
助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究

(2011－2013年度)

金属が活性を調節する食品関連酵素への塩効果と
その加工・調理学的意義の解明

Analyzing the Effect of Salts on Regulation of Food-Related Metalloenzymes for
Verification of Its Significance in Food Processing and Cooking

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成27年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

食品科学分野

11D – 13D 金属が活性を調節する食品関連酵素への塩効果とその加工・調理学的意義の解明

1	まえがき 阿部 啓子 (東京大学)	1
2	植物のシグナルペプチドペプチダーゼの各種塩類による活性化機構の解明 (11D1 – 13D1) 朝倉 富子 (東京大学)	5
3	プロトタイプ型カルパインのカルシウムおよび塩応答性の解析 (11D2 – 13D2) 前田 達哉 (東京大学)	2 5
4	高等植物由来ポリフェノールオキシダーゼにおける塩化物イオンによる活性阻害機構の多核 NMR 法を用いた解析 (11D3 – 13D3) 吉村 悦郎 (東京大学)	3 9

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF FOOD SCIENCE

11D–13D Analyzing the Effect of Salts on Regulation of Food-Related Metalloenzymes for Verification of Its Significance in Food Processing and Cooking

1	Foreword	
	Keiko Abe (The University of Tokyo)	3
2	Activation of Plant Signal Peptide Peptidase by Saline Solutions (11D1 – 13D1)	
	Tomiko Asakura (The University of Tokyo)	2 2
3	An Analysis of the Calcium- and Salt-Dependence of Prototypical Calpains (11D2 – 13D2)	
	Tatsuya Maeda (The University of Tokyo)	3 7
4	Multinuclear NMR Study on Inhibitory Mechanisms by Chloride Ions of Polyphenol Oxidases Derived from Higher Plants (11D3 – 13D3)	
	Etsuro Yoshimura (The University of Tokyo)	5 2

まえがき

阿部 啓子

プロジェクトリーダー

東京大学大学院農学生命科学研究科特任教授

食品に存在する多様な酵素に与える塩の効果については多くの研究があり、本財団の助成研究の対象となってきたが、塩の効果を受けやすい酵素の中で食品加工・調理のプロセスを左右するものを対象とする研究は少ない。

本プロジェクトでは、食品製造・調理工程、食糧生産・食用植物生育などにおいて重要な機能特性を持つ酵素の活性制御に、 Na^+ を中心とした金属イオンがどのように関与するかを解析する3課題の研究を実施した。

(1) 上記の好例として、リンゴのポリフェノールが原因の褐変反応を防ぐ塩効果がある。しかし、塩によるポリフェノールオキシダーゼの活性制御機構の詳細については不明であり、成書における記述すらない。この課題に、吉村悦郎先生(東京大学大学院農学生命科学研究科)が挑戦され、 Na^+ と Cl^- の酸化制御機構を反応速度論から解析した。

(2) 食肉熟成に際して筋肉タンパク質を切断し、筋肉の軟化およびペプチド・アミノ酸など呈味性物質の遊離に寄与するプロテアーゼの一つとしてカルシウム感受性カルパインがある。前田達哉先生(東京大学分子細胞生物学研究所)は、プロトタイプとしての哺乳類カルパイン7に注目した。Rim13(カルパイン7の酵母オルソログ)は転写因子 Rim101 を切断して活性化することにより、塩・アルカリ耐性となる。本プロジェクトでは、Rim13 による基質(Rim101)認識部位を明らかにし、制御機構を解明した。

(3) シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は酸性プロテアーゼの一種で、全生物に発現している。植物 SPP (AtSPP)は、発芽や生殖期の細胞分裂・増殖に関与しており、食用植物生産の面から重要である。朝倉富子先生(東京大学大学院農学生命科学研究科)は、AtSPP の細胞内機能をノックダウン株あるいは過剰発現株を利用して解析し、分裂組織の増殖・成長に重要であることを明らかにした。その活性は高濃度($\sim 2.5 \text{ M}$) NaCl でも活性低下しないことを酵素学的に解明し、今後の塩水農業生産の可能性に道を拓いた。

本プロジェクトでは上記の3名の研究者が3年間実施したが、同時に公募の段階では、3サブテーマ1)プロテアーゼ、2)リポキシゲナーゼ、3)ポリフェノールオキシダーゼを募集した。しかし、サブテーマ2)は採択に至らなかった。プロジェクト研究の3人の先生の成果は、食品加工・調理、食糧生産・食用植物生育に関与する酵素が如何に NaCl のプラス効果を巧みに利用しているか、マイナス効果を回避しているかを明らかにした。おそらく、さらに多くの酵素群が NaCl の助けを借りながら、ある時はその害を巧妙に避けながら活動をしていることを念頭に、酵素動態を科学の言葉で明らかにしたい。3課題とも今後の研究方向をも示された。本プロジェクトの成果が礎になり、塩と酵素に関連する研究が国内外で盛り上がることを期待する。

最後に、食品プロジェクトを実施する機会を頂戴しましたソルト・サイエンス研究財団はじめ関係者各位に心から御礼を申し上げる次第である。

Foreword

Keiko Abe

Project Leader

Professor, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Effect of salts on various enzymes existing in foods has been studied by many researchers and the studies have had financial aids of The Salt Science Research Foundation. However, enzymes that determine food processing and cooking among those directly undergoing salt effects have scarcely been aided financially.

Against this backdrop, a project research launched which aims at analyzing how directly some salt ions, including Na^+ , are involved in regulation of activities of enzymes important for food production and cooking, food processing, and the growth of plants for food uses. The following three cases were studied in the project.

(1) Polyphenol-mediated browning reaction in apples offers a good example. However, details of salt-caused polyphenol oxidase have remained unknown and are not well-documented. Dr. Etsuro Yoshimura, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, challenged to solve this problem and clarified an oxidation-controlling kinetics.

(2) There is a calcium-activated enzyme, calpain, as one of muscle proteases which are involved in tenderization to produce peptides and amino acids with desirable flavors. Dr. Tatsuya Maeda, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, looked at mammalian calpain 7 (prototype) and found that Rim13 as a yeast ortholog of this enzyme cleaved transcription factor Rim101 and was activated, and consequently became salt-alkali resistant. Thus, he revealed a Rim13's Rim101 (substrate) recognition site and confirmed the controlling mechanism.

(3) All organisms have a series of signal peptide peptidases (SPPs) which are acidic proteases. Among those, plant SPP (AtSPP) is involved in cell division and proliferation at germination and reproduction stages and is recognized as significant for food plant production. Dr. Tomiko Asakura, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, used AtSPP knockdown cell line or its excess-expression cell line and elucidated the intercellular function important for the growth and development of mitotic tissues. The AtSPP activities in these phases were not degraded enzymatically so that this finding will contribute to the potential of salt-soil agricultural production in the future.

The project with these three researchers continued for three years. At the same time, the three sub-themes were invited: 1) protease, 2) lipoxygenase, and 3) polyphenol oxidase, although sub-theme 2) was

left out. The importance of studying the three themes in the project research are emphasized in that the three researchers revealed how efficiently the desirable effects of NaCl are enzymatically utilized and also how skillfully its undesirable effects are removed. The scientific evidence provided by the project will serve as a basis for international development of “salt-enzyme” studies.

Finally, I would like to express my sincere thanks to The Salt Science Research Foundation and all the persons in charge of cooperation of this project in the food science area.

植物のシグナルペプチドペプチダーゼの各種塩類による活性化機構の解明

朝倉 富子, 星 雅子

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

概要 シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は、アルツハイマー病の原因となるアミロイドペプチドをプロセシングする酵素のホモログとして発見された。SPP は多様な生物に存在し、生命現象の根幹に関わる反応を触媒する。植物でもシロイヌナズナやコメで存在が認められ、多くの組織で発現していたが、特に花で発現が高いことが明らかとなっている。また、発芽期および生殖期の茎頂分裂組織において発現が高いことから、組織の分化に関わる働きが示唆されている。SPP は膜内で働くアスパラギン酸プロテアーゼに分類されるが、我々は今までに AtSPP が他の生物種同様、小胞体の膜面に存在することを明らかにしている。

本研究では、膜結合型プロテアーゼの活性制御機構を解明しその基質を探索することから発展して食品加工分野での利用の可能性を模索する為に、食塩を含めた金属塩による活性への影響について検討することを研究課題とした。

まず、植物本来の SPP の基質の探索を行う足掛かりとして SPP の発現を押さえたシロイヌナズナ変異体と過剰発現をさせた変異体を作製し、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法によって解析した。その結果、AtSPP ノックダウン株においては GO term から AtSPP がストレス応答を中心に刺激応答全般に関わっていることが分かった。また、AtSPP を過剰発現させた変異体では、発現が上昇する遺伝子の中に GO term が鉄イオンへの応答に関わる response to iron であり、やはり酸化ストレス応答に関わると考えられた。AtSPP は ER 膜に存在することから、ER が受けたストレスに応答する反応に関わる可能性がある。

次に AtSPP が本当にアスパラギン酸プロテアーゼとしての活性を持っているかどうか調べた。植物の根由来の細胞さらには AtSPP を発現させた酵母の膜画分を取得し酵素反応を行った結果、humanSPP の基質として知られているプレプロラクチンのシグナル配列の合成基質から切断断片が生じ、その反応は SPP 特異的阻害剤により阻害されることから AtSPP はアスパラギン酸プロテアーゼとしての活性を持っていることが明らかとなった。AtSPP は膜内アスパラギン酸プロテアーゼであるので疎水的な環境である膜内において加水分解を行うことができる。

食品の加工調理過程において利用する可能性を検討するために、まず生理食塩水程度の塩濃度である 200 mM までの塩による酵素活性への影響を調べた。結果は、酵素反応液に 200 mM NaCl を加えてもほとんど酵素活性に影響がないことが明らかとなった。さらに、しょうゆの塩濃度に近い 2.5M NaCl と KCl の影響についても調べた結果、1M NaCl までは酵素活性にほとんど影響されないが、2.5M NaCl では酵素活性を阻害していると考えられた。KCl の場合は、100 mM でも酵素活性に影響がある可能性があるという結果となった。

本酵素は例えば、疎水性が高いリン脂質が多い卵や大豆製品の中で塩類を含んでいる食品への利用の可能性が期待できる。

1. 研究の背景と目的

真核細胞のオルガネラは、膜によって囲まれている。近年、膜に存在する様々な機能分子に関する知見が明らか

になり、解析が進んでいる。例えば、各種受容体、チャネル、トランスポーター、ポンプなどである。細胞のオルガネラは膜によって膜内外の環境が分断されている。膜領域

では、各種金属イオンの出入りを司るトランスポーターや陽イオンチャネルによって細胞内と細胞外のカリウムイオンとナトリウムイオン濃度は厳密に制御されている。膜に存在する分子は、個々のオルガネラを特徴付けるもので、養分や水分輸送を制御し、各種の生理活性物質の授受を担っている。このうち、複数膜貫通型のプロテアーゼは、シグナル伝達分子のプロセッシングなど生命現象に重要な反応に関わっている。

シグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)は、アルツハイマー病に関わるプロテアーゼであるプレセニリンのホモログとして発見された¹⁾。我々はシロイヌナズナから SPP (AtSPP)を見出し、AtSPP が ER 膜に局在することを明らかにした²⁾。また、AtSPP は花粉の発達に関わることが報告されている³⁾。SPP は、ER 膜内に活性中心となる2つの Asp を有し、膜内で基質を加水分解する(図 1)。今までに哺乳動物由来の SPP に関しては酵素活性が確認されているが、その他の生物では確認されていない。膜内という疎水性環境で活性がどのように発揮されるかは興味深い現象である。本研究では、生命現象に深い関わりをもつ膜結合型プロテアーゼの活性制御機構を解明しその基質を探索することを基礎とし、それから発展して食品加工分野での利用の可能性を模索する為に AtSPP の食塩を含めた金属塩による活性への影響について検討することを研究課題とした。

2. 研究方法

モデル植物としてシロイヌナズナを研究対象とする。シロイヌナズナには 1 種類の SPP (AtSPP)と SPP 様配列を持つ5つの SPP-like 分子が存在し、それぞれ細胞内局在、組織発現などを詳細に解析し、既に報告している²⁾。AtSPP の発現を抑制した植物体を作成して表現型を観察するとともに、DNA マイクロアレイを用いて発現が変化する遺伝子の抽出を行なった。シロイヌナズナでは、T-DNA を挿入した変異体がタグラインライブラリーに蓄積されている。AtSPP 遺伝子に T-DNA が挿入されたホモ挿入体は致死となり存在しないことが報告されていて³⁾ AtSPP のホモ挿入体が得られないことから、RNAi あるいはアンチセンス RNA を用いて AtSPP のノックダウン株を作成した。さらに、AtSPP の過剰発現体を作成しその遺伝子発現プロファイルからその生理機能に迫ることを目的として DNA マ

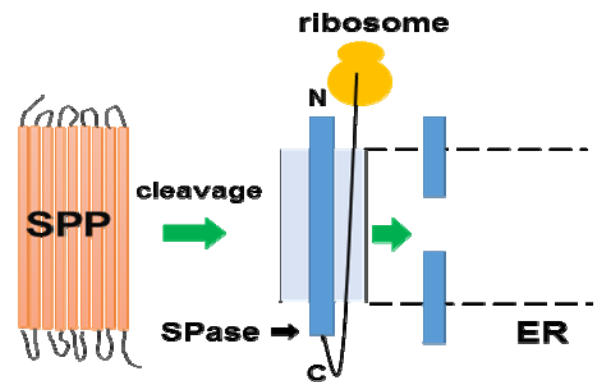


図 1 SPP の膜内切断様式

イクロアレイを用いて発現が変化する遺伝子の抽出を行った。

また、AtSPP が本当にアスパラギン酸プロテアーゼとしての活性を持っているかどうか植物の膜画分を取得し調べた。しかし、既述したように SPP-like 分子も同時に存在することから酵母に AtSPP を発現させることによりさらにその活性について詳細に調べた。

2. 1 AtSPP ノックダウン株の作出

2. 1. 1 AtSPP RNAi ノックダウン株の作製と RT-PCR による発現抑制の確認

RNAi 用発現コンストラクト作製用 Gateway[®]バイナリーベクターである pBI-sense, anti sense-GW に、AtSPP の第 6 膜貫通領域に存在する活性部位 YD を含む 5'領域 600 bp を挿入したコンストラクト pBI-s-as-GW-FrN1 を作製した。また、pBI-sense, anti sense-GW に前記の YD とさらに AtSPP の第 7 膜貫通領域に存在する活性部位 GxGD を含む 3'領域 400 bp を挿入したコンストラクト pBI-s-as-GW-FrC1 を作製した(図 2)。この各コンストラクトを導入から T1 種子の取得は株式会社イノプラントイノベーションズのシロイヌナズナ形質転換受託サービスを用いた。Col-0 株に導入し、T1 種子を得た。

T1 種子をセフオタキシム Na 250 mg/l, カナマイシン 50 mg/l, アガロース 0.8% の 1/2 MS 培地(*1)に蒔き、24 時間 4°C で春化处理を行い栽培した。第 3、第 4 葉が出たものをロックウール上に鉢上げし、22°C、16 時間明期-8 時間暗期条件下で育種した。生育中の葉の一部を採取し直ちに液体窒素で氷結した後、乾熱滅菌した乳棒乳鉢を用いて液体窒素中ですり潰した。Total RNA を RNeasy Plant mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。SuperScript[™]

