラスターゼがこのペプチド結合の切断に関与している可能性が示唆される。今回用いたブタ十二指腸でも抽出前には膜結合型、可溶型の活性が存在していたが、一旦、可溶化した後には、前述のように精製過程のクロマトグラム、精製酵素各鎖のアミノ末端配列等からは少なくともペプチド鎖の分子的多型性は認められなかった。十二指腸の抽出サンプルには豊富にエラスターゼが含まれているものと推定され、このため、抽出・初期精製過程においてAla⁵¹-Leu⁵²間が切断され、膜結合型が可溶型に変換された可能性が考えられるが、やはり、今後、抗体等を用いた未精製サンプルの検討が必要であると考えられる。また、Gly¹⁰⁷-Ser¹⁰⁸、Lys⁷⁹⁹-Ile⁸⁰⁰を切断するプロテアーゼは存在するには違いないと考えられるが、現時点では考察に値する情報、実験事実等はない。

H鎖内には第172-187残基に、16残基中12残基をSer/Thrが占めるといふ、Ser/Thrに富んだ配列が存在する。このような配列は、グリコフォリンA³⁷⁾、LDL受容体³⁸⁾、スクラーゼイソマルターゼ³⁹⁾、アミノペプチダーゼN⁴⁰⁾等にもみられており、ムチン型糖鎖付加可能部位と考えられている。実際、ヒトエンテロペプチダーゼに対するポリクローナル抗体が、A型血液型抗原と交差反応を示したとの報告⁴¹⁾があるが、この事実は本酵素がムチン型糖鎖の修飾を受けていることを示している。従って、H鎖中のこのSer/Thrに富んだ配列は、ムチン型糖鎖の結合部位である可能性が示唆される。さらに、本酵素内には、22ヶ所ものアスパラギン結合型糖鎖付加可能部位が存在するが、この事実は、本酵素が著しい糖鎖修飾を受けているとのこれまでの報告^{42)・6)・7)}と合致する。今回の我々の研究からは、ブタエンテロペプチダーゼの糖の含有率は、総重量の50%程度もの割合を占めるものと評価された(表2)。

前述のように、H鎖中には2種の繰り返し配列が見られている。このうちの1種は、38アミノ酸残基の2回繰り返し配列であり、配列中のアミノ酸残基の一致率は約30%で、6つのシステイン残基の位置は保存されていた(図5a)。本酵素中のジスルフィド結合の位置は未だ決定されていないが、これら6残基のシステインは、各繰り返し配列内で、3つのジスルフィド結合をしている可能性が高いものと考えられる。また、本繰り返し配列は、補体成分C9²³⁾、LDL受容体²⁴⁾等の一部配列とホモロジーが高い。LDL受容体においては、この相同配列は7回繰り返し配列となっており、アポリipoproteinとの結合に関与していると考えられている³⁸⁾。また、補体C9ポリマーがアポリipoproteinに親和性を持つことが、最近報告された⁴¹⁾。これらの事実から類推すると、エンテロペプチダーゼ中のこの6残基のシステインを含む繰り返し配列も、アポリipoprotein等、他の蛋白との相互作用部位である可能性ありと考えられる。図5bに示すように、H鎖内には、さらに1種の繰り返し配列が存在する。この繰り返し配列相互の残基一致率は約25%で、補体成分C1r²⁶⁾、C1s²⁷⁾等の

部分配列とホモロジーを有するが、現時点では、機能については全く不明である。これらに加え、H鎖カルボキシル末端近傍には、いくつかの他のセリンプロテアーゼ非触媒鎖の該当部位と、低いながらも存在するホモロジーを有する配列が見られる(図5c)。プロテインC²⁹⁾ や第X因子⁴²⁾ においては、前駆体からの活性化プロセスの際、この領域と触媒鎖アミノ末端との間のmono- ないしdibasic 部位での切断が起こることが知られている。類推すれば、エンテロペプチダーゼ前駆体は、はじめにdibasic 部位、Lys⁷⁸⁹-Lys⁷⁹⁰にて切断され、さらにL鎖アミノ末端部位にて切断され活性化されるものと推測される。

