

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 23 年度博士課程 入学

氏 名 劉 徳生

指導教員名 田之倉 優

論文題目

Analysis of Serine Protease Inhibition Mechanism by Oryctin, a Beetle Protein with a Unique Amino Acid Sequence

(独特のアミノ酸配列を有するカブトムシ由来タンパク質オリクチンの
セリンプロテアーゼ阻害機構の解析)

オリクチンはタイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) の幼虫体液からの抗菌ペプチドの精製過程で単離された 66 アミノ酸残基のペプチドであるが、オリクチン自体には抗菌作用がなく、他のタンパク質やペプチドとアミノ酸配列も類似していないため、機能不明であった。当研究室の堀田ら (2010) はオリクチン分子の立体構造からその機能に迫ろうと、溶液 NMR 法によりオリクチンの立体構造を決定し、オリクチンがシチメンチョウのセリンプロテアーゼ阻害剤、オボムコイドインヒビター (OMTKY3) と立体構造が似ていることを明らかにし、さらにオリクチンも OMTKY3 と同様にセリンプロテアーゼ阻害活性を有することを明らかにした (α -キモトリプシンに対する $K_i = 0.39$ nM、ズブチリシン Carlsberg に対する $K_i = 1.4$ nM)。

本研究では、オリクチンによるセリンプロテアーゼ阻害機構を明らかにするために、 α -キモトリプシン (以後、キモトリプシン) またはズブチリシン Carlsberg (以後、ズブチリシン) との複合体の X 線結晶構造解析を行い、オリクチンが異なる族 (clan) に属する 2 種類のセリンプロテアーゼをどのように阻害するのか詳細に比較した。また、この X 線結晶構造解析の知見を利用して野生型オリクチンが阻害できないトリプシンを阻害可能にしたオリクチン変異体を得て、オリクチン(M14R 変異体)-トリプシン複合体の X 線結晶構造解析も行った。

1. オリクチン-キモトリプシン複合体およびオリクチン-ズブチリシン複合体の結晶構造解析、オリクチンによる阻害機構の比較

本研究では、オリクチンによる2つの異なる族 (clan) に属するセリンプロテアーゼ阻害機構について詳細に解析するために、オリクチン-キモトリプシン複合体およびオリクチン-ズブチリシン複合体の結晶構造解析の X 線結晶構造解析を行った。2種類の複合体の調製および結晶化の方法はほぼ同じである。

オリクチンは大腸菌 Shuffle T7 lysY (NEB) を宿主として、pET-32a (Novagen) を改変した発現用プラスミドを用いて、1 mM IPTG、30°C、6 時間の発現誘導条件下、融合タンパク質 TRX-His₆-tev-オリクチンを発現した。ここで TRX はチオレドキシントグ、His₆ はヒスタグ、tev は TEV プロテアーゼ切断部位である。可溶性画分から固定化 Ni²⁺ カラムで融合タンパク質を精製した後、TEV プロテアーゼ処理によりタグを切除し、陰イオン交換カラム HiTrap Q で精製することによりオリクチンを得た。これを市販のキモトリプシンまたはズブチリシンとモル比 3:1 で混合し、ゲルろ過 Superdex 200 によりオリクチン-セリンプロテアーゼ複合体を精製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

