

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 田 村 範 子 印/署名
2. 養成カリキュラム名：プロテアーゼネットワークとアミノ酸代謝に関する酵素群の基礎研究と産業利用開発
3. 養成カリキュラムの達成状況

プロテアーゼネットワークに関する酵素群の基礎研究については、ドイツ・マックスプランク生化学研究所との共同研究により、古細菌のエネルギー依存性プロテアーゼの下流で働く酵素群の結晶構造解析を進めた。その情報を基に様々な変異体を調製し、機能解析を進めた結果、興味深いデータを得ることができた。細胞内タンパク質分解の初期段階を担うエネルギー依存性プロテアーゼについても同研究所と共同研究を進め、分解様式や基質特異性などを明らかにすることができた。また、真核生物においてエネルギー依存的に分解を受けるタンパク質の網羅的解析のために分解シグナルを付加されたタンパク質を効率よく回収するシステムの開発にも参加し、特許出願を行った。

アミノ酸代謝に関する酵素群については、抗体を用いて酵素の細胞内動態を検討するために関連酵素を組換えタンパク質として生産し、マウスを用いて4種のモノクローナル抗体を作製した。作製した抗体については商品化・販売を行っている。

また、研究開発の過程で古細菌由来のタンパク質の実用化を目指した共同研究を東洋紡績株式会社と進め、特許を2件出願した。さらに、組換えタンパク質のハイスループットな精製を行うため、簡易な精製装置の開発にも参加し、PCT出願を行い将来的な実用化に向けて検討中である。

以上のことから本養成カリキュラムは、基礎研究、産業利用開発共に、ほぼ達成できたと思われる。

4. 成果 (A4版3枚程度)

プロテアーゼネットワークに関する酵素群の基礎研究

細胞内タンパク質はエネルギー依存性プロテアーゼ群によって6~12アミノ酸残基のオリゴペプチドへと初期分解される。これらオリゴペプチドは真核細胞においては抗原ペプチドとして抗原提示に用いられる以外あまり利用価値が無く、アミノ酸まで速やかに分解される必要がある。一般にオリゴペプチドはアミノペプチダーゼによってアミノ酸まで分解されると考えられてきたが、アミノペプチダーゼのオリゴペプチドに対する分解効率が悪い一方で、オリゴペプチドの細胞内半減期が非常に短いことから、オリゴペプチドの分解に関する新規ペプチダーゼの存在が考えられた。

真核細胞では細胞内タンパク質分解機構は複雑であり、多種多様なプロテアーゼ・ペプチダーゼが関与していると考えられる。このことから、より単純化された分解機構を持つ古細菌 *Thermoplasma acidophilum* を用いて個々の酵素の機能解析等を行うことによって、普遍的な分解機構の理解に繋げようと考えた。また、*T. acidophilum* 細胞はゲノムプロジェクトが終了しており、遺伝子解析からも検討することができることも利点である。

T. acidophilum には、エネルギー依存性プロテアーゼとして、プロテアソームと Lon プロテアーゼという全ての生物種に保存されている2種の酵素が存在している。プロテアソームは真核細胞においては、6種のATPaseを含む10種以上のサブユニットからなる制御因子と共にATP依存的にタンパク質を分解する。古細菌では6種のATPase成分のうち、S4と呼ばれるサブユニットの相同分子がホモオリゴマーのリング状複合体を形成し、プロテアソームと相互作用することによってタンパク質を分解する。しかし、*T. acidophilum* のゲノムにはS4ホモログが存在しないことから、S4の機能的相同分子の検索をすすめると共に、もう一つのエネルギー依存性プロテアーゼであるLonプロテアーゼについて、ドイツ・マックスプランク生化学研究所 Baumeister 教授の研究室との共同研究で解析を進めた。

Lon プロテアーゼをコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、組換えタンパク質を発現・精製し、機能解析を進めることにした。*T. acidophilum* の Lon プロテアーゼは真正細菌や真核細胞由来の Lon とは異なり、

N 末端側に 2 つの膜貫通ドメインが存在することが予想されたが、実際、組換えタンパク質として大腸菌で発現させたタンパク質が膜に結合していることが判明した。また、*T. acidophilum* 細胞においても同様の局在性を示すことが明らかになった。