First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen) を使用し、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーにより 1st-strand cDNA を合成した。これを鋳型として AtSPP (At2g03120) と Arabidopsis thaliana actin 7 (Act 7: At5g09810) について PCR を行い、AtSPP の発現量を確認した。その際に用いたプライマーを以下に示す。

AtSPP のプライマー

Sense 5'- TTATTTCAAGTCTTTGGAGGTAGAG-3'

Antisense 5'- ACCGTTCCAAATGCAGTGAGAAG-3'

全長 1,425 bp のうち、増幅領域 518-1,067、550 bp

ACT7 のプライマー

Sense 5'- TGCTGACCGTATGAGCAAAG-3'

Antisense 5'- ATCCTCCGATCCAGACACTG-3'

全長 1,700bp のうち、増幅領域 1,105-1,208、104bp

PCR は、まず熱変性を 94℃、1 min おこなったのち、熱変性 (94℃、30sec)、アニーリング (62℃、30sec)、伸長反応 (72℃、30sec) のセットを 23 サイクル繰り返し、さらに 72℃、5 min 後 4℃で冷却した。

PCR 産物を、エチジウムブロマイドを含んだ 1%アガロースゲルにて電気泳動した。

1/2MS 培地

myo-イノシトール 100 mg/l

チアミン 10 mg/l

ピリドキサルリン酸 10 mg/l

ニコチアミド 1 mg/l

スクロース 0.5%

pH 5.7

2. 1. 2 Col-0 株と AtSPP RNAi ノックダウン株の花序におけるマイクロアレイ解析

Col-0株と前述の AtSPP RNAi ノックダウン株を 22℃、16 時間明-8 時間暗期条件下、ロックウール上で育成した。播種後 36 日目の開花直前のつぼみの花序から Total RNA を抽出した。さらに GeneChip® 3' IVT Express Kit (AFFYMETRIX) を用いて Arabidopsis Genome ATH1 Array でマイクロアレイ解析を行った。発現量データの解析のため、Affymetrix GCOS ソフトウェアを用いて計測結果をプローブ単位に換算した CEL ファイルに変換した。R で DFW 法、RMA 法、qFARMS 法により正規化を行った。pvclust function により、クラスター解析を行い、マイクロアレイデータに合う正規化法を採用した。その後、Rankproducts 機能により、Col-0 株とノックダウン株の発現量を比較し、FDR (false discovery rate) が 0.01 よりも小さい遺伝子を抽出した。その後、DAVID Bioinformatics Resources 6.7 を用いて、抽出した遺伝子がどの GO term によく濃縮されているかを調べ、さらに抽出された GO term 間の繋がりを Quick GO で視覚化した。

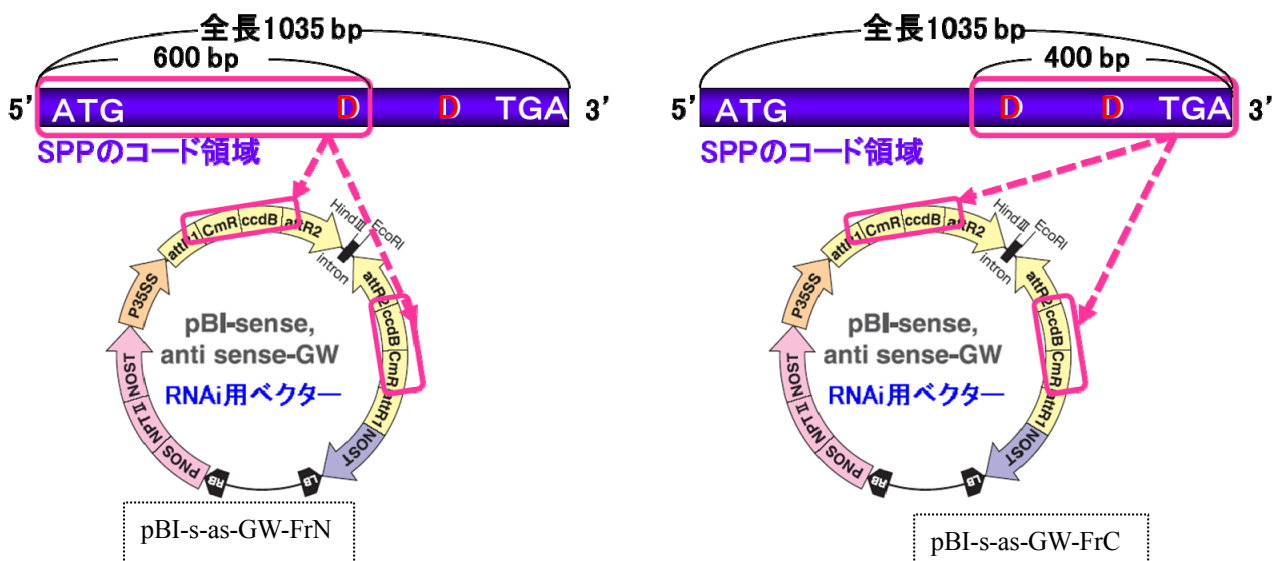


図 2 AtSPP RNAi ベクターの構築

2. 2 AtSPP 過剰発現株の作出

2. 2. 1 AtSPP 過剰発現株の作製と RT-PCR による過剰発現の確認

シロイヌナズナ Col-0 株を 22°C、16 時間明期-8 時間暗期条件下、ロックウール上で育成した。抽台後、2~3 日に一度摘心を行い、花芽を数多く付けた状態にした。

一方、(図 3)のようなプラスミドを作出し、解凍したアグロバクテリウムのコンピテントセルに形質転換した。アグロバクテリウムをリファンピシン 100 µg/ml、ハイグロマイシン 20 g/ml の LB 培地 5 ml に 30°C 24 時間の条件で前培養し、同様の組成の LB 培地 500ml で 24 時間本培養した。4,000 rpm、15 min で遠心し、上清を捨て、ペレットを浸潤液(*1)に溶解した。さらにベンジルアミノプリンを最終濃度 10,000g/l、Tween80 を最終濃度 0.02%になるよう加えた。上記の植物体をこの浸潤液につけ、デシケータに入れて 5 分間吸引した。浸潤液で濡らしたキッチンペーパーを植物にかけてサランラップで包み、翌日取り除いた。初めの種ができるまで水やりを 1-2 回おこなった後はそのまま枯らせ、種子を得た。次に形質転換体の一次選抜を行った。70%エタノール 2 min、5%ブリーチ 15min で表面消毒をした約 1,000 粒の種子を、セフトキシム Na 500 mg/l、ハイグロマイシン 20 mg/l、アガロース 0.8%の 1/2MS 培地(*2)に播種し、24 時間 4°Cで春化处理を行い生育させた。その後、第3、第4葉が出たものを鉢上げし、種子を得た。さらに表現型の分離の確認を行った。得られた種子の約 30 粒をハイグロマイシン 20 mg/l、アガロース 0.8%の 1/2MS 培地(*2)に同様の処理後播種し、生存:致死=3:1 に分離したラインを 10 株鉢上げし、それぞれ種子を得た。ホモ個体の選別のために各ラインを約 30 粒ずつハイグロマイシン 20 mg/l、アガロース 0.8%の 1/2MS 培地(*2)に同様の処理後播種し、生存:致死=3:1 に分離せず全てが耐性植物であったホモ個体の種子を得た。

*1 浸潤液

MS salts 1/2×strength、スクロース 5%、MES 0.5g/L、pH5.7(KOH で調整)、121°C 20 min でオートクレーブ

*2 1/2MS 培地

myo-イノシトール 100mg/l、チアミン 10mg/l、ピリドキサーリン酸 10mg/l、ニコチアミド 1mg/l、スクロース 0.5%、pH5.7

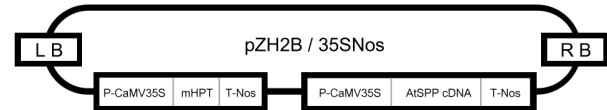


図 3 AtSPP 過剰発現の為のベクターの構築

シロイヌナズナ Col-0 株と AtSPP 過剰発現株を 22°C、16 時間明期-8 時間暗期条件下、ロックウール上で育生した。生育中の葉の一部を採取し直ちに液体窒素で氷結した後、乾熱滅菌した乳棒乳鉢を用いて液体窒素中ですり潰した。Total RNA を RNeasy Plant mini Kit(QIAGEN)を用いて抽出した。SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen) を使用し、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーにより 1st-strand cDNA を合成した。これを鋳型として AtSPP と Actin 2 について PCR を行った。その際に用いたプライマーは前述した AtSPP のプライマーと Actin 2 つのプライマーを用い同条件で PCR を行ない、PCR 産物を電気泳動した。

2. 2. 2 Col-0 株と AtSPP 過剰発現株の花序におけるマイクロアレイ解析

Col-0 株と AtSPP 過剰発現株を引き続き同じ条件で生育し、播種後 47 日目の花序から同様に Total RNA を抽出した。さらに GeneChip® 3' IVT Express Kit (AFFYMETRIX) を用いて Arabidopsis Genome ATH1 Array でマイクロアレイ解析を行った。発現量データの解析のため、Affymetrix AGCC ソフトウェアを用いて計測結果をプローブ単位に換算した CEL ファイルに変換した。R で DFW 法、RMA 法、qFARMS 法により正規化を行った。pvclust function により、クラスター解析を行い、正規化法を決定した。その後、Rankproducts 機能により、Col-0 株とノックダウン株の発現量を比較し、FDR が 0.01 よりも小さい遺伝子を抽出した。また、DAVID Bioinformatics Resources 6.7 を用いて、抽出した遺伝子がどの Gene Ontology (GO) term に濃縮されているかを調べ、さらに抽出された GO term 間の繋がりを Quick GO で視覚化した。

2. 3 AtSPP の酵素活性の検出

2. 3. 1 溶化膜画分の調整

シロイヌナズナの根細胞由来の培養細胞である 'Deep' Cell を 22°C、暗下で一週間培養し、遠心分離(10,000×g、15 min)により細胞を集めた後 H buffer(*3)にプロテアー

ゼインヒビターカクテル (Roche 社) を加え懸濁した。フレンチプレスで破碎 (1,000 psi) し、遠心分離 (3,000×g, 10 min) により核などを除いた後、超遠心分離 (100,000×g, 1 h) にて沈殿を得た。沈殿を 2% DDM (n-dodecyl-β-D-maltoside) あるいは 1% CHAPS (3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate) 含有 H buffer で溶解し、60 min 氷上に置き再び超遠心 (100,000×g, 1 h) を行い、上清を可溶化膜画分とした。

*3 H buffer

HEPES 50 mM
スクロース 250 mM
EDTA 5 mM
pH 7.0

2. 3. 2 合成ペプチド基質を用いた *in vitro* assay

AtSPP の活性評価は、ヒト SPP で既に報告されている⁴⁾ 合成基質 c-Myc-Prl-PP-Flag (図 4) を基質として切断断片を生じるかどうかで判断した。合成基質 c-Myc-Prl-PP-Flag は BEX Co.,Ltd に外注し合成した。酵素反応は、0.0625 ~ 0.25% の DDM、CHAPS、又は CHAPSO (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate) 含有 H buffer (プロテアーゼインヒビターカクテル含む)、1 μM Myc-Prl-PP-Flag、0.1% L-α-phosphatidylcholine (Avanti)、膜画分を合わせて 100 μl とし、37°C で反応させた。切断断片の検出は反応液に SDS PAGE sample buffer (*4) を加え 15% トリスートリシン / 8 M Urea ゲルにて電気泳動を行い、抗 Myc 抗体 (SIGMA) を一次抗体に用いてウエスタンブロット解析を

行った。シグナルの検出は ECL Prime (GE Healthcare) を用いた。切断断片のコントロールとして使用した c-Myc-Prl-PP-23 は東京大学薬学部富田泰輔准教授より譲与していただいた。

*4 SDS PAGE sample buffer

Tris-HCl 62.5mM
glycerol 10%
2-mercaptoethanol 5%
sodium dodecyl sulfate 2.5%
bromophenol blue 0.05%
pH 6.8

2. 3. 3 酵母による AtSPP の発現と活性

AtSPP の配列を pRS426-GAL1-GFP ベクターに連結させたプラスミド⁵⁾ を構築 (図 5) し出芽酵母 2777 株に発現させた。AtSPP 配列は、以下のプライマーを用いて PCR を行い増幅させた。

forward primer

(5'-accgccgattctagaactagtgatccccatgaagaattgtgagagatttgc-3')

reverse primer

(5'-aaattgacctgaaaatataaattttcccctcatcatgagctttattaacctc-3')

まず、pRS426-GAL1-GFP ベクターを制限酵素 SmaI 切断によりリニアにした後、PCR によって増幅させた AtSPP の断片とともに homologous recombination により酵母を形質転換した。形質転換体は栄養要求性培地 (一ウラシル) を用いて選択した。SPP-GFP の酵母内の発現は共焦点顕

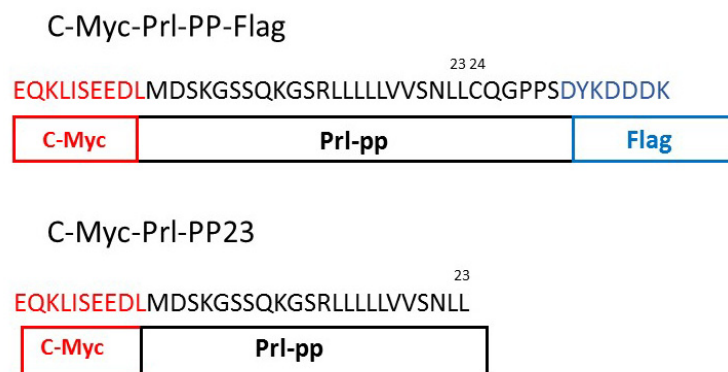


図 4 合成基質

微鏡(FV10i-LIV, Olympus Tokyo Japan)を用いて蛍光により確認を行った。酵母を培養後集菌し、ビーズショッカーにて破壊した。その後、シロイヌナズナの培養細胞で行ったと同じ方法により膜画分を取得した。タンパク質の電気泳動後 GFP の蛍光を LAS-4000mini を用いて検出した。またウエスタン分析は AtSPP の C 末端を認識する抗体を用いて行った。

2. 4 AtSPP の塩類による酵素活性への影響

2. 4. 1 生理食塩水程度の塩濃度による AtSPP 酵素活性への影響

次に膜内アスパラギン酸プロテアーゼである AtSPP が低濃度の塩により活性に影響があるかどうかを反応系に NaCl を加えることによって調べた。人間の体液とほぼ等張である生理食塩水は 0.9% であり、これは 150 mM の NaCl