一方、L鎖はセリンプロテアーゼ触媒鎖と高いホモロジーを有する(図4)。また、L鎖三次構造モデルにおいては、触媒triad であるHis⁸⁴⁰、Asp⁸⁹¹、Ser⁹⁸⁶ およびS1ポケット[この命名法はBerger and Schechter⁶⁰⁾ の論文に依っている]はトリプシン⁴³⁾ と基本的に同じ配置をとっている。加えて、S1ポケット中の底部に位置するAsp⁸⁸⁰、頸部に位置するGly¹⁰⁰⁷とGly¹⁰¹⁷も保存されている。これらは、本酵素がトリプシン型のセリンプロテアーゼであることを意味する。また、本酵素は、酸性アミノ酸残基をP2~P5位に要求するという、厳密な基質特異性を示すことが知られているが、この事実から、基質側鎖と結合する、S2~S5にあたるサブサイトの存在が想定される。また、化学修飾法により、本酵素の基質特異性にはリジン残基の存在が重要であることが報告されている⁴⁴⁾。今回、我々が作成したブタL鎖と基質アミノ末端ペプチド(Val¹-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys⁶)との結合モデル(図6b)では、セリンプロテアーゼ・ファミリー中でもエンテロペプチダーゼ特異的である(図4)、Arg⁸⁸⁵-Arg-Arg-Lys⁸⁸⁸なる塩基性アミノ酸残基のクラスターが、S1ポケットに隣接してターン構造をとり、基質のAsp²-Asp-Asp-Asp⁵と3つの強力なイオン結合を介して結合していることが示された: 即ち、Arg¹⁰¹⁵とAsp²、Arg⁸⁸⁶とAsp³、Lys⁸⁸⁸とAsp⁵の3つのイオン結合である。この結果は、エンテロペプチダーゼの基質特

異性においては、P 2 位の酸性アミノ酸残基は必須であり、P 3 ~ 5 位の酸性アミノ酸残基は有利に働くとのこれまでの報告^{33, 83} に合致すると考えられる。ウシL鎖においては、Arg⁸⁸⁸はLysに置換されているが¹²⁾、この置換は基質との結合には大きな影響はないものと考えられる。また、Arg⁸⁸⁷はGlu⁹⁶²とイオン結合をしていた。本モデルでは、基質ペプチド中のAsp⁴のカルボキシル基は酵素との結合がみられなかったが、本モデル中の基質ペプチドとウシトリプシノーゲン三次構造の当該部をオーバーラップさせるという、ラフなモデリングを行ったところ、このカルボキシル基と基質中のLys¹⁷⁶の側鎖がイオン結合する可能性が考えられた。さらに、主鎖についても、Asp²⁰OとTyr¹⁰⁰⁸N、Asp⁴OとGly¹⁰⁰⁷N、Lys⁴OとGly⁹⁸⁴Nの3つの水素結合を介して相互作用していることが示された。以上のように、エンテロペプチダーゼの特殊な基質特異性は明快に説明されたものと考えられた。

先に述べたとおり、本酵素は腸管消化におけるKey Enzymeであり、腸管消化、消化管、消化関連器官の分化、膵炎・術後逆流性食道炎等の病態等を研究していく上で、きわめて重要な位置を占めていくものと考えられる。具体的に今後の研究テーマ、とくに医学的側面からの研究テーマを考えると、生理的条件下における消化酵素活性化の調節・制御、十二指腸粘膜への局在及び十二指腸粘膜の発生・分化との関連、発現・活性制御の機構、腸上皮化生粘膜・消化管癌組織における発現、先天的欠損症の発症のメカニズム、膵炎・術後逆流性食道炎等の病態に果たす役割、特異的阻害剤の開発と病態への臨床応用といったテーマが容易に発想される。しかしながら、これまではこれらの研究の成果はほとんど得られていない。この理由としては、一次構造情報の欠如のため、近年の研究手段として不可欠であると考えられる遺伝子工学的手法を十分に活用できていないことが、やはり、その多くを占めているものと考えられる。本酵素の全一次構造が明らかとなり、触媒鎖高次構造が推定されたことにより、今後、本酵素に関わる研究が急速に進展することが期待される。