結晶化条件の探索、最適化および放射光施設での X 線回折実験により、オリクチン-ズブチリシン複合体については、温度 20°C、リザーバ組成 30%(w/v) PEG 3000, 100 mM CHES-NaOH pH 9.5 において空間群 $P2_12_12$ 、格子定数 $a = 68.6, b = 107.2, c = 41.4$ Å、最高分解能 1.9 Å の結晶 (結晶 A) が得られ、また、温度 20°C、リザーバ組成 20%(w/v) PEG 8000, 100 mM CHES-NaOH pH 9.5 においては空間群 $C222_1$ 、格子定数 $a = 55.4, b = 91.5, c = 126.1$ Å、最高分解能 2.1 Å の結晶 (結晶 B) が得られた。ズブチリシンの結晶構造 (PDB: 3UNX) をモデルとして分子置換法により、オリクチン-ズブチリシン複合体の結晶構造を決定した (結晶 A: $R_{\text{free}} = 20.8\%$ 、結晶 B: $R_{\text{free}} = 20.6\%$)。結晶 A と B とともに非対称単位中に、1 個のオリクチン-ズブチリシン (1:1) 複合体を含んでいた。両結晶構造ともに、ズブチリシンの活性部位にオリクチンのループ構造 (Leu11-Leu16) が疑似基質として結合していた。結晶 A と B の複合体の構造比較から、オリクチンの疑似基質ループとその他の領域 (コア構造) とは立体構造がある程度独立しており、オリクチンのコア構造とズブチリシンの相対的な向きにはある程度の自由度が見られた。結晶 A および B において (以下同じ)、相互作用界面は 724.4 Å² および 761.6 Å²、分子間水素結合数は 7 本および 17 本であった。ズブチリシンに結合した疑似基質ループは主鎖構造が分子内および分子間の水素結合により固定されており、触媒残基 Ser E221 側鎖 O^γ と基質の P1 部位に相当する Met I14 の主鎖カルボニル基が形成する角度が $\angle(\text{O}^\gamma \cdots \text{C}=\text{O}) = 82.3^\circ$ および 86.7° と、求核攻撃を

受けやすい Bürgi-Dunitz 角 ($\angle(\text{O}\cdots\text{C}=\text{O}) = 105^\circ \pm 5^\circ$) から外れているため、Ser E221 側鎖 O^γ による Met I14 カルボニル炭素への求核攻撃が起こりにくく、アシル-酵素中間体の形成にも至らない強固な複合体を形成していた。なお、 $\angle(\text{O}\cdots\text{C}-\text{N}) = 105.0^\circ$ および 102.4° 、原子間距離 ($\text{O}^\gamma\cdots\text{C}$) = 2.8 \AA および 2.8 \AA であった。

一方、オリクチン-キモトリプシン複合体の結晶については、前任者の鈴木達也、堀田彰一郎により、温度 20°C 、リザーバ組成 30%(w/v) PEG 3000, 100 mM CHES-NaOH pH 9.0, 100 mM glycine において空間群 $P2_1$ 、格子定数 $a = 58.7$, $b = 71.8$, $c = 91.1 \text{ \AA}$, $\beta = 92.9^\circ$ 、最高分解能 1.8 \AA の結晶 (結晶 C) が得られ、キモトリプシンの結晶構造 (PDB: 1CHO) をモデルとする分子置換法により、オリクチン-キモトリプシン複合体の結晶構造がほぼ決定されていた。私はこの複合体構造の最終精密化を担当し、 R_{free} 値の低下と立体化学の改善を達成した ($R_{\text{free}} = 23.6\%$)。結晶 C は非対称単位中に、3 個のオリクチン-キモトリプシン (1:1) 複合体を含んでいた。各複合体において、キモトリプシンの活性部位にオリクチンのループ構造 (Pro9-Leu16) が疑似基質として結合していた。結晶 C の 3 個の複合体の構造比較からも、上記と同様に、オリクチンの疑似基質ループとその他の領域 (コア構造) とは立体構造がある程度独立しており、オリクチンのコア構造とキモトリプシンの相対的な向きにはある程度の自由度が見られた。結晶 C の 3 個の複合体において (以下同じ)、相互作用界面は 827.9 \AA^2 , 785.8 \AA^2 , 816.8 \AA^2 、分子間水素結合数は 16 本、8 本、8 本、分子間塩橋数は 3 本、0 本、1 本であった。オリクチン-キモトリプシン複合体においても、疑似基質ループは主鎖構造が分子内および分子間の水素結合により固定されており、触媒残基 Ser E195 側鎖 O^γ と基質の P1 部位に相当する Met I14 の主鎖カルボニル基が形成する角度が $\angle(\text{O}\cdots\text{C}=\text{O}) = 94.9^\circ, 94.7^\circ, 94.8^\circ$ と、求核攻撃を受けやすい角度 ($\angle(\text{O}\cdots\text{C}=\text{O}) = 105^\circ \pm 5^\circ$) から外れているため、Ser E195 側鎖 O^δ による Met I14 カルボニル炭素への求核攻撃が起こりにくく、アシル-酵素中間体の形成に至らない強固な複合体を形成していた。なお、 $\angle(\text{O}\cdots\text{C}-\text{N}) = 91.6^\circ, 94.7^\circ, 94.6^\circ$ 、原子間距離 ($\text{O}^\gamma\cdots\text{C}'$) = $2.5 \text{ \AA}, 2.6 \text{ \AA}, 2.5 \text{ \AA}$ であった。