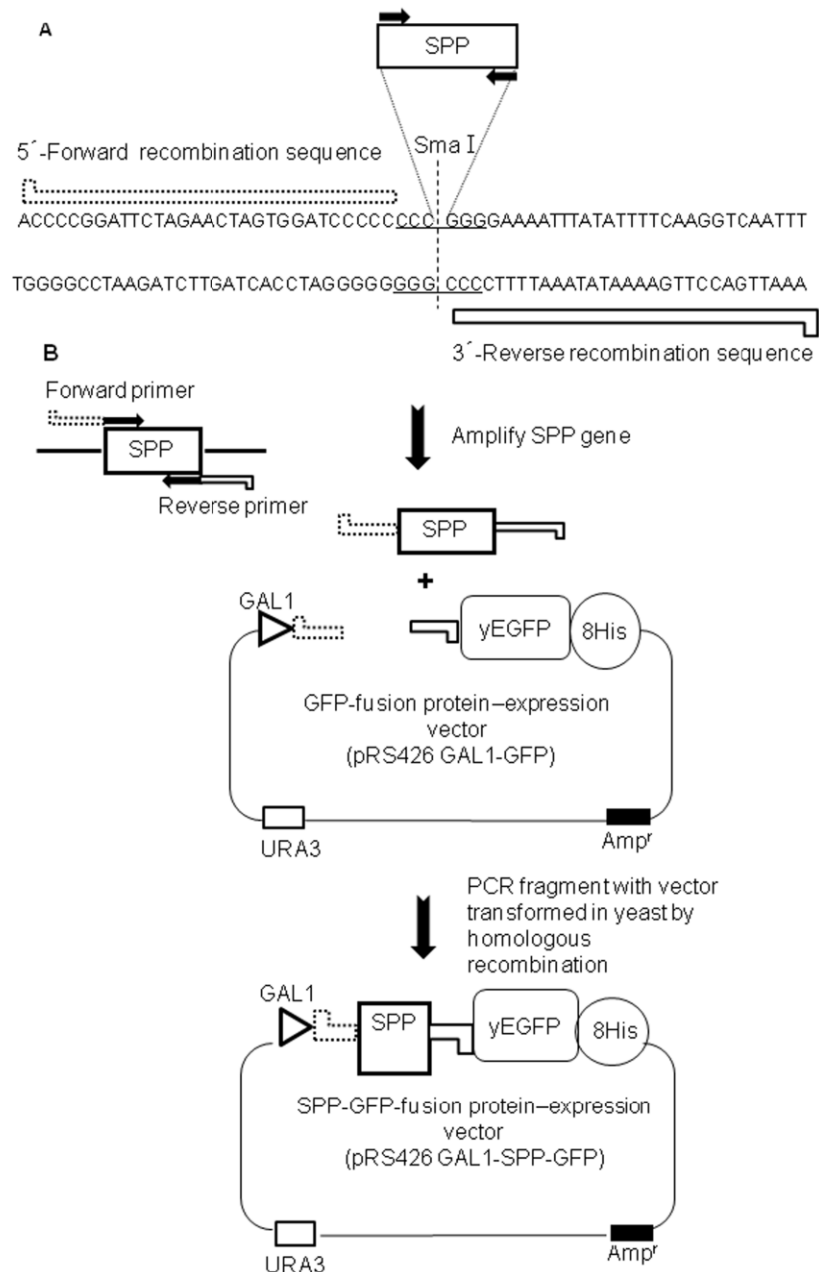


図 5 AtSPP-GFP 融合タンパク質発現ベクターの構築

に相当する。海水は塩分 3.4%のうち 77.9%が NaCl である。酵素の有効利用を考える上でも塩は身近に存在し、多くの食品に含まれることから、塩濃度による影響を調べることが一番重要であると考えられる。塩濃度は、終濃度が 150 mM より濃い 200 mM まで 0、5、10、50、100、200 mM と条件を振って加えた。尚、活性の検出方法は 2. 3. 2 に示した通りに行なった。

2. 4. 2 塩濃度が高い食品と同等程度の塩濃度による AtSPP の酵素活性への影響

日本のしょうゆ生産量の 8 割を占める「こいくちしょうゆ」は塩濃度が約 16%と言われている。これは 2.7 M の NaCl に相当する。そこで、この塩濃度に近い終濃度が 2.5 M まで 0、100、500、1,000、2,500 mM と条件を振って加え AtSPP の活性を調べた。

3. 研究結果

3. 1 AtSPP RNAi ノックダウン株の作製

pBI-s-as-GW-FrN1 では 9 万粒、pBI-s-as-GW-FrC1 では 4.5 万粒 (18 プレート) の種を播種し、pBI-s-as-GW-FrN1 で 5 株、pBI-s-as-GW-FrC1 で 18 株が生育した。実際に RNA レベルで発現抑制されていた株は pBI-s-as-GW-FrN1 で 2 株、pBI-s-as-GW-FrC1 で 5 株であった。これらの植物体の AtSPP mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した (図 6)。これらの株の中から RNAiAtSPPN2、RNAiAtSPPC3、RNAiAtSPPC4 をマイクロアレイ解析に用いた。

3. 2 Col-0 株と AtSPP RNAi ノックダウン株の花序におけるマイクロアレイ解析

3. 2. 1 発現変動様式と発現変動遺伝子の抽出

DFW 法、RMA 法、qFARMS 法の 3 つのアルゴリズムで正規化したプローブセットの各々のシグナル値を用いて階層的クラスタリングを行った。どの手法でも Col-0 株群が非常に近い発現をしていることが示され、2 群間で異なるクラスターを形成していた。用いたアルゴリズムの中で最も新しい DFW 法を採用し、DFW 法で正規化したシグナル値に対して Rank Products 法を用いて 2 群間比較を行った。その結果、Col-0 株と AtSPP ノックダウン株は別々のクラスターに分類された (図 7)。FDR (false discovery rate) < 0.01 を満たすプローブセットを抽出すると、ノックダウン株で発現が上昇した 106 遺伝子と発現が減少した 143 遺伝子が

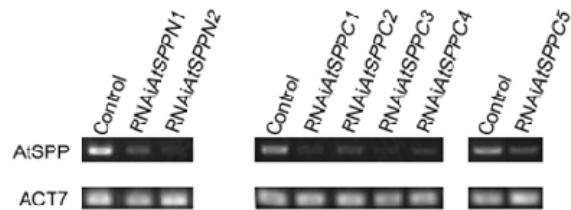


図 6 AtSPP RNAi ノックダウン株における AtSPP の発現量 Control は野生株 (Col-0)、RNAiAtSPPN1-2 and RNAiAtSPPC1-5 は RNAi ベクター。(それぞれ N-terminal と C-terminal) により形質転換した形質転換体。ACT7 は actin 7 をコードする遺伝子。

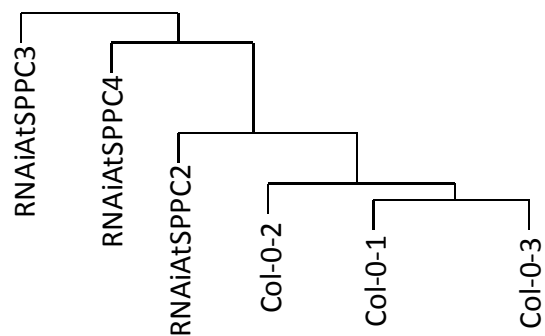


図 7 AtSPP ノックダウン株と野生株における遺伝子発現のクラスター系統樹

抽出された。

3. 2. 2 Gene annotation enrichment analysis による発現変動遺伝子の機能的特徴の解析

ノックダウン株で発現が有意に上昇した 106 遺伝子と減少した 143 遺伝子全体の機能的特徴を調べるため、Biological Process について DAVID を用いた Gene annotation enrichment analysis を行った。さらにどの GO term がよく濃縮されたかを調べ、Quick GO を用いて GO term 間の繋がりを視覚化し、さらにそれぞれの最下層の GO term に所属する遺伝子をまとめた。広範囲にわたり変動が起こっていたが、ストレス応答・刺激応答 (GO term が response to stress) に関する遺伝子の発現が増加した遺伝子の中で最もよく濃縮されていた。二番目が response to stimulus であった。response to stress は response to stimulus の直下の GO term であり、response to stimulus は最上層の GO term である。AtSPP がストレス応答を中心に刺激応答全般に関わっていることが分かった。

response to stress の下層 term として抽出された GO term は response to oxidative stress (酸化ストレス応答)、response to cold (寒応答)、response to water deprivation (水分欠乏応答)、response to wounding (傷応答)、response to hypoxia (低酸素応答)、response to osmotic stress (浸透圧応答)、regulation of response to stress (ストレス応答制御)、defense response (防御応答)であった。response to stress に所属する 38 遺伝子中 16 (42.1%) が転写因子であった。FDR<0.01 で発現増加した遺伝子 106 中の転写因子は 21 (19.8%) であることから、今回抽出された多くの転写因子が response to stress に濃縮されていた。AtSPP は転写因子を制御して、ストレス応答に関わっていると推測できる。

3. 3 AtSPP 過剰発現株の RT-PCR による過剰発現の確認

形質転換体の一次選抜を行うと、約 3,000 種子中 26 株がハイグロマイシン耐性を示した。さらにホモ株を得たもののなかで、AtSPP の発現が上昇しているものを確認した (図 8)。これらをマイクロアレイ解析の試料に用いた。

3. 4 Col-0 株と AtSPP 過剰発現株の花序におけるマイクロアレイ解析

3. 4. 1 発現変動様式と発現変動遺伝子の抽出

DFW 法、RMA 法、qFARMS 法の3つのアルゴリズムで正規化したプローブセットの各々のシグナル値を用いて階層的クラスタリングを行った (図 9)。どの手法でも Col-0 株群が非常に近い発現をしていることが示され、2 群間で異なるクラスターを形成していた。用いたアルゴリズムの中で最も Col-0 株と AtSPP 過剰発現株とのクラスターが明確に分離している DFW 法を採用し、DFW 法で正規化したシグナル値に対して Rank Products 法を用いて2群間比較を行った。FDR<0.01 を満たすプローブセットを抽出すると、過剰発現株で発現が上昇した 196 遺伝子と発現が減少した 112 遺伝子が抽出された。さらにどの GO term に濃縮されたかを調べ、最下層の GO term に所属する遺伝子をまとめた (表 1 と表 2)。

3. 4. 2 Gene annotation enrichment analysis による発現変動遺伝子の機能的特徴の解析

過剰発現株で発現が有意に上昇した 196 遺伝子と減少した 112 遺伝子全体の機能的特徴を調べるため、Biological Process について DAVID を用いた Gene

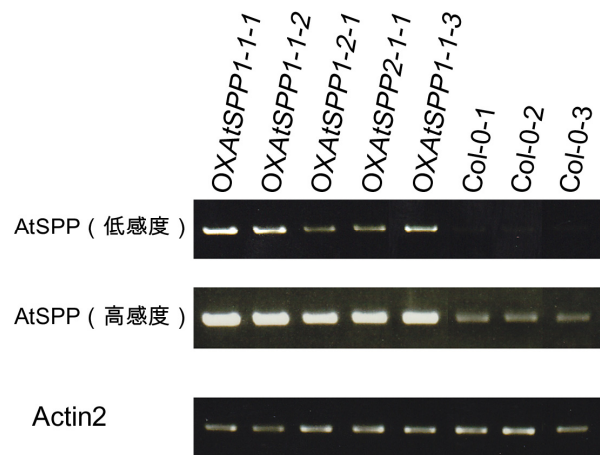


図 8 AtSPP 過剰発現による転写産物の発現 semi-quantitative RT-PCR を行ない AtSPP と Actin2 の転写産物の発現量を検証した。

annotation enrichment analysis を行った。非常に広範囲にわたり変動が起こっていることが分かる。

Gene annotation enrichment analysis で、過剰発現株で発現が有意に上昇していた遺伝子群の中でも FDR=5.50E-05 と最も危険率が低かったのは GO term が鉄イオンへの応答に関わる response to iron ion であった (表 3)。ここに含まれるのは Ferritin gene family である ATFER1、ATFER3 と copper/zinc superoxide dismutase の CSD1 と CSD2 である。ATFER は鉄イオンの貯蔵と酸化ストレス応答に関わる。CSD は細胞を過酸化物の毒性から守る抗酸化酵素であり、活性化に CCS (Cu chaperone for SOD) が関わる CCS-dependent 経路と CCS によらず活性化される CCS-independent 経路が存在する。CSD1 は CCS-dependent 経路と CCS-independent 経路の両方に関わり、CSD2 の活性化は完全に CCS に依存している。一方で CSD3 は CCS-independent 経路のみにより活性化され⁶⁾、また、今回のマイクロアレイ解析ではその発現レベルは有意な変動をしていなかった (FDR=0.996)。このことから AtSPP は CCS-dependent 経路に関わっている可能性が考えられた。ATFER も CSD も、酸化還元反応に関わる分子であり、実際に oxidation-reduction process も最下層の GO-term として抽出され、上記の 4 分子も含んでいる。反対に、Gene annotation enrichment analysis で、過剰発現株で発現が有意に減少していたなかでも FDR=4.40E-10

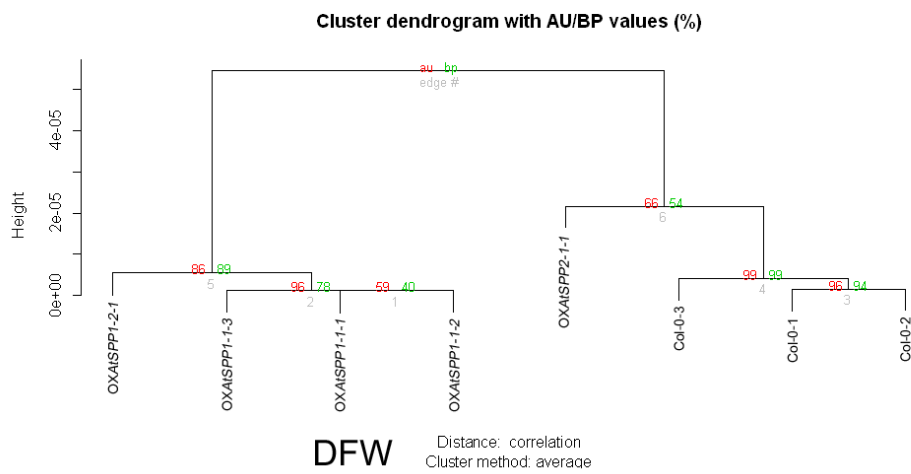
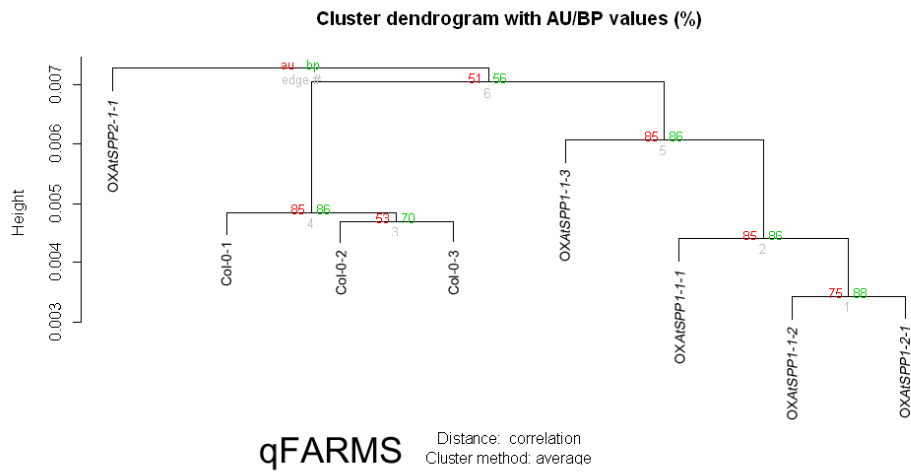
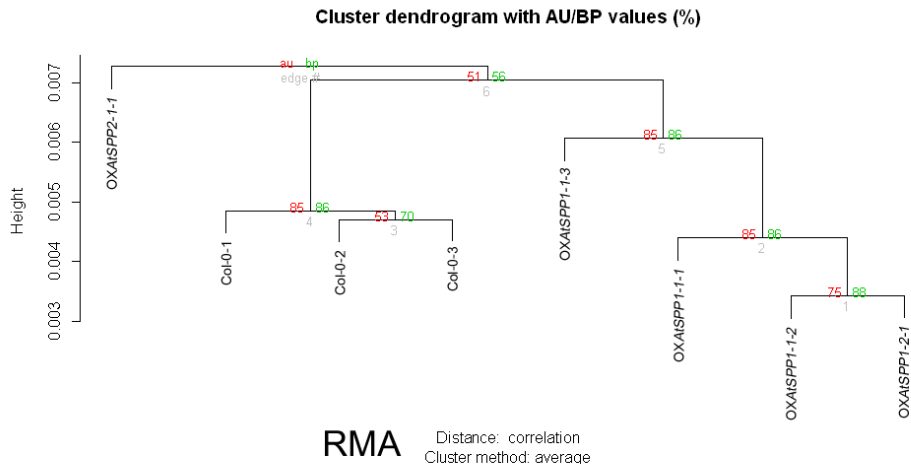