謝辞：コンピュータ・モデリングに関して共同研究をして頂いた、北里大学薬学部、四宮和子、梅山秀明両先生、蛋白精製、酵素学的分析、cDNA単離・解析につき直接のご指導を頂いた東京大学理学部、高橋孝行先生（現、北海道大学理学部）、井上英史先生（現、東京薬科大学生命科学部）、貴重なご助言を頂いた東京大学理学部、田代康介、塩川光一郎両先生、Senarath B. P. Athauda 先生、本研究テーマの選択と研究内容に関する御助言と御指導を頂き、研究遂行の機会を与えてくださった東京大学第一内科、一瀬雅夫、三木一正両先生、東京大学理学部、高橋健治先生（現、東京薬科大学生命科学部）、御校閲ならびに貴重なご助言を頂いた東京大学第一内科、黒川清先生に深謝いたします。

文献

1. Light, A., and Janska, H. Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects. *TIBS* 14, 110-112, 1989.
2. Ghishan, F.K., Lee, P.C., Lebenthal, E., Johnson, P., Bradley, C.A., and Greene, H.L. Isolated congenital enterokinase deficiency: recent findings and review of the literature. *Gastroenterology* 85, 727-731, 1983.
3. Maroux, S., Baratti, J., and Desnuelle, P. Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 246, 5031-5039, 1971.
4. Baratti, J., Maroux, S., Louvard, D., and Desnuelle, P. On porcine enterokinase: further purification and some molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* 315, 147-161, 1973.
5. Grant, D.A.W., and Hermon-Taylor, J. Purification of porcine enterokinase by affinity chromatography. *Biochem. J.* 147, 363-366, 1975.
6. Grant, D.A.W., and Hermon-Taylor, J. The purification of human enterokinase by affinity chromatography and immune adsorption. *Biochem. J.* 155, 243-254, 1976.
7. Liepnieks, J.J., and Light, A. The preparation and properties of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 254, 1677-1683, 1979.
8. Light, A., Savithri, H.S., and Liepnieks, J.J. Specificity of bovine enterokinase toward protein substrates. *Anal. Biochem.* 106, 199-206, 1980.
9. Fonseca, P., and Light, A. The purification and characterization of bovine enterokinase from membrane fragments in the duodenal mucosal fluid. *J. Biol. Chem.* 258, 14516-14520, 1983.

10. Magee, A.I., Grant, D.A.W., and Hermon-Taylor, J. Further studies on the subunit structure and oligosaccharide moiety of human entero-kinase. *Clin. Chim. Acta* 115, 241-254, 1981.
11. Light, A., and Fonseca, P. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 259, 13195-13198, 1984.
12. LaVallie, E.R., Rehemtulla, A., Racie, L.A., DiBlasio, E.A., Ferenz, C., Grant, K.L., Light, A., and McCoy, J.M. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 268, 23311-23317, 1993.
13. Bradford, N.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
14. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
15. LeGendre, N., and Matsudaira, P. "Gel electrophoresis" in A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing (Matsudaira, P., ed.), pp.52-72, Academic Press, San Diego, 1989.
16. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J., and Goodman, H.M. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196, 1313-1319, 1977.
17. Gubler, U., and Hoffman, B.J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269, 1983.
18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467, 1977.

