

氏 名	かど の その てつ や 門 之 園 哲 哉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1681 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON FUNCTIONAL MODIFICATION OF PEPTIDASES USING THE MOLECULAR DISPLAY SYSTEM (分子ディスプレイシステムを利用したペプチダーゼの機能改変に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 植 田 充 美 教 授 清 水 昌 教 授 三 上 文 三

### 論 文 内 容 の 要 旨

ペプチダーゼはペプチドの構成アミノ酸間のペプチド結合を加水分解する酵素である。目的のアミノ酸配列を持つペプチドを特異的に認識して切断するようなペプチダーゼがあれば基礎ならびに実用研究への利用が期待できるが、数の限られている既存のペプチダーゼの中から特定のペプチドを認識する高い特異性を持つものを探索することは困難である。しかし、高い基質特異性を持つペプチダーゼを人工的に効率よく創出する方法として、分子ディスプレイ法を用いた機能改変はその一つとして期待される。分子ディスプレイ法を用いると、タンパク質分子は支持体にディスプレイされるので、煩雑な精製過程を省略して迅速にタンパク質の調製と機能解析ができる。この特性は、多数の変異型タンパク質を扱うことが要求されるタンパク質工学分野においては非常に有用である。そこで、酵母分子ディスプレイ法を利用したペプチダーゼの基質特異性の解析と設計改変を目的とし、まず、既存で基質特異性が広いことが予測されているペプチダーゼ分子の基質認識に関わるアミノ酸に変異を導入して、意図した特異性の設計改変を行った。さらに、それらの知見を生かして、抗体分子の抗原結合領域に触媒残基を導入し、ペプチダーゼ活性を付与することも試みた。

#### 1) ペプチダーゼの基質特異性の解析と新規生体内基質候補の検索

モデルとして、ラット脳由来のメタロペプチダーゼであるニューロライシンを用いた。ニューロライシンは血管作用性ペプチドであるニューロテンシンの量を制御することが知られているが、基質特異性については不明な点が多い。そこで、最初に基質特異性を調査するために、ニューロライシン遺伝子をラット脳cDNAライブラリーよりクローニングし、酵母ディスプレイ用ベクターを構築した。このベクターは分泌シグナル配列、ニューロライシン、FLAGタグ、酵母に内在する細胞壁局在タンパク質である $\alpha$ -アグルチニンの細胞壁結合ドメインをこの順に融合タンパク質として生産できるような遺伝子配列をもつ。これを酵母細胞に導入すると、分泌シグナルと $\alpha$ -アグルチニンの細胞壁結合シグナル的作用により、ニューロライシンを酵母の細胞表層にディスプレイできた。このディスプレイしたニューロライシンを用いて数種の蛍光消光性ペプチドに対する加水分解活性を測定した。分解速度は蛍光の増加量で測定し、切断部位はHPLCとMALDI-TOF MSで解析した。その結果、野生型ニューロライシンは $XX_BX \downarrow X_{AH}XX$ あるいは $PXX \downarrow XX_{AH}XX$  ( $\downarrow$ は切断部位、Xは疎水性、塩基性、芳香環を持つアミノ酸、 $X_B$ は塩基性アミノ酸、 $X_{AH}$ は芳香環を持つアミノ酸あるいは側鎖の大きな疎水性アミノ酸を示している)の2種類の認識モチーフをもつことを発見した。そこで、このモチーフに当てはまる生理活性ペプチドを検索したところ、摂食行動の制御に関わるOrexin B, Neuromedin B, Urocortinの3つのペプチドを同定できた。このことから、ニューロライシンは生体内において、摂食行動の制御に関わることが示唆された。

#### 2) ニューロライシンとマトリックスメタロプロテアーゼの基質特異性と構造の比較

上述した活性測定の際に、ニューロライシンはガンの浸潤・転移に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ-2あるいはマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (以下、MMP-2/9) に特異的な基質を効率よく切断することが分かった。

また、結晶構造を比較すると、ニューロライシンとMMP群の活性ドメインが同じ3-Layer Sandwich構造を持つことも

分かった。さらに、ニューロライシンとMMPの基質特異性と構造を比較したところ、ニューロライシンはMMP-2/9とよく似た基質特異性を持つことが明らかになり、基質認識に関わるいくつかの残基も推定できた。特にMMPにおいて基質特異性を決定すると考えられているループの位置に、ニューロライシンではチロシン残基に富むループが存在し、基質特異性の決定におけるその重要性が示唆された。また、MMP-2/9を特異的に阻害する活性阻害剤はニューロライシンの活性も効果的に阻害することが明らかになり、ニューロライシンをディスプレイした酵母を用いて抗ガン剤となるMMP-2/9阻害剤の網羅的スクリーニングによる評価が出来ることも分かった。