図 9 3つのアルゴリズムで正規化したシグナル値による階層的クラスタリング

表 1 GO term の相関チャート(過剰発現株で発現上昇)

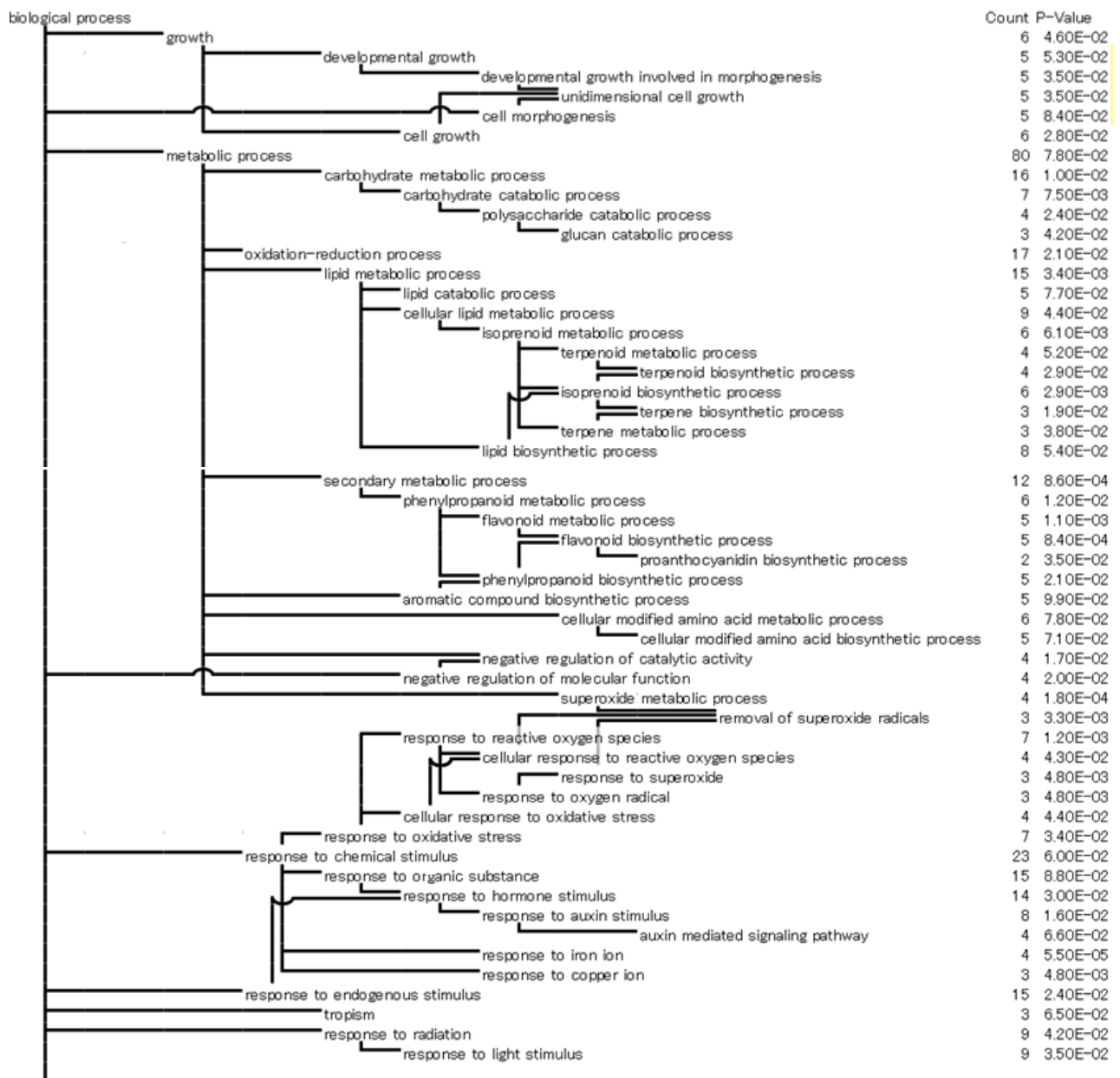


表 2 GO term の相関チャート(過剰発現株で発現低下)

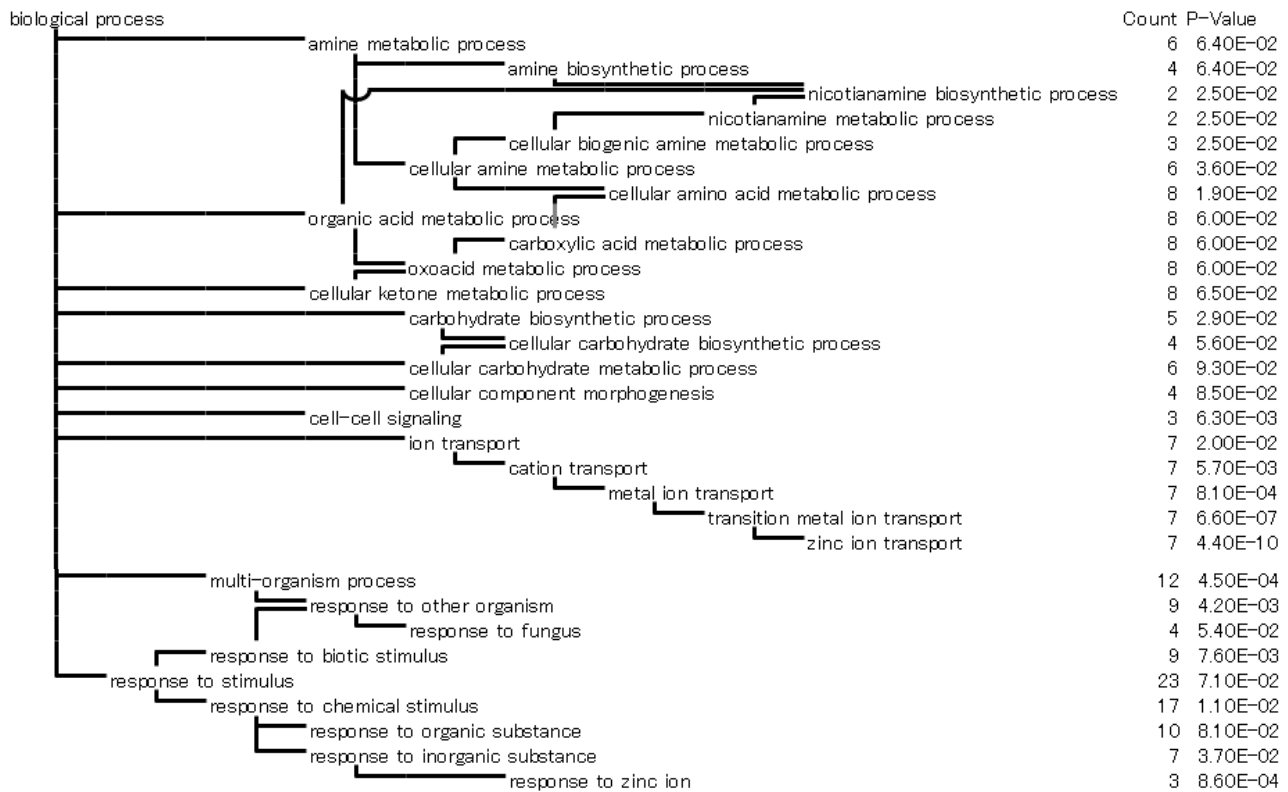


表 3

response to iron ion		
251109_at	AT5G01600	ATFER1; ferric iron binding / iron ion binding
251735_at	AT3G56090	ATFER3 (ferritin 3); binding / ferric iron binding / oxidoreductase/ transition metal ion binding
264809_at	AT1G08830	CSD1 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1); superoxide dismutase
266165_at	AT2G28190	CSD2 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2); superoxide dismutase

と最も危険率が低かった GO term が亜鉛輸送に関わる zinc ion transport であった(表 4)。今回7つの ZIP ファミリー(Zrt-, Irt-like protein, SLC39A ファミリー)が含まれていた。ZIP ファミリーは2価金属イオンを選択的に細胞内に輸送し、植物に限らず酵母、動物、細菌にも多数存在しているが、*Arabidopsis thaliana* には ZIP1~12 と IRT1~3 の 15 個存在している。例えば ZIP4 と ZIP9 は亜鉛が十分にある環境下ではあまり発現していないが、亜鉛欠乏時には発現が上昇し植物体内への亜鉛の吸収を行う。また、ニコチアナミンの生合成に関わる nicotianamine biosynthetic process も有意に減少していた。ニコチアナミンは金属のキレーターで、土壌中には放出されず植物体内で働くことが分かっている。植物において金属元素の輸送はイオンの形態だけでなく「金属・キレート」複合体の形でも行われる。シロイヌナズナでは YSL ファミリーが「亜鉛・ニコチアナミン」複合体を輸送するのではないかと考えられている。NAS はニコチアナミン合成酵素であり、*Arabidopsis thaliana* には NAS1~4 の 4 つ存在している。

mRNA の発現レベルが変動しているということは、何らかの形で転写が制御されていると考えられる。各遺伝子のプロモーターの共通性を探ると、今回この2つの Go term に含まれている NAS2、NAS4、IRT3、AtZIP12(ZIP12)、ZIP1、ZIP3、ZIP4、ZIP5、ZIP9 はすべて、シスエレメント ZDRE (RTGTGCGACAY)を持つまたは持つと推測された。ZDRE には転写因子 bZIP19 と bZIP23 が結合し、ZIP1、ZIP3、ZIP4、ZIP5、ZIP9、NAS2、NAS4 の mRNA は bZIP19 と bZIP23 のダブルノックアウト株のマイクロアレイ解析でダウンレギュレートされることが報告されている⁷⁾。その他にシスエレメント ZDRE を持っている ZIP ファミリーと NAS として ZIP10 と NAS3 が挙げられる。ZIP10 は有意な減少をしていなかったが、NAS3 は FDR= 0.014 と有意と言えるレベルで減少していた。逆に、ZDRE を持たない ZIP は6つとも有意な変動が見られなかった。(ZIP8 は GeneChip® *Arabidopsis* ATH1 Genome Array に搭載されていない遺伝子であった。)一方、NAS1 も ZDRE を持たないが FDR=0.024 で有意に発現低下していると言えた。

表 4

response to zinc ion		
248048_at	AT5G56080	NAS2 (NICOTIANAMINE SYNTHASE 2); nicotianamine synthase
257715_at	AT3G12750	ZIP1 (ZINC TRANSPORTER 1 PRECURSOR); zinc ion transmembrane transporter
253413_at	AT4G33020	ZIP9; cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter
zinc ion transport		
259723_at	AT1G60960	IRT3; cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter
247456_at	AT5G62160	AtZIP12 (ZINC TRANSPORTER 12 PRECURSOR); cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter
257715_at	AT3G12750	ZIP1 (ZINC TRANSPORTER 1 PRECURSOR); zinc ion transmembrane transporter
266336_at	AT2G32270	ZIP3; zinc ion transmembrane transporter
260462_at	AT1G10970	ZIP4 (ZINC TRANSPORTER 4 PRECURSOR); cation transmembrane transporter/ copper ion transmembrane transporter
264574_at	AT1G05300	ZIP5; cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter
253413_at	AT4G33020	ZIP9; cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter

これらのことから SPP は bZIP19 や bZIP23 に関わっていることが強く示唆された。AtSPP が bZIP19 や bZIP23 を標的とする可能性が示されたが、bZIP19 も bZIP23 も膜貫通領域を持たず可溶性タンパク質であることから、膜貫通型プロテアーゼである SPP の直接のターゲットとは考えにくい。また bZIP19 と bZIP23 自体は有意な変動は見られなかった。以上のことから AtSPP は bZIP19 と bZIP23 を直接のターゲットとするのではなく、これらの分子を制御する分子に作用していると推測された。

3. 5 AtSPP の酵素活性

3. 5. 1 植物細胞の膜画分の調整と酵素活性

AtSPP の酵素活性を調べる目的で、Arabidopsis の根由来の培養細胞から膜画分を調整した。膜画分に存在する AtSPP のタンパク質は SDS-PAGE 電気泳動後、抗 AtSPP 抗体を用いたウェスタン分析により一本のバンドを検出した(図 10A)。次に myc タグと Flag タグがそれぞれ N 末端と C 末端に連結した合成ペプチド myc-Prl-pp-Flag を基質(図 10B)にしてこの AtSPP が存在することを確認した膜画分を粗酵素液として酵素反応を行なった。膜画分を取得する際に可溶化する為にいくつかの detergent を用いた。用いた Digitonin、CHAPS、CHAPSO、NP-40、DDM すべての detergent により可溶化された膜画分は合成基質を切断し酵素活性を有していた。しかし、SPP 特異的阻害剤である (Z-LL)₂-ketone により酵素活性が阻害されたのは DDM 可溶化膜画分のみであった。

そこで、以降の酵素切断実験には DDM 可溶化膜画分を用いることにした。

図 10C に示したように植物細胞の膜画分は合成基質 myc-Prl-pp-Flag を切断し、SPP 特異的阻害剤である (Z-LL)₂-ketone やアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤である L-685、458 によりその活性が阻害されることが明らかとなった。

3. 5. 2 酵母による AtSPP-GFP 融合タンパク質の発現

植物細胞に SPP 様活性があることが明らかとなったが、この活性が本当に AtSPP による酵素活性であることを確かめる為に、酵母に AtSPP-GFP 融合タンパク質として発現させて膜画分を取得し酵素活性を検定した。AtSPP-GFP 融合タンパク質を発現させた酵母を蛍光顕微鏡にて観察したところ、図 11 にあるようにコントロールのベ