19. Kajihara, A., Komooka, H., Kamiya, K., and Umeyama, H. Protein modelling using a chimera reference protein derived from exons. *Protein Engineer.* 6, 615-620, 1993.
20. Kozak, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12, 857-872, 1984.
21. Leytus, S.P., Loeb, K.R., Hagen, F.K., Kurachi, K., and Davie, E.W. A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. *Biochemistry* 27, 1067-1074, 1988.
22. Chung, D.W., Fujisawa, K., McMullen, B.A., and Davie, E.W. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 27, 1067-1074, 1988.
23. DiScipio, R.G., Gehring, M.R., Podack, E.R., Kan, C.C., Hugli, T.E., and Fey, G.H. Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of human complement component C9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7298-7302, 1984.
24. Südhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228, 815-822, 1985.
25. Shimell, M.J., Ferguson, E.L., Childs, S.R., and O'Connor, M.B. The drosophila dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is relate to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* 67, 469-481, 1991.
26. Journet, A., and Tosi, M. Cloning and sequencing of full-length cDNA encoding the precursor of human complement component C1r. *Biochem. J.* 240, 783-787, 1986.

27. Mackinnon, C.M., Carter, P.E., Smyth, S.J., Dunbar, B., and Fothergill, J.E. Molecular cloning of cDNA for human complement component C1s. *Eur. J. Biochem.* 169, 547-555, 1987.
28. McMullen, B.A., Fujisawa, K., Kisiel, W., Sasagawa, T., Howald, W.N., Kwa, E.Y., and Weinstein, B. Complete amino acid sequence of the light chain of human blood coagulation factor X. *Biochemistry* 22, 2875-2884, 1983.
29. Foster, D., and Davie, E.W. Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4766-4770, 1984.
30. Bos, T.J., Davis, A.R., and Nayak, D.P. NH₂-terminal hydrophobic region of influenza virus neuraminidase provides the signal function in translocation. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 81, 2327-2331, 1984.
31. Spiess, M., and Lodish, H.F. An internal signal sequence: the asialoglycoprotein receptor membrane anchor. *Cell* 44, 177-185, 1986.
32. Schmid, S.R., and Spiess, M. Deletion of the amino-terminal domain of asialoglycoprotein receptor H1 allows cleavage of the internal signal sequence. *J. Biol. Chem.* 263, 16886-16891, 1988.
33. Hermon-Taylor, J., Perrin, J., Grant, D.A.W., Appleyard, A., Bubel, M., and Magee, A.I. Immunofluorescent localization of enterokinase in human small intestine. *Gut* 18, 259-265, 1977.
34. Lojda, Z., and Gossrau, R. Histochemical demonstration of enteropeptidase activity: new method with a synthetic substrate and its comparison with the trypsinogen. *Histochemistry* 78, 251-270, 1983.
35. Hartmann, E., Rapoport, T.A., and Lodish, H.F. Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5786-5790, 1989.

36. Toyoda, S., Lee, P.C., and Lebenthal, E. Physiological factors controlling release of enterokinase from rat enterocytes. *Dig. Dis. Sci.* 30, 1174-1180, 1985.
37. Tomita, M., Furthmayr, H., and Marchesi, V.T. Primary structure of human erythrocyte glucophorin A: isolation and characterization of peptides and complete amino acid sequence. *Biochemistry* 17, 4756-4770, 1978.
38. Soutar, A.K., and Knight, B.L. Structure and regulation of the LDL-receptor and its gene. *Brit. Med. Bull.* 46, 891-916, 1990.
39. Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G., and Lodish, H.F. The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. *Cell* 46, 227-234, 1986.
40. Watt, V.M., and Yip, C.C. Amino acid sequence deduced from a rat kidney cDNA suggests it encodes the Zn-peptidase aminopeptidase N. *J. Biol. Chem.* 264, 5480-5487, 1989.
41. Hamilton, K.K., Zhao, J., and Simo, P.J. Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement: affinity of the apoproteins for polymeric C9. *J. Biol. Chem.* 268, 3632-3638, 1993.
42. Leytus, S.P., Chung, D.W., Kisiel, W., Kurachi, K., and Davie, E.W. Characterization of a cDNA coding for human factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3699-3702, 1984.
43. Stroud, R.M., Kay, L.M., and Dickerson, R.E. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Angstrom and at 2-7 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 83, 185-208,

1974.