-カゼインやインスリン B 鎖を基質として用いて Lon プロテアーゼによる分解パターンや分解産物の解析を進めた結果、プロテアソーム同様、Lon プロテアーゼは前進型の分解様式を持つプロテアーゼであることが判明した。また、分解産物のサイズはプロテアソームの分解産物より大きく、主に 8~12 アミノ酸残基のオリゴペプチドを産出することが分かった。さらに、疎水性アミノ酸残基の後ろを好んで切断することが明らかになり、このことは、Lon プロテアーゼが膜結合タンパク質の分解に関与していることを反映していると考えられた。これらの結果は、平成 15 年 6 月 15 日~19 日に行われた AAA タンパク質の国際学会で発表された。また、論文の作製を行い、現在投稿中である。

T. acidophilum 細胞では、エネルギー依存性プロテアーゼの下流で働く、オリゴペプチドを分解するプロテアーゼ群について詳しく研究されており、トリコーンプロテアーゼ(TRI)と 3 種のアミノペプチダーゼ (F1~F3) が協調的に働くことによってオリゴペプチドが速やかにアミノ酸へと分解されることが明らかになっている。個々の酵素についてさらなる機能解析を進めるため、マックスプランク生化学研究所の Baumeister 教授、Hartl 教授の研究室との共同研究により結晶構造解析を進めた。特に、F2 と F3 については、相互に高い相同性を持ち、触媒活性部位周辺の相同性は 80%以上を示す一方で、F2 は塩基性アミノ酸残基に、F3 は酸性アミノ酸残基に対して基質特異性を示すことから、これら酵素の基質特異性に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。

F2 と F3 の結晶構造解析の結果を基に基質特異性に関与すると考えられるアミノ酸残基を推定し、点変異を導入して活性を測定した。変異型組換えタンパク質を解析した結果、F2 様の基質特異性をもつ F3 タンパク質を得ることができた。一方、F3 様の基質特異性をもつ F2 タンパク質は得ることができなかったことから、基質特異性は推定した触媒活性部位周辺に局在するアミノ酸残基以外の複数のアミノ酸残基によって制御されている可能性も示唆された。また、構造解析の結果から、両アミノペプチダーゼの活性には N 末端領域と C 末端領域の相互作用が重要であることが示唆されたため、相互作用に関与するアミノ酸残基に点変異を導入し相互作用を失わせて活性を測定した。その結果、活性が消失したことからその重要性が確認された。この結果については平成 14 年 12 月 11 日~14 日まで横浜で行われた日本分子生物学会でポスター発表をした。また、現在論文も作成中である。

TRI についても結晶構造解析を進めていたが、平行して、触媒活性部位アミノ酸残基の同定のため TRI 相同タンパク質のアミノ酸配列のアライメントにより触媒活性部位と推定されるアミノ酸残基に点変異を導入し活性を測定した。その結果、746 番目のヒスチジン、965 番目のセリンをアラニンに置換した場合活性が消失したことから、これらアミノ酸が触媒活性アミノ酸であることが示唆された。この結果は 2001 年に Brandstetter ら(Nature Vol. 414 p466-470, 2001)によって発表された結晶構造解析の結果とも一致した。また、同論文において触媒活性アミノ酸として同定された 1024 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したところ活性が消失したことから、以上 3 つのアミノ酸残基が触媒活性部位を形成していることが明らかになった。

古細菌のタンパク質分解機構については日本語の総説として 3 報発表または印刷中である。

アミノ酸代謝に関する酵素群の基礎研究と産業利用開発

タンパク質の分解によって産出されたアミノ酸の代謝経路を解明するために、特に運動時に筋肉でエネルギー源として利用される必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)の代謝経路に注目した。分岐鎖アミノ酸は、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼと分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素(BCKDH)によって分解を受けるが、特に BCKDH は代謝の律速酵素であり、その反応は不可逆的である。また、BCKDH の活性はリン酸化・脱リン酸化によって制御されている。そこで、BCKDH と BCKDH をリン酸化して不活性型にするキナーゼについてそれら酵素の組織における分布や発現量の検討を行うためにモノクローナル抗体の作製を行った。

また、ピルビン酸からアセチル CoA を生じる反応を触媒する酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)は BCKDH と類似の構造および活性制御機構を持つため、BCKDH と比較検討される酵素である。特に活性を制御するホスファターゼ(PDP)とキナーゼ(PDK)はアイソザイムが数種ずつ存在しており、組織によってアイソザイムの分布や発現量に差があることが知られている。BCKDH を活性化するホスファターゼが発見されていないことから、PDP が BCKDH に対しても機能するか興味深いところである。以上のことから、PDP および PDK についてもモノクローナル抗体の作製を試みた。