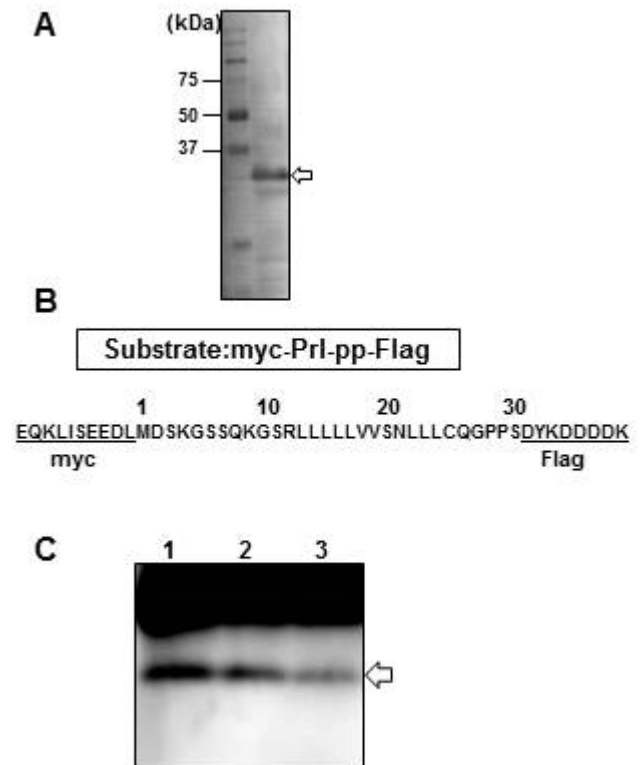


図 10 植物細胞の膜画分のプロテアーゼ活性

A: 植物細胞の膜画分のウェスタン分析。抗 AtSPP 抗体を使用。B: 合成基質のアミノ酸配列。C: トリスートリシン電気泳動による酵素活性の検出。

1. コントロール(膜画分のみ)
2. +10 μM (Z-LL)₂-ketone
3. +20 μM L-685,458

矢印は切断断片。抗 myc 抗体を使用。

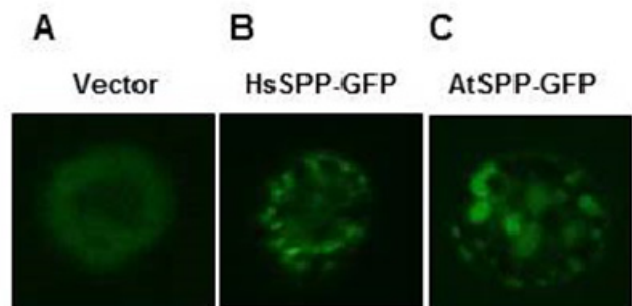


図 11 酵母による SPP-GFP 融合タンパク質の発現(蛍光顕微鏡による観察)

クターのみ導入したものは GFP の蛍光は検出できないのに対して(図 11-A) AtSPP-GFP 融合タンパク質を発現している酵母では GFP の蛍光が見られた(図 11-C)。組み換えた酵母により AtSPP-が発現していることが確かめられたので、酵母から膜画分を取得して酵素活性を検定した。結果は図 12-B に示されたように膜画分による酵素活性は SPP 特異的阻害剤である(Z-LL)₂-ketone により酵素活性が阻害された。しかし、AtSPP-GFP 融合タンパク質の酵素活性は非常にわずかであったため、さらに GFP を除いたコンストラクトを作製し膜画分による酵素活性の検定を行った。図 13-B に示した通り、SPP 特異的阻害剤である (Z-LL)₂-ketone により酵素活性が阻害され酵素活性は AtSPP のものであることが明らかとなった。

3. 5. 3 合成ペプチド基質 myc-Prl-PP-FLAG の切断様式

合成ペプチド基質 myc-Prl-PP-FLAG の切断断片はトリスートリシン電気泳動を行い抗 myc 抗体によるウエスタン解析により検出する。既報により⁸⁾ humanSPP による同基質の切断断片を MALDI-TOF mass を用いた結果、メチオニンから数えて 23 番目のロイシンの後ろで切断されることが明らかになっている。AtSPP により主に切断する場所を humanSPP の切断部位と比べる為にトリスートリシン電気泳動により検出したところ、図 14 に示した通り humanSPP の切断断片と同じ位置に泳動された。このことから、AtSPP の主な切断位置は humanSPP と同じ 23 番目のロイシンと 24 番目のロイシンの間であると推察された。

3. 5. 4 塩類による酵素活性への影響

膜内プロテアーゼは疎水的な環境である膜内において加水分解を行うことができる。AtSPP はこの膜内アスパラギン酸プロテアーゼである。食品の加工調理過程において利用するためには塩類による影響は重要課題である。そこでまず生理食塩水程度の塩濃度である 200 mM までの塩による酵素活性への影響を調べた。図 15-A に示したように、酵素反応液に 200 mM NaCl を加えてもほとんど酵素活性に影響がないことが明らかとなった。さらに、しょうゆの塩濃度に近い 2.5 M NaCl と KCl の影響についても調べた。結果は図 15-B に示されたように 1M NaCl までは酵素活性にほとんど影響されないが、2.5M NaCl では酵素活性を阻害していると考えられた。KCl の場合は、100 mM でも酵素活性に影響がある可能性があるという結果と

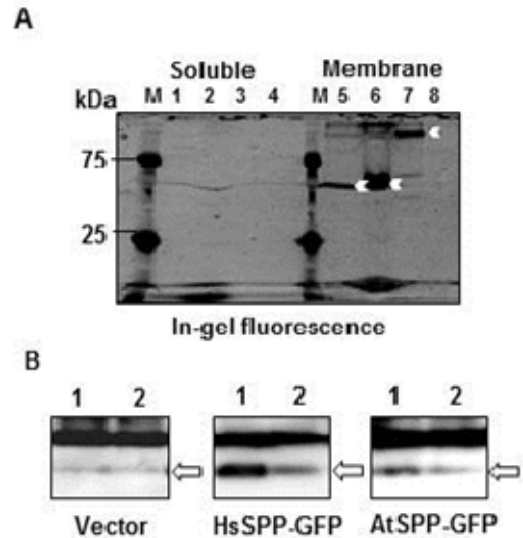


図 12 酵母による SPP-GFP 融合、タンパク質の発現
A:可溶性画分と膜画分の SDS-PAGE 解析

1、2、3、4 と 5、6、7、8 は同じ sample

1 AtSPP 117 μ g、2 AtSPP 340 μ g、3 humanSPP 158 μ g、4 vector 161 μ g

B:膜画分による酵素活性の検定

1 膜画分、2 膜画分+(Z-LL)₂-ketone

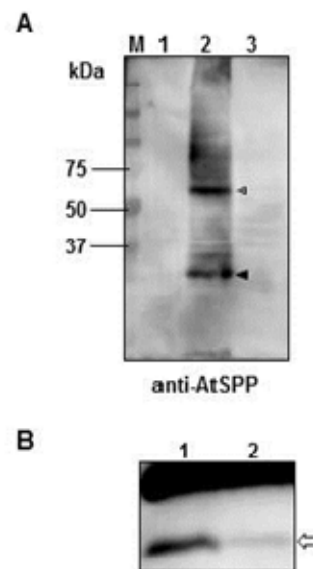


図 13 酵母による AtSPP 発現、タンパク質の酵素活性の同定

A:酵母で発現させた AtSPP タンパク質の同定

1 ベクター、2 AtSPP、3 HsSPP

B:膜画分による酵素活性

1 膜画分、2 膜画分+(Z-LL)₂-ketone

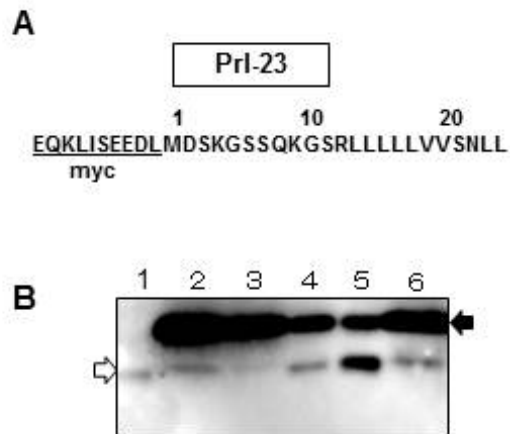


図 14 myc-Prl-PP-FLAG ペプチドの切断部位

1: 合成ペプチド Prl-23、2: HEK293T 膜画分 (human SPP)、3: HEK293T 膜画分 + (Z-LL)2-ketone、4: 酵母膜画分 (human SPP)、5: 植物細胞の膜画分、6: 酵母膜画分 (AtSPP)

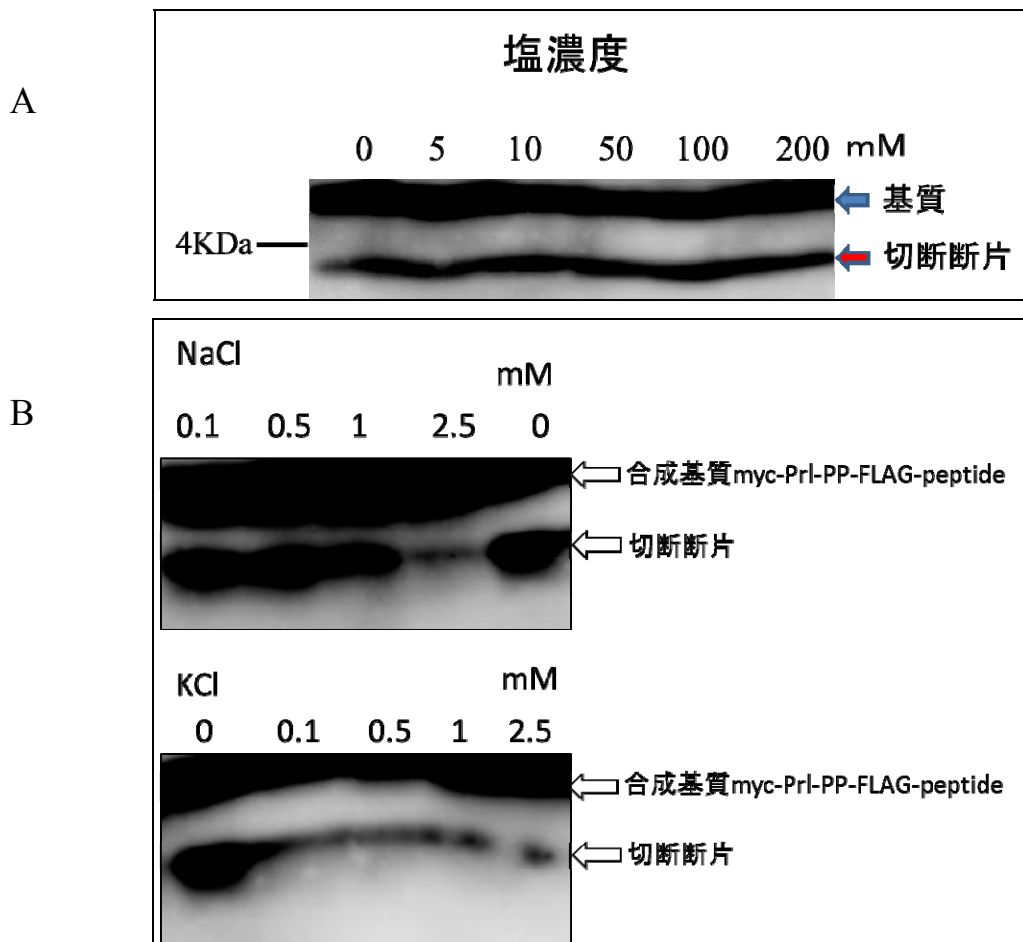


図 15 AtSPP の塩濃度が酵素活性に与える影響

なった。

4. 考察

モデル植物のシロイヌナズナの SPP を研究材料として、植物内で SPP がどのような基質を切断しているかを調べることによってこの酵素の利用範囲あるいは作用様式を推察することを目的に研究を行ってきた。まずは、RNAi を用いて AtSPP のノックダウン株を作出した。増加した発現変動遺伝子の最も濃縮された GO term が response to stress に所属し、その 42% が転写因子であった。このことから AtSPP は転写因子を制御して、ストレス応答に関わっていると推測できた。

さらに、AtSPP の過剰発現体を作成しその遺伝子発現プロファイルから、発現が有意に上昇していた遺伝子群の中でも GO term が鉄イオンへの応答に関わる response to iron ion であり、やはり酸化ストレス応答に関わると考えられた。発現が有意に減少していたなかでも GO term が亜鉛輸送に関わる zinc ion transport であった。これらの変異株の解析から AtSPP の役割の一つはストレス応答に関与する転写因子の発現を適切な条件下で調節している可能性がある。

今回、AtSPP が本当に酵素活性を有するのかわどかという酵素学的なアプローチも行なった。酵母に AtSPP を発現させたタンパク質により合成基質を切断することから植物内で実際にアスパラギン酸プロテアーゼとして機能していることが明らかとなった。さらに、塩類によりその活性に影響があるかどうかを調べたところ、少なくとも 1M 以上 2.5M よりも少ない濃度の NaCl によっても影響されないことが明らかとなった。膜内に存在する酵素であることから、ある程度の疎水的な環境下で働くことが予想される。例えばリン脂質が多い卵や大豆製品の中で塩類を含んでいる食品への利用の可能性が期待できる。

5. 今後の課題

今回のプロジェクトにより動物、昆虫など真核生物における生命維持に重要な働きを担っている SPP という酵素が今まで調べられていなかった植物にも存在し、その酵素に活性があることが明らかとなった。マイクロアレイ解析により変異株における発現遺伝子の変動を捉え、おおよそストレス応答に関与する傾向があることがつかめたが、基

質については同定するまでには至らなかった。今後は、データから推測される基質を合成して酵素反応を行い、基質を同定することにより酵素の有用範囲を知りたいと考えている。また、今回酵素活性に影響する塩類は NaCl と KCl のみしか調べられなかったが、今後は塩類の種類、濃度、pH など詳細に検討する必要があると考えている。

6. 引用文献

- 1) Weihofen A., Binns K., Lemberg MK., Ashman K nad Martoglio B (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* **296**, 2215-2218.
- 2) Tamura T., Asakura T., Uemura T. Ueda T, terauchi K., Misaka T., and Abe K. (2007) Signal peptide peptidase and its homologs in Arabidopsis thaliana-plant tissue-specific expression and distinct subcellular localization. *FEBS J* **275**, 34-43.
- 3) Han S. Green L, and Schnell DJ (2009). The signalpeptide peptidase is required for pollen function in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 1289-1301.
- 4) Friedmann E, Lemberg MK, Weihofen A, Dev KK, Dengler U, Rovelli G, MartoglioB(2004).Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem* **279**(49),50790-50798.
- 5) Drew D, Newstead S, Sonoda Y, Kim H, von Heijne G, Iwata S(2008).GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Nat Protoc* **3**(5),784-798.
- 6)Huang, C.H., Kuo, W.Y., Weiss, C., and Jinn, T.L.(2012) Copper Chaperone-Dependent and -Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in Arabidopsis. *Plant Physiology.* **158**(2),737-746.
- 7)Assunção, A.G.L., Herrero, E., Lin, Y.F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Van Eldik, M., Fiers, M., and Schat, H. (2010). Arabidopsis thaliana transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the

adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 10296-10301.

- 8) Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E(2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol*, **132**(1),161-173.

7. 論文業績および学会発表

(論文)

- Masako Hoshi, Yu Ohki, Keisuke Ito, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, Yoshiro Ishimaru, Keiko Abe, Tomiko Asakura (2013) Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide peptidase of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biochemistry* 14(1):16.

(学会発表)

- 2011年3月 農芸化学学会大会
シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP)のRNAiノックダウン株を用いた機能解明
- 2012年3月 農芸化学学会大会
「シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP)の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析」
- 2013年3月 農芸化学学会大会
「シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP)の発現系の構築及び酵素活性の解析」
- 2014年3月 農芸化学学会大会、
シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼ (AtSPP)の基質探索の為にリポーターアッセイ系の構築

Activation of Plant Signal Peptide Peptidase by Saline Solutions

Tomiko Asakura, Masako Hoshi

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo

Summary

Signal peptide peptidase (SPP) is a homologue of presenilin, which is involved in Alzheimer disease. Presenilin cleaves and releases the amyloid peptide from the plane of the plasma membrane. On the other hand, SPP cleaves the signal peptide from the ER membrane after shedding by a signal peptidase. SPP and SPP analogues have been found in various organisms, in some plants as well. The absence of these enzymes causes serious phenotype. *Arabidopsis thaliana* SPP (AtSPP) deletion mutant becomes lethal.