44. Baratti, J., and Maroux, S. On the catalytic and binding sites of porcine enteropeptidase. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 488-496, 1976.
45. Fujikawa, K., Chung, D.W., Hendrickson, L.E., and Davie, E.W. Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prokallikrein. *Biochemistry* 25, 2417-2424, 1986.
46. Vanderslice, P., Craik, C.S., Nadel, J.A., and Caughey, G.H. Molecular cloning of dog mast cell tryptase and a related protease: structural evidence of a unique mode of serine protease activation. *Biochemistry* 28, 4148-4155, 1989.
47. Mikeš, O., Holeyšovsky, V., Tomášek, V., and Šorm, F. Covalent structure of bovine trypsinogen: the position of the remaining amides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 346-352, 1966.
48. Hartley, B.S. Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen A. *Nature* 201, 1284-1287, 1964.
49. Meloun, B., Kluh, I., Kostka, V., Moravek, L., Průsik, Z., Vaněček, J., Keil, B., and Šorm, F. Covalent structure of bovine chymotrypsinogen A. *Biochim. Biophys. Acta* 130, 543-546, 1966.
50. Hartley, B.S., and Kauffmann, D.L. Corrections to the amino acid sequence of bovine chymotrypsinogen A. *Biochem. J.* 101, 229-231, 1966.
51. Blow, D.M., Birktoft, J.J., and Hartley, D.S. Role of a buried acid group in mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221, 337-340, 1969.
52. Kawashima, I., Tani, T., Shimoda, K., and Takiguchi, Y. Characterization

- of pancreatic elastase II cDNAs: two elastase II mRNAs are expressed in human pancreas. DNA(N.Y.) 6, 163-172, 1987.
53. DiScipio,R.G., Chakravarti,D.N., Muller-Eberhard,H.J., and Fey,G.H. The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex. J. Biol. Chem. 263, 549-560, 1988.
54. Rao,A.G., Howard,O.M.Z., Ng,S.C., Whitehead,A.S. Colten,H.R., and Sodez,J.M. Sequence of the α subunit of human complement protein C8: existence of a separate α subunit messenger RNA. Biochemistry 26, 3556-3564, 1987.
55. Howard,O.M.Z., Rao,A.G., and Sodez,J.M. Complementary DNA and derived amino acid sequence of the β subunit of human complement protein C8: identification of a close structural and ancestral relationship to the α subunit and C9. Biochemistry 26, 3565-3570, 1987.
56. Herz,J., Hamann,U., Rogne,S., Myklebost,O., Gausepohl,H., and Stanley,K.K. Surface location and high affinity for calcium of a 500 -kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as a lipoprotein receptor. EMBO J. 7, 4119-4127, 1988.
57. Murdoth,A.D., Dodge,G.R., Cohen,I., Tuan,R.S., and Iozzo,R.V. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/Perlecan). J. Biol. Chem. 267, 8544-8557, 1992.
58. Raychowdhury,R., Niles,J.L., McCluskey,R.T., and Smith,J.A. Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. Science 244, 1163-1165, 1989.

59. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kritz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534, 1988.
60. Berger, A., and Schechter, I. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B257*, 249-264, 1970.
61. von Heijne, G., and Gavel, Y. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 174, 671-678, 1988.
62. Komooka, H., and Umeyama, H. Expert system for analyzing amino acid sequence of proteins. Abstracts of the 14th symposium on Chemical Information and Computer Science, Kawaguchi, pp.71-73, Chemical Society of Japan, Tokyo, 1991.