この研究は、名古屋工業大学下村教授の研究室との共同研究で進めており、モノクローナル抗体を作製するための抗原として用いたタンパク質は、BCKDH に関してはラット由来の精製タンパク質を下村教授より

譲渡を受けた。BCKDH は E1、E1、E2 および E3 の 4 つのサブユニットから構成される高分子複合体であるが、E3 は精製過程で脱落してしまうため、E1、E1、E2 を含む精製タンパク質を用いて作製した。また、BCKDH キナーゼについては、遺伝子情報により発現ベクターを構築、大腸菌を用いて発現・精製した。PDP および PDK については、下村教授より PDP 2 種(PDP1、PDP2)、PDK 2 種(PDK2、PDP4)の発現ベクターの譲渡を受け、大腸菌を用いて発現・精製を試みた。

BCKDH キナーゼ、BCKDH の 4 つのサブユニットの内の E1、E2、さらに PDP1 と PDP2 に対するモノクローナル抗体を作製することに成功した。現在これらの抗体は、株式会社ホクドーを通して商品化・販売されている。

また、作製した抗体を用いて、糖尿病モデルラットの筋肉における各酵素の動態および組織分布等を検討した。この研究結果をまとめた論文は現在投稿中である。

古細菌 *T. acidophilum* 由来の実用酵素の開発

古細菌 *T. acidophilum* は至適生育温度が 50~60 という微生物で、この細胞由来のタンパク質は高温でも安定であり、かつ室温でも活性を示すという特性を持つ。また、ゲノムプロジェクトも終了し、遺伝子情報も得ることができる細胞である。そこで、すでに市販されているが室温での安定性等に改良の余地がある実用酵素に代わるものとして *T. acidophilum* 由来の相同タンパク質が利用開発できないかと考えた。ホモロジー検索より 7 つの遺伝子を選択し、タンパク質として発現するため発現ベクターを構築し、大腸菌を用いて組換えタンパク質の発現・精製を行った。この研究は東洋紡績株式会社との共同研究によって行った。

7 つの遺伝子の内、発現は確認されたが可溶性タンパク質として精製できなかった 2 つの遺伝子については開発を断念した。ホモロジー検索からライゲースに相同性のあるタンパク質であると予想された遺伝子については、実際に発現・精製されたタンパク質がライゲース活性を示さなかった。リパーゼに相同性のあるタンパク質であると予想された遺伝子については、発現・精製したタンパク質の活性を *p*-ニトロフェニルを付加した 2~18 の炭素数の脂肪酸を基質としてその分解活性を検討した。その結果、2~5 の短い炭素数の脂肪酸基質を特異的に分解するエステラーゼであることが示唆された。アルドヘキソースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であると予想された遺伝子のうちの 하나가 NADP よりも NAD を補酵素とし、D-グルコースよりも D-マンノースに対して高い反応性を示す新規な酵素であることが判明したため、東洋紡績株式会社と共同で特許として出願した。また、研究結果を平成 16 年 1 月 24 日~25 日に行われた生物試料分析学会大会にて発表した。

組換えタンパク質のハイスループットな精製のための攪拌装置の開発

プロテアーゼネットワークに関与する酵素群の研究過程で、様々なアミノ酸残基に点変異を入れて変異体を発現精製する際に、多検体の組換えタンパク質を同時に精製し活性を測定する必要が生じた。また、得られた遺伝情報から大腸菌などの宿主細胞を用いて組換えタンパク質を生産する際に、発現の有無や程度を様々な条件下で事前に検討する場合に多検体を同時にスクリーニングする必要がある。

一般に組換えタンパク質を発現・精製する場合、発現するタンパク質の N 末端側または C 末端側に 6 個のヒスチジンからなるタグをつけてニッケルを結合したアフィニティーカラムで精製することが主流である。また、磁性化されたニッケルアフィニティービーズも開発されており、これを用いて多検体を一度に精製する自動化装置の開発も進んでいる。しかし、市販されている自動化装置は組換えタンパク質を磁性ビーズに吸着させるための攪拌操作としてノズルを用い、溶液を出し入れすることで行っている。そのため、検体数によってはノズルの数が非常に多くなり、攪拌する操作を制御する高度な技術も必要になり、非常に高価な器機となっている。