To reveal the functions of AtSPP, we produced a plant with knocked down AtSPP by using RNAi method. Besides, overexpressed AtSPP was produced using 35S cauliflower mosaic virus promoter by the floral dip method with *Agrobacterium tumefaciens*. Comprehensive gene expression of AtSPP KD flower and that in the wild type were analyzed by DNA microarray analysis. The DNA microarray data were normalized with the DFW algorithm using the statistical language R and Bioconductor. Differentially expressed genes (DEGs) between AtSPP KD and the wild type were extracted, and the Gene Ontology Enrichment Analysis was performed. About the gene expression in the overexpressed AtSPP flower, comprehensive gene expression was also analyzed in the same method. As a result, we found that the expression of stress-related genes was significantly increased in the AtSPP KD plant. In addition, 42% of these genes were transcription factors. This result indicates that AtSPP negatively regulates the expression of stress-related genes regulating transcription factors. On the other hand, we found that the expression of oxidation-reduction process related genes was significantly increased in the overexpressed AtSPP plant. These result indicate that AtSPP might be related oxidation stress.

Next, we examined whether AtSPP exhibit the proteolytic activity or not. An *n*-dodecyl- β -maltoside (DDM)-solubilized membrane fraction from *Arabidopsis* cells digested the myc-Prolactin-PP-Flag peptide, a human SPP substrate, and this activity was inhibited by (Z-LL)₂-ketone, an SPP-specific inhibitor. The proteolytic activities from the membrane fractions solubilized by other detergents were not inhibited by (Z-LL)₂-ketone. To confirm the proteolytic activity of AtSPP, the protein was expressed as either a GFP fusion protein or solely AtSPP in yeast. SDS-PAGE analysis showed that migration of the fragments that were cleaved by AtSPP were identical in size to the fragment produced by human SPP using the same substrate. These membrane-expressed proteins digested the substrate in a manner similar to that in *Arabidopsis* cells. We concluded that plant SPP possesses proteolytic activity and may be involved in RIP. Subsequently, application of AtSPP to food processing was examined. Salts are often used during food processing. There were no effect

to activity of protease until 200mM NaCl in reaction buffer. It is known that concentration of salt are 2.7M in soy sause. So we tested about more than 1.0 M of NaCl and KCl. The protease activity was detected at 1M NaCl, but not 2.5M NaCl. From the result of testing about KCl, enzyme activity were inhibited with100mM KCl. After considering these results, we specluated that AtSPP can be used for food processing with high content phosphatides (e.g. egg, soy bean) and under high concentration of salt.

プロトタイプ型カルパインのカルシウムおよび塩応答性の解析

前田 達哉

東京大学分子細胞生物学研究所

概要 【研究目的】 カルパインはカルシウムにより活性化されるプロテアーゼとして同定された、典型的な金属調節性酵素である。生体内ではカルシウムシグナリングの一翼を担い、種々の細胞機能に関わっていることが明らかにされつつあるが、他方、食肉の熟成に際して筋タンパク質を切断し、筋肉の軟化およびペプチドやアミノ酸など呈味性物質の遊離に重要な寄与を果たしていることが知られている。

哺乳類カルパイン 7 のオルソログは、酵母や真菌にまで最も広く保存されたカルパインのプロトタイプであると考えられる。酵母オルソログである Rim13 は塩・アルカリストレスに応答して活性化され、標的基質である転写因子 Rim101 を切断し活性化することにより、酵母の塩耐性・アルカリ耐性に寄与している。これらプロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性を検討するための *in vitro* 活性測定法の確立を目指した基礎研究を行った。

【研究結果】 Rim13 による Rim101 切断点を、Lys 533—Ser 534 のペプチド結合であると決定した。

Rim101 オルソログで切断点周辺配列を比較したところ、P1 部位はほとんどの種において Lys または Arg、P2 部位は調べた全ての種において Gln、P5 部位は Ser もしくは Gly であった。切断点の C 末端側には高い配列保存性は認められなかった。保存性の高い P1 部位の Lys と P2 部位の Gln を、それぞれ酸性アミノ酸 Asp と Ala に置換したところ、切断が起こらなくなった。C 末端側 3 残基をそれぞれ Ala に置換しても切断に影響は無かった。

Rim101 切断を高感度に検出する方法として、切断端特異抗体を利用することを構想した。既に優れた抗体が存在している PGAM5 の切断部位のアミノ酸配列を Rim101 の相当部位に移植したところ、正常型 Rim101 に遜色のない切断が観察された。

【考察と今後の課題】 本研究により、プロトタイプ型カルパインであるカルパイン 7 オルソログの生理基質切断点が、あらゆる生物種を通じて初めて決定された。また、Rim13 の基質認識に P1、P2 部位の残基が重要であること、C 末端側の配列が重要でないことが示された。

本研究を元に Rim13 とカルパイン 7 の *in vitro* アッセイ系を確立し、カルシウムや塩に対する応答性とその構造的基盤を明らかにしたい。カルパインファミリーに共通した制御機構が解明できれば、これまで経験論的にのみ導かれてきた食肉の熟成方法の改良に繋がることを期待される。

1. 研究の背景と目的

カルパインはカルシウムにより活性化されるプロテアーゼとして同定された、典型的な金属調節性酵素である¹⁾。生体内ではカルシウムシグナリングの一翼を担い、細胞分裂・細胞運動・細胞死(アポトーシス)などの基本的な細胞機能に関わっていることが明らかにされつつあるが、他方、食肉の熟成に際して筋タンパク質を切断し、筋肉の軟化

(解硬)およびペプチドやアミノ酸など呈味性物質の遊離に重要な寄与を果たしていることが古くから知られている²⁾。

哺乳類ゲノムには 14 種類のカルパインがコードされているが¹⁾、中でも組織普遍的に発現している触媒サブユニットであるカルパイン 1 とカルパイン 2 について古くから研究が進められ、カルシウムに応答した活性化の分子基盤

が、立体構造に関する知見を含めて明らかにされている³
⁴。最近、カルシウム結合ドメインを欠失させた触媒ドメインのみでも⁵、また、一次構造上はカルシウム結合ドメインを持たないとされていた分子種でも⁶、カルシウムにより活性化されることが示され、カルパインファミリーに属する分子種が一般にカルシウム応答性を有している可能性も考えられる。さらに最近、カルパイン3がカルシウムに代わってナトリウムイオンによっても活性化されることが明らかにされ、カルパインがカルシウムと塩の両者によって複雑な活性調節を受けている可能性も浮かび上がってきた⁷。

カルパインファミリーの分子種は進化を通じて見出され、中でも哺乳類カルパイン7のオルソログは、酵母や真菌にまで最も広く保存されたカルパインのプロトタイプであると考えられる⁸。酵母オルソログであるRim13は塩・アルカリストレスに応答して活性化され、標的基質である転写因子Rim101を切断し活性化することにより、酵母の塩耐性・アルカリ耐性に寄与している⁹(Fig. 1)。しかし、精製したカ

ルパインRim13も、哺乳類オルソログであるカルパイン7も、これまで*in vitro*では生理基質タンパク質を切断するプロテオリシス活性の検出に成功していない。そのため、これらプロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性も明らかではない。

これらプロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性を検討すると共に、応答性の構造的基盤を明らかにすることを最終的な目的として、プロトタイプ型カルパインの*in vitro*活性測定法を確立するための基礎研究を行った。これまで*in vitro*で活性を検出することに成功していない理由として、活性を保った状態での酵素の精製法が確立されていないことに加え、活性測定条件が最適化されていないため、活性の検出感度が著しく低いことが考えられる。そのため、基質の切断によって新たに生じるN末端もしくはC末端をエピトープとする抗体を、切断産物の高感度な検出に利用することを構想した。

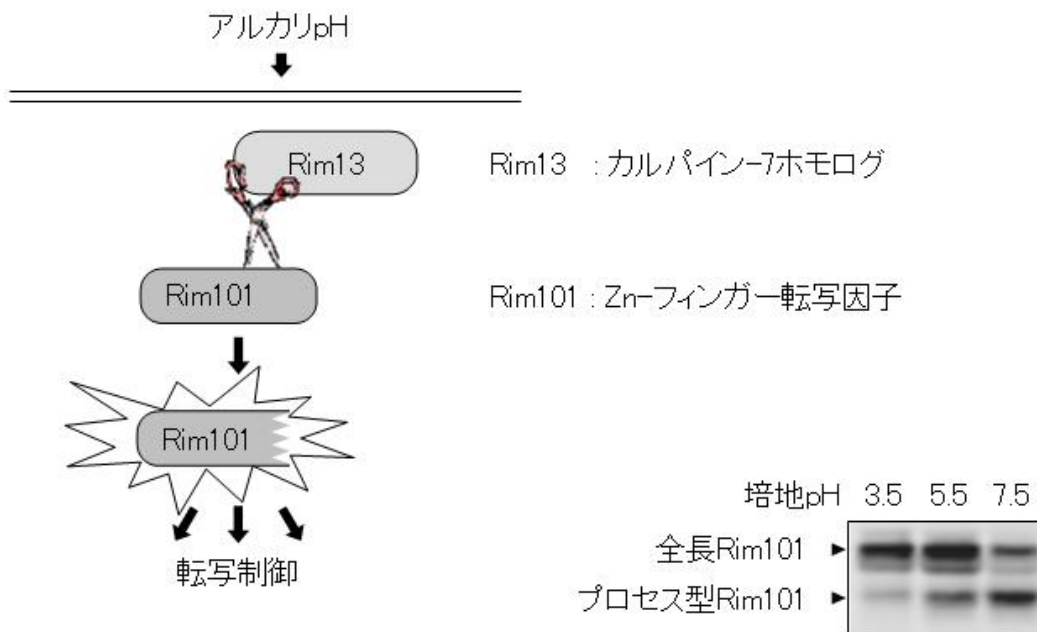


Fig. 1. 酵母カルパイン Rim13 はアルカリストレスに応答して転写因子 Rim101 を切断する

2. 研究方法

2.1 Rim101 切断産物精製用酵母株の構築

基質 Rim101 の *in vivo* における切断点を以下のように決定した (Fig. 2)。精製用のエピトープタグとして、Rim101 の C 末端に TAP タグ-3×HA タグ-6×His タグをタンデムに連結したものを導入した。また、高発現のためにプロモーターを本来の *RIM101* プロモーターから強力な *TEF* プロモーターに置換すると共に、転写因子である Rim101 を高発現することに伴う細胞毒性を回避するため、Zn フィンガーを含んだ Rim101 の N 末端側領域 (アミノ酸残基 1-296) を EGFP と置換した。また、Rim101 高発現のためのこれらの改変に加え、カルパイン Rim13 が恒常的に活性化されることを既に見出している *vps24* 変異¹⁰⁾を導入した株を作製し、Rim101 の C 末端側断片の精製に用いた。

2.2 Rim101 切断産物 C 末端側断片の精製

抗 HA 抗体を用いたウエスタン法により、2.1 で作製した Rim101 切断産物精製用酵母株で切断産物の C 末端側断片が大量に蓄積していることを確認した後 (Fig. 2)、以下のようにこの断片の精製を行った。この株を YPD 培地で培養した後、回収した菌体を破碎し、破碎上清を硫酸沈殿して C 末端側断片を濃縮した。沈殿を緩衝液に溶解した後、DEAE セファロース FF (GE ヘルスケア) にて C 末端側断片を粗精製した。さらに、TAP タグを利用して IgG セファロースビーズ (GE ヘルスケア) で精製した後、6×His タグを利用して Ni-NTA ビーズ (キアゲン) で精製し、C 末端側断片を得た。得られた C 末端側断片を SDS-PAGE により泳動し、CBB 染色によりバンドを検出した後、プロテインシーケンサー (477A/120A, アプライドバイオシステムズ) を用いたエドマン法に供し、N 末端からの配列を決定した。

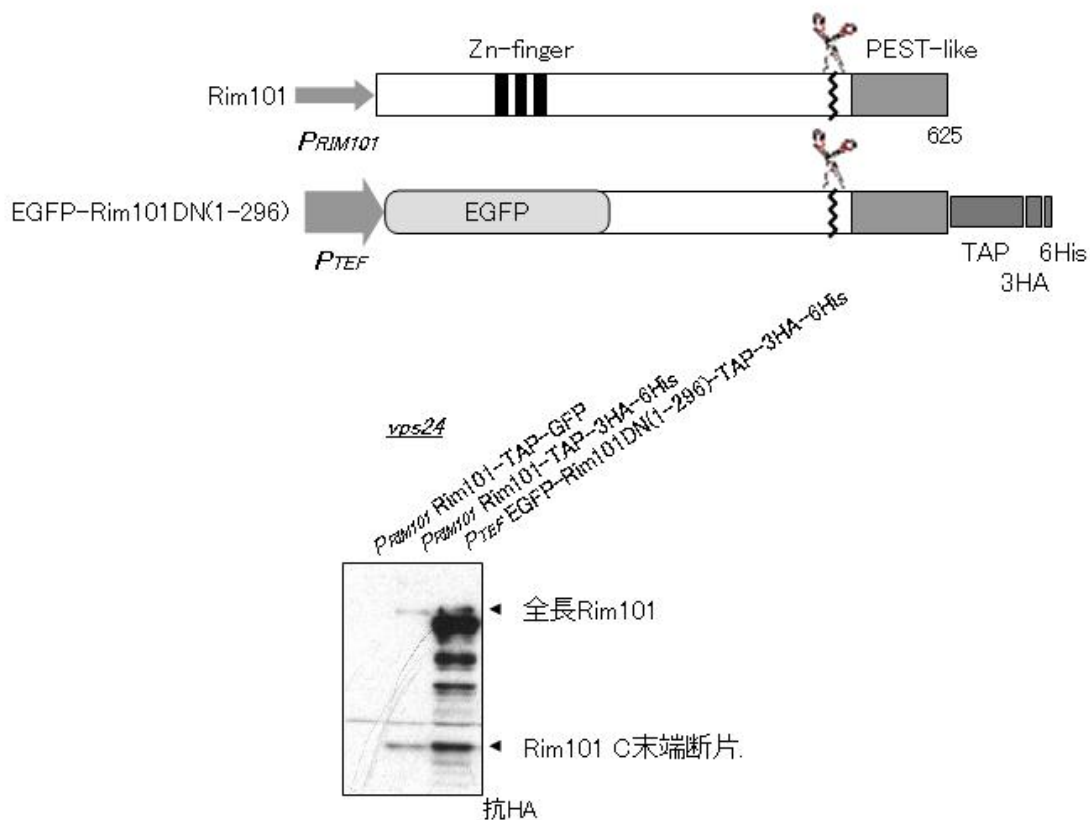


Fig. 2. Rim101 切断産物精製用酵母株の構築と切断産物の確認

2.3 アンヒドロトリプシンアガロースによる Rim101 切断産物の沈降実験

Rim101 切断産物のうち N 末端側断片の C 末端が Lys 533 であることを確認するために、C 末端が Lys または Arg 残基であるタンパク質やペプチドに対し弱酸性条件下で親和性を示すアンヒドロトリプシン (anhydrotrypsin) アガロースを用いた沈降実験を以下のように行った¹¹⁾。