表 1

ブタ十二指腸エンテロペプチダーゼの精製

Step	Total protein	Total activity	Specific activity	Yield	Purification
	mg	*EKU	EKU/mg protein	%	-fold
Crude Extract	4,730	157,000	33.2	100	1
DE-52	304	58,300	192	37.1	5.8
Butyl Toyopearl	35.2	27,500	720	17.5	21.7
Sephacryl S-300	2.94	13,300	4,530	8.5	136
Benzamidine- Sephacryl	0.42	10,000	24,200	6.4	729

**EKU* は、37°C、30分で活性化されるトリプシンの量 (nmol) で定義される。

表 2

構成各鎖の
SDS-PAGEからの推定分子量と推定アミノ酸配列からの計算分子量の比較
および
アスパラギン結合型糖鎖付加可能部位の数

	Molecular weight /10 ³		Number of potential asparagine-linked glycosylation sites
	*Calculated	Measured by SDS-PAGE	
M chain	7.5	16-19	1
H chain	75.4	152	17
L chain	26.4	48	4

*計算分子量は各鎖のカルボキシル末端側にさらにプロセシングが起こらないものと仮定して計算された。

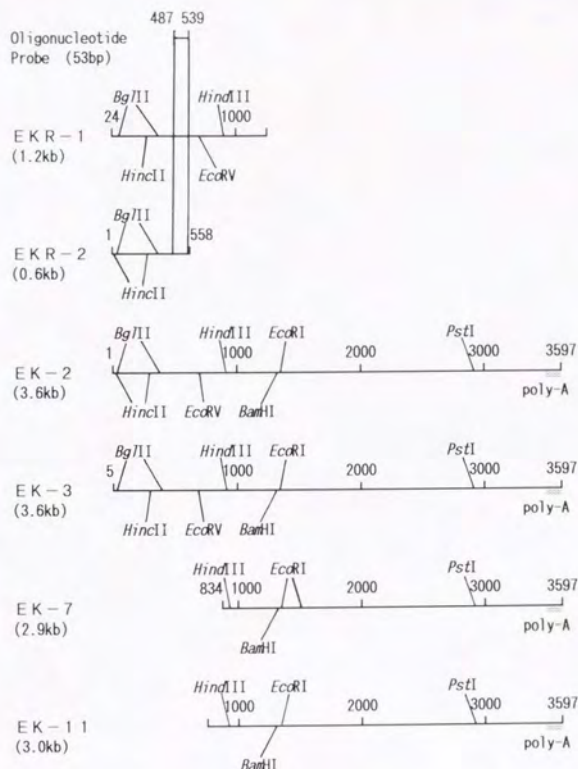


図 2 陽性クローンの制限酵素地図

塩基番号は最長クローン、E K - 2 に準じた。E K R - 1, - 2 はランダムプライマー使用ライブラリーの、E K - 2, 3, 7, 11 はオリゴ d T プライマー使用ライブラリーのスクリーニング陽性クローンである。E K - 7 の *Eco*RI サイト以外は、基本的に同じ制限酵素サイトの配置をとっている。

1	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

図3 E K-2の全塩基配列および推定アミノ酸配列

囲み配列はinternal signal sequenceと考えられる、唯一の疎水性領域を示す。下線配列a, b, cは、各々、M, H, L鎖のアミノ末端配列と一致した配列を示す。第3559~3564塩基の下線は、ポリA付加シグナル配列を示す。反転文字で示したAsn残基は、アスパラギン結合型糖鎖付加可能部位を示す。2重下線部はムチン型糖鎖付加部位の可能性が考えられている、Ser/Thrクラスターを示す。下に***をつけた3つの残基は、触媒作用に不可欠なtriadを示す。