### 3) ニューロライシンの基質特異性の設計改変

野生型ニューロライシンはMMP-2/9特異的ペプチドを効率よく切断するが、MMP-3特異的ペプチドに対してはあまり活性を示さない。これらのペプチド配列はほとんど同じであるが、P1'とP2'部位のアミノ酸が異なる。そこで、MMP-3に特異的なペプチドを切断するようにP1'とP2'部位の認識を改変しようとした。まず、P1'とP2'部位の認識残基を推定して6つの残基を選び、それぞれを他の19種類のアミノ酸に置換した合計120種類からなる変異体ライブラリーを作製した。このライブラリーの中からMMP-3に対する活性が高い変異体をスクリーニングしたところ、アルギニン470あるいはチロシン610に変異が導入された変異型ニューロライシンが得られた。もっとも特異性が変化したY610L変異体について反応速度論的解析を行った結果、 $K_m$ 値の変化が原因で特異性が変化したことが示され、基質認識を設計改変できたことを確認した。さらに、この解析をもとにして基質認識ポケットの構造変化も予測した。このように、分子ディスプレイ法を利用して、望む特異性をもつペプチダーゼを迅速に創出することができた。

### 4) ペプチダーゼ活性を持つ抗体分子の創出

さらに多種類のペプチドを特異的に認識して切断するペプチダーゼを創出するために、抗体分子を利用した。抗体は非常に選択的な抗原結合能を持つので、これにペプチド分解活性を付与することができれば、高い基質特異性を持ったペプチダーゼになる。そこで、一部の自己免疫疾患患者の血清から発見された触媒能を持つ抗体軽鎖分子のアミノ酸配列情報を利用し、セリンプロテアーゼなどの加水分解を示す酵素の活性中心に存在している3つのアミノ酸（触媒トライアド）を人工的に抗体軽鎖に導入した。この場合も分子ディスプレイ法を利用すると、人工抗体をディスプレイでき、簡便にそのペプチダーゼ活性を測定できた。その結果、試験管内で創製したこの変異型軽鎖はペプチド分解活性を示し、しかも、コラゲナーゼ様の高い基質特異性を持っていた。このように、分子ディスプレイ法により、抗体分子を基本構造としてペプチダーゼを設計創出することもできた。

## 論文審査の結果の要旨

高い基質特異性を示すペプチダーゼは、タンパク質の構造機能相関の解明やタンパク質医薬品の開発など、基礎から実用にわたってさまざまな利用が期待される。本論文では、高い基質特異性を持つペプチダーゼを人工的に効率よく創出するための基礎研究として、酵母分子ディスプレイ法を利用したペプチダーゼの基質特異性の解析と設計改変を目的とし、まず、ペプチダーゼ分子の基質認識に関わるアミノ酸に変異を導入して特異性を設計改変すること、またそれらの知見を生かして、抗体分子の抗原結合領域に触媒残基を導入してペプチダーゼ活性を付与することを目指した。

評価される主な点は以下の通りである。

- 1) 酵母分子ディスプレイ法を利用し、ラット由来のメタロペプチダーゼであるニューロライシンを酵母の細胞表層にディスプレイし、これを用いて基質特異性を決定するための活性を測定することに成功した。この手法で得た知見をもとにして、2種類の基質認識モチーフを明らかにし、さらにラット生体内での新たな基質候補として3種の摂食行動制御ペプチドを発見した。
- 2) ニューロライシンが、ガン細胞の浸潤と転移を促進するマトリックスメタロプロテアーゼ-2/9 (MMP-2/9) とよく似た基質特異性と活性ドメイン構造を持つことを見出し、構造比較によりニューロライシンの基質認識残基を推定した。さらに、抗ガン剤として有用なMMP-2/9阻害剤の評価において、ニューロライシンをディスプレイした酵母が有用であることも明らかにした。
- 3) ニューロライシンをMMP-3と似た基質特異性を持つように変異を設計導入し、スクリーニングの結果、Y610L変異型

ニューロライシンを取得した。反応速度論的パラメータを求めた結果、この変異体は基質結合力が上昇していることを明らかにした。この結果により、ニューロライシンを基本構造とした目的の基質特異性を持つペプチダーゼの創出が可能であることを明らかにした。

4) 抗体軽鎖分子にセリンプロテアーゼが持つ触媒トライアドを導入し、抗体分子にペプチダーゼ活性と高い基質特異性を付与することに成功した。このことから、試験管内で人工的に、抗体軽鎖を基本構造とした高い基質特異性を持つペプチダーゼが創出できることを明らかにした。

以上、本論文では、酵母分子ディスプレイ法を用いることで、ペプチダーゼの基質特異性の解析と設計改変ができた。このことは、高い基質特異性を持つペプチダーゼを人工的に効率よく創出するための新たな知見と方法論を与えるものであり、生体高分子化学、生化学、タンパク質工学、酵素化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。