Rim101 欠損変異株に、N 末端に 6×His+HA タグを融合した野生型 Rim101 を発現するプラスミドを導入した。形質転換体を培養し、菌体を遠心で回収した後、溶菌バッファー (100 mM Na-phosphate, 8 M urea, 300 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH8.0) に懸濁、0.5 mm 径のジルコニアビーズとマルチビーズショッカー (安井器械) を用いて菌体を破碎した。遠心で上清を回収した後、Ni-NTA アガロースビーズ (キアゲン) を加え、Rim101 タンパク質を回収した。ビーズを溶菌バッファー、洗浄バッファー 1 (50 mM Na-phosphate, 6M urea, 200 mM NaCl, 0.1 % NP-40, pH8.0)、洗浄バッファー 2 (50 mM Na-phosphate, 2M urea, 200 mM NaCl, 0.1 % NP-40, pH8.0) で順に洗浄した後、回収されたタンパク質を溶出バッファー (50 mM Na-Acetate, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH5.0) で溶出した。この溶出液を、11 倍容の酢酸・カルシウムバッファー (100 mM Na-Acetate, 20 mM CaCl₂) で希釈した後、アンヒドロトリプシンアガロースビーズ (タカラバイオ) を加え、4°C で 1 時間インキュベートした後、ビーズを酢酸・カルシウムバッファーで洗浄した。ビーズを SDS サンプルバッファーでインキュベートし、溶出されたタンパク質を抗 HA 抗体を用いたウエスタン法で解析した。

2.4 Rim101 切断部位変異体を用いた N 末端側切断産物 C 末端残基の解析

推定された切断点の N 末端側残基 Lys 533 を Ala に置換した変異体 (K533A)、C 末端側残基 Ser 534 を終止コドンに置換した変異体 (S534stop)、その両方を置換した変異体 (K533A S534stop) を、N 末端に 6×His+HA タグを融合した野生型 Rim101 発現プラスミドを母体に、部位特異的変異導入法により作製した。Rim101 欠損変異株にこれらの発現プラスミドを形質転換し、2.3 の方法でアンヒドロトリプシンアガロースを用いた沈降実験を行った。

2.5 切断点の近傍にアラニン置換を有する Rim101 変

異体の切断活性検定

同定した切断点の前後 3 アミノ酸残基 Asn 531、Gln 532、Lys 533、Ser 534、Cys 535、Thr 536 をそれぞれアラニン残基に置換した一連の Rim101 変異体 (N531A, Q532A, K533A, S534A, C535A, T536A) を発現するプラスミドを、N 末端に HA タグを融合した野生型 Rim101 発現プラスミドを母体に、部位特異的変異導入法により作製した。各々のプラスミドを Rim101 欠損変異株に導入し形質転換体を得た。各形質転換体のリチウムイオン感受性/耐性を、0.3 M LiCl を含む YPD 培地での生育を指標に評価した。さらに、各変異体のアルカリストレス依存的な切断の有無を以下のように検討した。形質転換体を pH 4.0 の培地で培養後、2 つに分け、培地をそれぞれ pH 4.0 と pH 8.0 に交換して 30°C で 20 分間培養した。菌体を遠心で回収し、細胞抽出液中の Rim101 変異体タンパク質を、抗 HA 抗体を用いたウエスタン法で検出した。

2.6 Rim101 切断における P1 部位の重要性の検討

Lys 533 を Asp に置換した変異体 (K533D) を、N 末端に HA タグを融合した野生型 Rim101 発現プラスミドを母体に、部位特異的変異導入法により作製した。Rim101 欠損変異株に野生型 Rim101 と K533D 変異体の発現プラスミドを導入し、2.5 と同様の方法で、形質転換体のリチウムイオン感受性/耐性を検討すると共に、Rim101 変異体のアルカリストレス依存的な切断の有無をウエスタン法により検討した。

2.7 切断点 C 末端特異抗体の調製と評価

切断によって新たに生じる C 末端に相当するペプチド EFSLNQQK を合成し、これを N 末端側に付加したリンカーを介してキャリアタンパク質 KLH (keyhole limpet hemocyanin) に結合したものを抗原にウサギを免疫した。抗原ペプチドを用いた ELISA 解析により血清中の抗体価の上昇が確認できたので、全採血を行い、抗血清を調製した。抗血清を抗原ペプチドカラムによって精製し、切断点特異的抗体を得た。

抗体の力価と特異性を以下の 2 つの方法により評価した。1) 抗原ペプチドを用いた ELISA 法。2) 切断を受けた野生型 Rim101 と、切断型 Rim101 変異体 (K533 のすぐ下流に終止コドン挿入することにより、切断を受けた Rim101 に相当するタンパク質を発現する) に対するウエスタン法。

2. 8 切断点 C 末端側配列を PGAM5 もしくはアミロイド β タンパク質の配列と置換した Rim101 変異体の切断活性検定

Rim101 切断点の C 末端側 4 アミノ酸残基 (Ser 534, Cys 535, Thr 536, Asn 537)、もしくは 3 アミノ酸残基 (Ser 534, Cys 535, Thr 536) を、PGAM5 とアミロイド β タンパク質のそれぞれの切断によって新規に生じる N 末端エピトープに相当するアミノ酸配列 (Ala-Val-Ala-Val, Ala-Val-Ala, Asp-Ala-Glu-Phe, Asp-Ala-Glu) に置換した一連の Rim101 変異体 (S534A C535V T536A N537V: AVAV, S534A C535V T536A: AVA, S534D C535A T536E N537F: DAEF, S534D C535A T536E: DAE) を発現するプラスミドを、N 末端に HA タグを融合した野生型 Rim101 発現プラスミドを母体に、部位特異的変異導入法により作製した。各々のプラスミドを Rim101 欠損変異株に導入し、2.5 と同様の方法で、形質転換体のリチウムイオン感受性/耐性を検討すると共に、Rim101 変異体のアルカリストレス依存的な切断の有無をウエスタン法により検討した。

3. 研究結果

3. 1 カルパイン Rim13 による Rim101 切断点の同定

6 L の培養から、最終的には約 100 ng (2 pmol) の精製 C 末端側断片が得られた。精製における収率は約 2 % と見積もられた。

プロテインシーケンサーにより N 末端からの配列を決定したところ、SCTNDIIMSKLA と判読できた。これは Rim101 のアミノ酸配列の、残基番号 534 から 545 と一致した。したがって、Rim13 による Rim101 の切断点は、Lys 533 と Ser 534 の間のペプチド結合であると推定される (Fig. 3)。また、この場所は、N 末端側断片の電気泳動上の移動度や変異体の挙動などから従来切断点としておおまかに予測されていた、残基番号 Leu 530 と Gln 531 の間とも近かった (Fig. 3)¹²。

3. 2 カルパイン Rim13 による Rim101 切断点の確認

Rim13 による Rim101 の切断点は、Lys 533 と Ser 534 の間のペプチド結合であると推定された。この切断点は細胞内に蓄積していた C 末端側断片の N 末端配列から決定したものであるが、この N 末端が実際の切断点を直接反映したものであることは必ずしも確かではない。例えば、複数あった切断点の内から細胞質中で安定性の高い N 末端を持っているものが選択的に残っていた可能性や、Rim13 による切断の後に、N 末端のアミノ酸残基がエキソペプチダーゼなどで失われ、それによって安定化されたもののみが蓄積していた可能性は排除できない。そこで、これが本来の切断点であることを確認するため、Rim101 切断産物のうち N 末端側断片の C 末端が Lys 533 であることを、アンヒドロトリプシン (anhydrotrypsin) アガロースを用いて検証した。

アンヒドロトリプシンは、トリプシンを非可逆的阻害剤である phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) で修飾後、強塩基で処理することにより、活性中心である Ser 195 残基を dehydroalanine に変換したものである。トリプシンとしての触媒活性を失っているが、トリプシンの基質特異性を反映して、C 末端が Lys または Arg 残基であるタンパク質やペプチドに対し弱酸性条件下で親和性を示す (Fig. 4)。このことを利用して、アフィニティー担体であるアガロースにアンヒドロトリプシンを固定化したビーズは、タンパク質やペプチドの混合物から C 末端に Lys または Arg 残基を持つものを特異的に回収する目的に用いられている¹¹⁾。

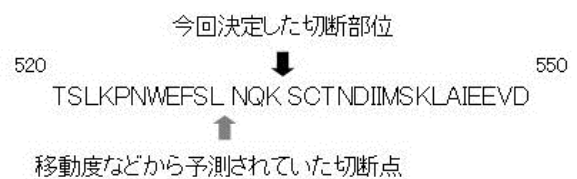


Fig. 3. 決定した Rim101 切断部位とその近傍のアミノ酸配列

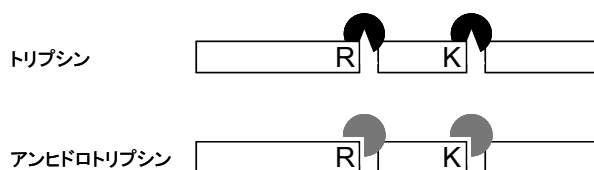


Fig. 4. トリプシンが Lys または Arg 残基の C 末端側でタンパク質を切断するのに対し、アンヒドロトリプシンは C 末端が Lys または Arg 残基であるタンパク質やペプチドに対し親和性を示す

Rim101 切断産物を含んだ細胞抽出液から、Rim101 の N 末端に付加したタグを利用してまず Rim101 を含む画分を精製した。この精製物中のアンヒドロトリプシンアガロースに結合する画分に、Rim101 切断産物が含まれるか否かをウエスタン法により検討したところ、N 末端側断片が確かに含まれていることを確認した (Fig. 5)。これに対して、切断を受けていない全長型 Rim101 は含まれていなかった (Fig. 5)。このことは、観察された N 末端側断片のアンヒドロトリプシンアガロースへの結合が特異的であることを示唆している。

さらに、特異性に対して検討を加えるため、予測切断部位に変異を導入した Rim101 変異体を作製し、アンヒドロトリプシンアガロースへの結合を検討した。その結果、Lys 533 を Ala に置換した Rim101 変異体 (K533A) は、野生型 Rim101 と同様に切断を受けるものの、アンヒドロトリプシンアガロースへの結合は認められなかった (Fig. 5)。

これが、切断産物 N 末端側断片の C 末端残基の差異に基づくものであることを確認するため、予測される N 末端側断片と同一の構造を有する切断型 Rim101 変異体を作製し、同様の解析を行った。Ser 534 を終止コドンに置換した Rim101 変異体 (S534stop) は、野生型 Rim101 切断産物の予測される N 末端側断片と同一の構造を有する。Lys 533 を Ala に置換すると共に Ser 534 を終止コドンに置

換した Rim101 変異体 (K533A S534stop) は Rim101 K533A 変異体切断産物の予測される N 末端側断片と同一の構造を有する。これらのアンヒドロトリプシンアガロースへの結合を検討したところ、Rim101 S534stop 変異体は結合したのに対し、Rim101 K533A S534stop 変異体の結合は認められなかった (Fig. 5)。

以上の結果は、Rim101 切断産物の N 末端側断片の C 末端が Lys 533 であることを示している。C 末端側断片の N 末端が Ser 534 であることと併せて、Rim13 による Rim101 の切断点は Lys 533 と Ser 534 の間のペプチド結合であることが確認された。

3.3 切断点の近傍にアラニン置換を有する Rim101 変異体の切断活性検定

同定した切断点の前後 3 アミノ酸残基をそれぞれアラニン残基に置換した一連の Rim101 変異体 (N531A, Q532A, K533A, S534A, C535A, T536A) を Rim101 欠損変異酵母細胞で発現したところ、Q532A を発現した細胞のみが Rim101 欠損変異細胞と同様のリチウムイオン感受性を示し、Q532A 変異体が機能を失っていることが示された。Rim101 は切断を受けることで活性化されるため、このことは Q532A 変異体が切断を受けないことを示唆している。これに対して他の 5 つの変異体を導入した細胞は、正常型 Rim101 を導入した細胞と同様のリチウムイオン耐性を示

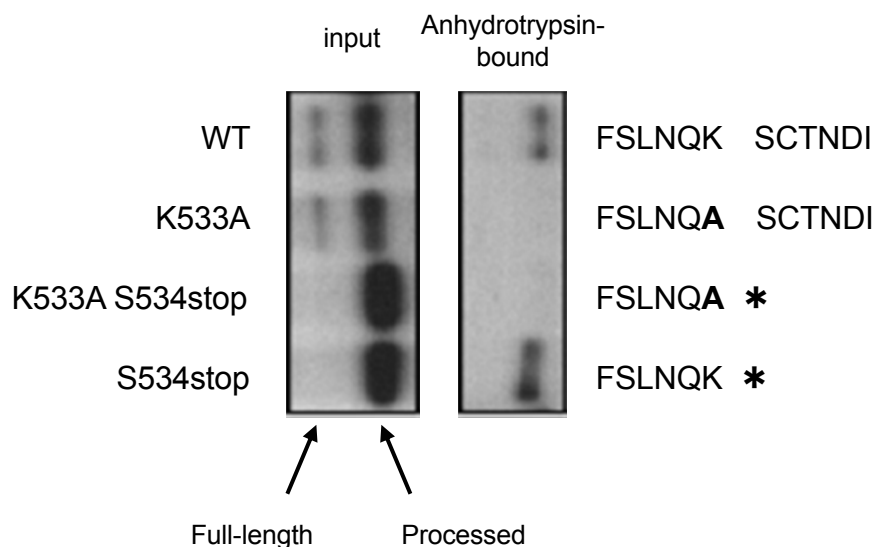


Fig. 5. Rim101 切断産物 N 末端側断片はアンヒドロトリプシンに結合し、その結合は Lys 533 に依存する。右には各 Rim101 変異体の予測切断部位周辺のアミノ酸配列を示した。

し、正常な機能を保持していること、すなわち正常に切断を受けることが示唆された (Fig. 6)。さらに、*in vivo* における Rim101 変異体の切断の有無をウエスタン法により実際に検討したところ、Q532A は切断が認められなかったのに対し、他の 5 つの変異体は正常型 Rim101 と同様のアルカリストレス依存的な切断が観察された (Fig. 6)。

3. 4 Rim101 オルソログにおける切断点周辺配列の保存性

Rim13-Rim101 経路は真菌に広く保存されている。種々の酵母や糸状菌の Rim101 オルソログで、Rim101 切断点の周辺配列がどの程度保存されているかを検討した。17 種の酵母と 2 種の糸状菌で比較したところ、切断点の N 末端側の残基 (P1 部位) は 15 種で Lys、3 種で Arg、1 種で Ser であった (Fig. 7)。また、切断点の N 末端側の 2 残基目 (P2 部位) は、全ての種において Gln であった (Fig. 7)。さらに、切断点の N 末端側 5 残基目 (P5 部位) は、16 種で Ser、3 種で Gly であった。これに対して、切断点の C 末端側には高い配列保存性は認められなかった (Fig. 7)。

3. 5 Rim101 切断における P1 部位の重要性

3. 3 における解析から、P1 部位を Ala に置換しても野生型 Rim101 と同様に切断されることを明らかにしている。

しかしながら、3. 4 で明らかにしたように、Rim101 オルソログの該当する領域において、P1 部位はほとんどが塩基性アミノ酸残基であった。そこで、P1 部位の Lys を、酸性アミノ酸である Asp に置換して切断に及ぼす影響を検討した。Lys 533 を Asp に置換した Rim101 変異体 (K533D) の *in vivo* における切断の有無をウエスタン法により検討したところ、切断が全く認められなかった (Fig. 8)。また、このことと一致して、Rim101 K533D 変異体を Rim101 欠損変異酵母細胞で発現しても、Rim101 欠損変異細胞と同様のリチウムイオン感受性を示し、K533D 変異体が機能を失っていることが確認された (Fig. 8)。