a. C9/LDL-receptor type region

Interopeptidase	(195-236)	VSIECLPGSRPGADALKCI AVDLFCGGELCPDGSDEDSKIC
	(654-692)	IPPECKEDNQCEN-GEVLLVDICDGFSTCKDESDEAH-C
Consensus sequences		
LDL receptor		---TC---EF-C---G-CI---W-CD---DC-DGSDE---C
Terminal complement components		E-CG--DFQC-T-GRCKRRL-CDGD-DCGD-SDEDD-C
LDL receptor related protein		---C---F-C---RCIP-W-CDG-DC-D-SDE---C
Perlecan		P-PC-P-EF-C---C---C-CD-D-SDE---C
GP-330		C---F-C---CI---CDG-DC-DGSDE---C

b. C1r/s type region

Interopeptidase	(240-353)	CGGKFLTSSGSF-DAAYPKL-SEASVQCMILRVNGLSIELNFESY-INTYSM----
	(539-653)	CGGPFELWEPNTTF-TSMNTPNN-YFNQAFQVMNLNAQNGKNIQMFEE-FOLENTIA----
Consensus sequence		CC-L-T-G-T-S-P-Y-P-Y-P-C-M-L-A-G-V-L-E-ELE-----
(C1r/s, DVPP, BMP-1)		V
		---DVNLNYEGVGSSKILRASLWM---NPGTIRFSNQVITVLTIESENDYL-GFNATYYAFNSTE
		---DVVEIDRGEEDDSLLA-VYTG---PQVEDVFSTINRMVDFINDALTKG-GEXANITTYGHLG
		C-YD-L-L-L-G-----G-CG-P-P-V-T-N-L-L-F-S-S-----GSIA-----
		V

c. Carboxyl terminal region of the non-catalytic chain

Interopeptidase	(772-788)	G---FEDSLILLQNHKS---CG
Hepsin	(140-154)	CPGRFLAAI---QDD---CG
Factor X	(111-133)	CARGYTLADNGKACIPTGPPPCG
Protein C	(120-142)	CAPGYKLGDDLLCHPAVKFFPCG

図5 H鎖中の部分配列と他蛋白の相似配列との比較

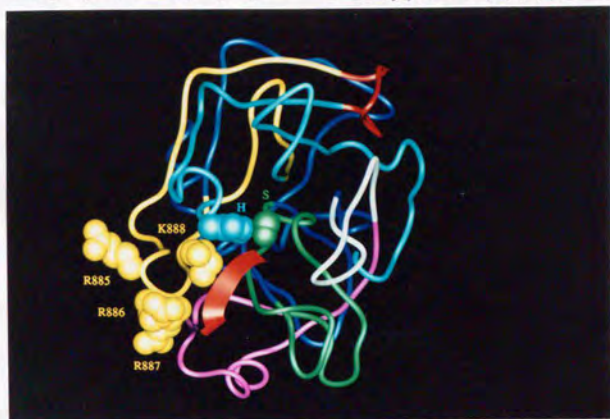
a, C9/LDL受容体タイプの、6残基のシステインを含む繰り返し配列。ヒトLDL受容体²⁴⁾、ヒト補体成分(C7⁵³⁾、C8 α ⁵⁴⁾、C8 β ⁵⁵⁾、C9²³⁾)、ヒトLDL受容体関連蛋白⁵⁶⁾、ヒトperlecan⁵⁷⁾、ラットGP-330⁵⁸⁾のコンセンサス配列と比較した。これら7配列中で、6配列以上一致した残基を囲んで示した。

b, C1r/sタイプの繰り返し配列。C1r²⁶⁾、C1s²⁷⁾、dorsal-ventral patterning protein (DVPP)²⁵⁾、BMP-1⁵⁹⁾のコンセンサス配列²⁵⁾と比較した。このコンセンサス配列とエンテロペプチダーゼ配列間で、一致した残基を囲んで示した。