そこで、永久磁石を用いた非常に簡易かつ省スペースな攪拌装置を開発した。この装置は多検体のヒスチジンタグのついた組換えタンパク質を均一に効率よく精製できるだけでなく、磁性ビーズを用いた様々な実験系を利用・検討する際の攪拌装置としても使用できる。例としては、抗体とタンパク質、タンパク質間の相互作用などを検討する際にも使用できると考えられる。この研究は産業技術総合研究所・生物機能研究部門・ナノバイオテクノロジー研究グループとの共同研究であり、開発した装置は商品化に向けた開発も開始している。

ユビキチン化タンパク質同定のための脱ユビキチン化システムの開発とユビキチン化タンパク質の解析

真核細胞の細胞内タンパク質はエネルギー依存的に高次構造がほぐされオリゴペプチドへと初期分解される。無秩序な分解は細胞の恒常性を乱し細胞死へと導くことから、細胞内タンパク質分解は厳密に制御される必要がある。制御機構の一つとして、分解されるべきタンパク質はユビキチンという 76 アミノ酸からなる

低分子タンパク質を分解シグナルとして複数（4個以上）付加され、そのシグナルを認識したプロテアソームによってエネルギー依存的に分解される。

このシステムで分解されるタンパク質には、短寿命タンパク質や構造異常タンパク質のみならず、細胞周期に関与する機能タンパク質や情報伝達因子、細胞性免疫の抗原タンパク質などが含まれる。また、癌細胞や各種疾患細胞でもユビキチン化されたタンパク質が蓄積されることが明らかになっている。このことから、これらユビキチン化タンパク質を同定することができれば、生体分子マーカーとして様々な生命現象を理解する上で重要な情報を得ることができ、医薬などへの開発の糸口となると考えられる。前任者が、これまでにユビキチン化モデルタンパク質の大量調整技術の開発やユビキチン鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製などを行ってきたが、この抗体を使ってユビキチン化タンパク質を同定できる可能性がある。しかし、ユビキチンはタンパク質に複数付加されるため、解析のためにはユビキチンを外すことが望ましい。そこで脱ユビキチン化酵素を用いてユビキチンを外す技術を開発中である。また、平成15年12月10日～13日に行われた分子生物学会年会でもポスター発表した。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。）

細胞内オリゴペプチド分解装置-トリコーンプロテアーゼ

田村具博、田村範子 「科学と生物」 39巻12号、829-834頁、2001年

磁性粒子攪拌装置による組換えタンパク質ハイスループット精製

田村具博、下川勝義、田村範子 「Bio Industry」 20巻、37-43頁、2003年

古細菌のプロテアーゼ

田村範子、田村具博 「蛋白質 核酸 酵素」 2004年 印刷中

アーキアの細胞内タンパク質分解機構

田村範子、田村具博 「バイオサイエンスとインダストリー」 2004年 印刷中

(2) 口頭発表（発表済を対象。予稿集のコピーを添付。）

第25回 日本分子生物学会年会（ポスター発表）

トリコーンプロテアーゼに相互作用するアミノペプチダーゼF2とF3の構造および機能解析

田村範子、Ilika Gilbert、Ismail Moarefi、Wolfgang Baumeister、田村具博

2002年12月11日～14日

Characterization of the Lon protease from the Archaeon *Thermoplasma Acidophilum*

Peter Zwickl, Tomohiro Tamura, Noriko Tamura and Henrike Besche

5th International Conference on AAA Proteins, June 15-19, 2003

The Lon protease from *Thermoplasma Acidophilum*（ポスター発表）

Henrike Besche, Noriko Tamura, Tomohiro Tamura and Peter Zwickl

5th International Conference on AAA Proteins, June 15-19, 2003

第26回 日本分子生物学会年会（ポスター発表）

ユビキチン化タンパク質同定のための脱ユビキチン化システムの開発

嘉屋元博、田村範子、武内純子、田村具博

2003年12月10日～13日

第14回 生物試料分析科学会大会

耐熱性アルドヘキソースデヒドロゲナーゼの開発とD-マンノース測定への応用

西矢芳昭、田村範子、田村具博

2004年1月24日～25日

(3) 特許等 : 1 件