2. トリプシンを阻害可能なオリクチン変異体の作製およびオリクチン(M14R 変異体)-トリプシン複合体の結晶構造解析

オリクチンの野生型 (WT) はトリプシンを阻害しないが、キモトリプシンと

トリプシンは同じ族 (clan) のセリンプロテアーゼであり類似の立体構造を有するため、前章の複合体構造解析から、オリクチンの疑似基質ループ P1 部位の Met I14 を Arg または Lys に変異することによりトリプシン阻害能を獲得すると予測された。このことを実験で検証したところ、M14R および M14K 変異体はそれぞれ $K_i = 3.4 \text{ nM}$ および 22.3 nM でトリプシンを阻害した。特に前者はトリプシン阻害剤のロイペプチン ($K_i = 3.5 \text{ nM}$) と同等の阻害活性を示した。

より強いトリプシン阻害活性を示した M14R オリクチンについて、トリプシンとの複合体の結晶構造解析を行った。温度 20°C 、リザーバ組成 20%(w/v) PEG 3000, 100 mM MES-NaOH pH 6.6, 200 mM Li_2SO_4 において空間群 $P4_12_12$ 、格子定数 $a = b = 76.8$, $c = 310.9 \text{ \AA}$ 、最高分解能 2.1 \AA の結晶 (結晶 D) が得られ、トリプシンの結晶構造 (PDB: 4I8G) をモデルとする分子置換法により、M14R オリクチン-トリプシン複合体の結晶構造を決定した ($R_{\text{free}} = 23.8\%$)。結晶 D は非対称単位中に、3 個の M14R オリクチン-トリプシン (1:1) 複合体を含んでおり、トリプシンの活性部位に M14R オリクチンのループ構造が疑似基質として結合しており、P1 部位のアミノ酸残基側鎖の S1 ポケットにおける認識以外は、WT オリクチン-キモトリプシン (1:1) 複合体と同様の分子間相互作用が見られた。トリプシンの S1 ポケットはキモトリプシンの S1 ポケットよりも細長く、ポケットの底部に Asp が存在して、基質の P1 部位の Arg や Lys の側鎖と塩橋を形成することで複合体を安定化する。本研究の結晶構造解析の結果から、P1 部位が Met である WT オリクチンの場合、この塩橋を形成できないため、トリプシンと安定な複合体を形成できず、トリプシンを阻害できないことが示唆された。

3. 結論

本研究の結果から、オリクチンの疑似基質領域は、他のタンパク質性セリンプロテアーゼ阻害剤の疑似基質領域に対しアミノ酸配列相同性を有しないにもかかわらず、標的セリンプロテアーゼに結合した状態において主鎖の立体配座は類似しており、他の阻害剤と同様にセリンプロテアーゼへの強固な結合により阻害剤として機能することが明らかになった。セリンプロテアーゼは様々な生命活動に関わるだけでなく、食品・製薬・化学産業においても幅広く利用されている。今回明らかにしたオリクチンによるセリンプロテアーゼ阻害の分子機構が、新たなセリンプロテアーゼ阻害剤の開発等に寄与すると期待される。