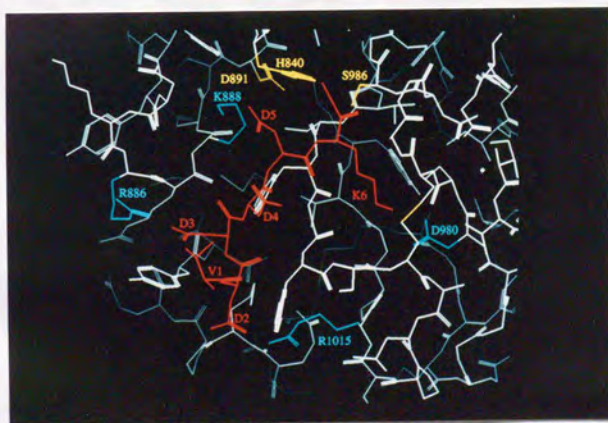
c, 非触媒鎖カルボキシル末端近傍の配列。ヒトヘプシン²¹⁾、ヒト第X因子⁴²⁾、ヒトプロテインC²⁹⁾の当該配列と比較した。4配列全てに保存されている残基を囲んで示した。

a, b, c中、括弧内の数字は残基番号を、“-”はホモロジー最大とするために挿入した欠失残基を、“.”はコンセンサス外の残基を示す。

図6 コンピュータ・モデリングにて作成した、
ブタエンテロペプチダーゼL鎖の三次構造モデル



a, 主鎖チューブ・モデルを示す。キメラ参照蛋白構成成分の、3RP2、1TLD、1DWB、4CHA、1SGT、1HNE、3EST由来の領域を、各々、赤、緑、黄、青、赤紫、青緑、白で示した。塩基性アミノ酸残基クラスターArg⁸⁸⁵-Arg-Arg-Lys⁸⁸⁸の側鎖を黄色、活性部位のHis⁸⁴⁰とSer⁹⁸⁶の側鎖を各々、青緑と緑のCorey-Pauling-Koltunモデルで示した。赤のリボン・モデルは基質アミノ末端ペプチド、Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysの主鎖を示す。



b, 基質アミノ末端ペプチドであるVal-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysと酵素活性部位付近の相互作用領域を、スティック・モデルで示す。基質部分は赤で、触媒triad、Asp⁸⁹¹、His⁸⁴⁰、Ser⁹⁸⁶の側鎖は黄色で、基質側鎖と相互作用している酵素側のアミノ酸残基側鎖を青で、各々、示した。

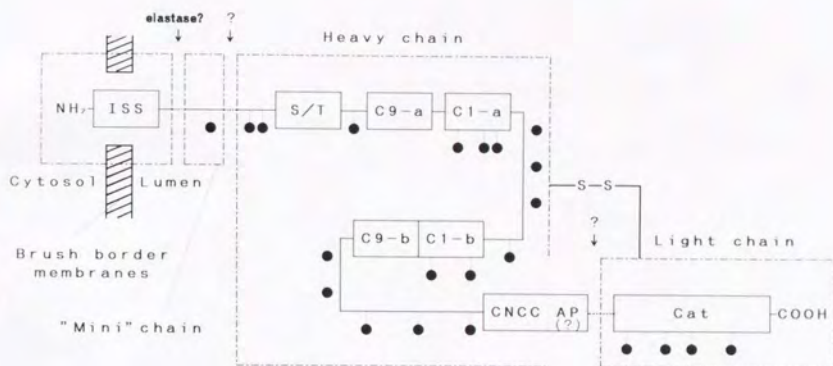


図7 ブタエンテロペプチダーゼの全体構造模式図

ISS : internal signal sequenceと想定される配列

S/T : セリン、スレオニンの集中した配列

C9-aおよびb : C9/LDL受容体タイプ配列 (図5a)

C1-aおよびb : C1r/sタイプ配列 (図5b)

CNCC : 非触媒鎖カルボキシル末端近傍配列 (図5c)

AP : 想定される活性化ペプチド

Cat : 触媒ドメイン

”●” は、アスパラギン結合型糖鎖付加可能部位を、”↓” は想定されるプロセシング部位を示す。