3. 6 切断端特異抗体の調製と評価

切断によって新たに生じる C 末端に相当するペプチド EFSLNQK を抗原にウサギを免疫し、得られた抗血清を抗原ペプチドカラムによって精製することで切断点特異的抗体を得た。しかしながら、ペプチド抗原を用いた ELISA において切断点への特異的結合が確認されたにもかかわらず、切断を受けた野生型 Rim101、もしくは切断型 Rim101 変異体を抗原とするウエスタン法では切断産物を認識することができなかった (データは示していない)。

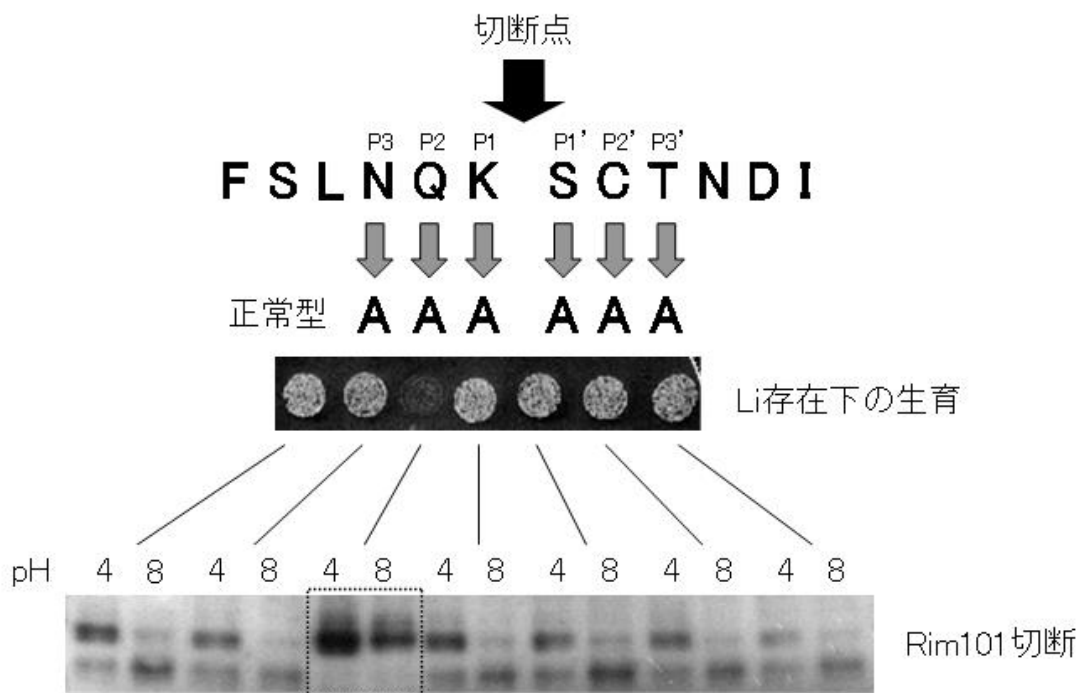


Fig. 6. 切断点近傍にアラニン置換を有する Rim101 変異体の切断活性。上: 正常型 Rim101 と Rim101 変異体を持つ株の Li 含有培地における生育。下: pH 4.0 と pH 8.0 における正常型 Rim101 と Rim101 変異体の切断。

切断点

<i>S. cerevisiae</i>	PNWEFSLN Q K	SCTNDIIMSK
<i>Y. lipolitica</i>	RQMSVGV T QR	AARTTNVEES
<i>A. nidulans</i>	RRYTGG T LQR	ARPASRAASE
<i>N. crassa</i>	RRLSGG V LQS	ARRAADEADR
<i>C. lusitaniae</i>	NFGGVS N SQK	SGQKLETEDT
<i>D. haansenii</i>	EFGGVS N FQK	SAKPLEEASS
<i>L. elongisporus</i>	EYNGV S VYQK	SGQKLDDVEP
<i>C. parapsilosis</i>	EFNGV S VYQK	AGQKLDDDEDE
<i>C. tropicalis</i>	EFNGI S TYQK	SAQPDSSDDE
<i>C. albicans</i>	EFGG V STYQK	SAQSYEEDSS
<i>C. glabrata</i>	TYDT F STN Q K	SCADEEEEEIY
<i>K. lactis</i>	YSNN Y SL H QR	TALLDAEANE
<i>S. bayanus</i>	PNWEFSLN Q K	SCTNDIIMSK
<i>S. mikatae</i>	PNWEFSLN Q K	SCTNDIILSK
<i>S. paradoxus</i>	PNWEFSLN Q K	SCTNDIIMNK
<i>S. castelli</i>	NMAG F ST I QK	NNGSVVEAMN
<i>A. gossypii</i>	ARNS Y SLN Q K	ASLNEELCEN
<i>K. waltii</i>	RTNA F SL H QK	NSGSLQEDQN
<i>S. kluyveri</i>	GGHM F SV H QK	NNGTAAASTE

Fig. 7. 種々の真菌における Rim101 オルソログの切断点周辺配列の比較

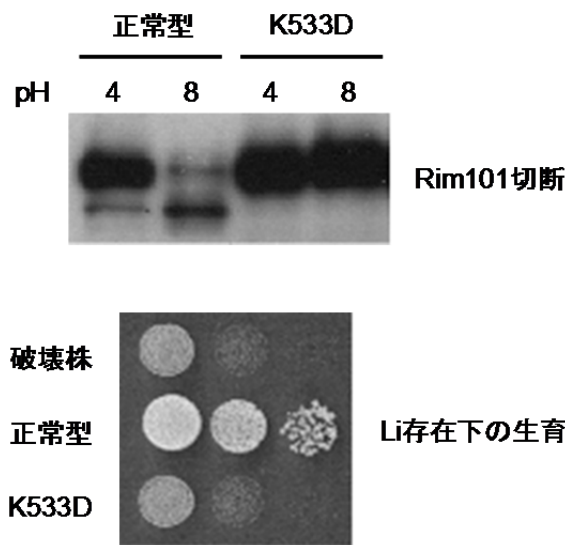


Fig. 8. Rim13 による Rim101 切断における P1 部位の重要性。上:pH 4.0 と pH8.0 における野生型 Rim101 と Rim101 K533D 変異体の切断。下:野生型 Rim101 と Rim101 K533D 変異体を持つ株の Li 含有培地における生育。

3.7 切断点 C 末端側配列を既知の切断タンパク質の相当配列と置換した Rim101 変異体の切断活性検定

3.4における Rim101 オルソログの解析から、Rim101 切断点の N 末端側配列に著しい保存性が認められたのに対し、C 末端側には高い配列保存性は認められなかった。また、3.3における Rim101 切断点 C 末端側 3 アミノ酸残基のアラニン置換は、いずれも切断に影響を与えなかった。これらのことから、Rim101 切断点の C 末端側は Rim13 による切断に必要な配列上の制限が緩い可能性が考えられる。もしそうであるなら、この部分を既知の切断タンパク質の相当配列と置換することによって、これらのタンパク質に対する切断端特異抗体を流用して Rim101 切断産物を検出するという方法論が適用できる可能性がある (Fig. 9)。

PGAM5 (phosphoglycerate mutase 5) はミトコンドリア内膜に局在するプロテインホスファターゼで、ミトコンドリアの傷害に応答して膜貫通ドメインで切断されることが明らかにされている¹³⁾。切断によって新たに生じる N 末端配列は NH₂-AVAVGKPR---であり、この N 末端を特異的に認識する抗体が得られている¹³⁾ (Fig. 9)。アミロイド β タンパク質

(Aβ) はアルツハイマー病の脳に蓄積する老人斑の構成成分で、Aβ 前駆体タンパク質 (APP) が切断を受けることで産生される。β-セクレターゼによる切断で生じる Aβ の N 末端配列は NH₂-DAEFRHDSGYEVHHQK---であり、この N 末端を特異的に認識する抗体が得られている¹⁴⁾ (Fig. 9)。

そこで、Rim101 切断点の C 末端側 4 アミノ酸残基 (Ser 534, Cys 535, Thr 536, Asn 537)、もしくは 3 アミノ酸残基 (Ser 534, Cys 535, Thr 536) を、これら 2 種類の切断タンパク質それぞれの切断点 C 末端側の相当配列に置換した一連の Rim101 変異体 (S534A C535V T536A N537V: AVAV, S534A C535V T536A: AVA, S534D C535A T536E N537F: DAEF, S534D C535A T536E: DAE) を Rim101 欠損変異酵母細胞で発現したところ、リチウムイオン耐性は、「正常型 > AVA > AVAV > DAE > DAEF > 欠損変異」の順であった (データは示していない)。さらに、*in vivo* における Rim101 変異体の切断の有無をウエスタン法により検討したところ、リチウムイオン耐性と一致した切断効率、すなわち AVA 変異は正常型に近い切断を、AVAV はそれに次ぐ切断を、DAE 変異体は効率の低い切断を示した (Fig. 10)。

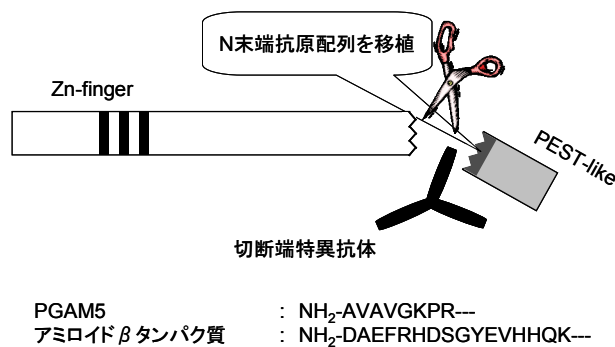


Fig. 9. 切断点 C 末端側配列を既知の切断タンパク質の相当配列と置換することにより、既存の切断端特異抗体を流用して切断産物を検出する

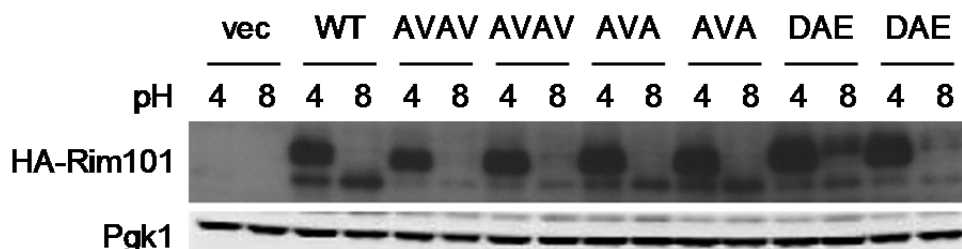


Fig. 10. 切断点 C 末端側配列を PGAM5 とアミロイド β タンパク質の相当配列と置換した Rim101 変異体の切断活性検定

4. 考察

本研究により、プロトタイプ型カルパインであるカルパイン 7/Rim13 オルソログの生理基質切断点が、全ての生物種を通じて初めて決定された。

同定した切断点周辺配列を種々の真菌の Rim101 オルソログと比較したところ、P1 部位はほとんどの種において塩基性アミノ酸残基、P2 部位は全ての種において Gln、P5 部位は Ser もしくは Gly であった (Fig. 7)。これに対して、切断点の C 末端側には高い配列保存性は認められなかった (Fig. 7)。ほとんどの種において塩基性アミノ酸残基であった P1 部位を酸性アミノ酸残基である Asp に置換したところ、切断が全く認められなくなった (Fig. 7)。このことは、P1 部位が塩基性アミノ酸残基であることか、あるいは少なくとも酸性アミノ酸残基でないことが、Rim13 による切断において重要であることを示している。また、切断点の N 末端側 3 残基 (P3~P1 部位) と C 末端側 3 残基 (P1'~P3' 部位) をそれぞれ Ala に置換した変異体の切断を評価したところ、P2 部位の Gln を置換した場合にのみ切断が起こらなくなり、P2 部位が Gln であることが Rim13 による切断に重要であることが明らかになった (Fig. 6)。これに対して、P5 部位が Ser もしくは Gly であることが切断に及ぼす影響は今のところ不明であり、今後、検討される必要がある。

カルパインの基質特異性において、P1 部位に塩基性アミノ酸が好まれる傾向があることは、組織普遍型カルパインにおいても報告されたことがある¹⁵⁾。また、ここで明らかにした Gln とは一致しないものの、基質特異性における P2 部位の重要性も報告されている¹⁵⁾。しかしながら、バイオフィォマティクスを駆使したカルパインの基質特異性に関するさらに包括的な解析によると、この傾向は当初考えられていた程には顕著でないとも報告されており¹⁶⁾、さらに注意深い検討が必要であろう。Rim101 オルソログ間の比較から、切断点 C 末端側配列に対する Rim13 の特異性は高くないことが示唆された。また、試みた 6 つのアラニン置換体 Rim101 の内、5 つが正常に切断を受けていることから、Rim13 による Rim101 の切断は、P1、P2 部位を除いては切断点近傍のアミノ酸配列に対する依存性が高くないことも明らかになった。このことは、組織普遍的カルパインの基質特異性が、調べられたいくつかの例において、切断点のアミノ酸配列よりもむしろ切断点近傍のドメイン

構造の配置などで決定されているという報告と一致している¹⁷⁾。本研究で見出された P1、P2 部位に対する切断効率の高い依存性、P5 部位に見出された保存性は、カルパイン 7/Rim13 オルソログに特有の性格である可能性も考えられる。

本研究では、同定した切断点の情報を元に、切断により新たに生じる C 末端をエピトープとする切断端特異抗体の調製を試みた。しかしながら、得られた抗体は、ペプチド抗原を用いた ELISA において切断点への特異的結合が確認されたにもかかわらず、残念ながら Rim101 切断産物をウエスタン法では認識することができなかった。細胞質中に存在するタンパク質の多くが N 末端にアセチル化修飾を受けているのに対し、大部分のタンパク質の C 末端は非修飾のまま露出されていると考えられるので、一般にタンパク質の C 末端は抗原性が低いという事情があるのかも知れない。いずれにしても、高感度で切断を検出する方法論の確立は、プロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性を検討するためには欠くことのできないステップであるので、新たな方法論を開発することを目的に研究を進めた。

考えられる一つの方法は、切断によって新たに生じる N 末端に対する抗体を調製することであるが、高い特異性と親和性を備えた切断端特異抗体を得ることは必ずしも容易ではない。これに代わる方法として、既に優れた切断端特異抗体が存在している切断タンパク質の切断 N 末端配列を Rim101 の相当部分に移植することにより、これらのタンパク質に対する切断端特異抗体を流用して Rim101 切断産物を検出することを構想した (Fig. 9)。上記のように、Rim13 による Rim101 の切断は、切断点 C 末端側のアミノ酸配列に対する依存性が高くないため、この部分の 4 アミノ酸残基もしくは 3 アミノ酸残基を、PGAM5 とアミロイド β タンパク質のそれぞれの相当配列と置換したところ、PGAM5 の 3 アミノ酸残基と置換した変異体が正常型に遜色のない切断効率を示し、PGAM5 の 4 アミノ酸残基と置換した変異体がそれに次ぐ効率を示したため、これらの置換変異体を用いた切断検出法は有望である。PGAM5 の切断端特異的抗体を用いた検出法の確立を進めている。

カルパインは食肉の熟成に際して筋タンパク質を切断し、筋肉の軟化 (解硬) およびペプチドやアミノ酸など呈味性物質の遊離に重要な寄与を果たしていることが古くから知

られている²⁾。哺乳類ゲノムには 14 種類のカルパインがコードされているが、食肉の熟成に関わるカルパインがいずれであるかについては、必ずしも明らかではない。これまでは主として発現量の多いカルパイン 1 とカルパイン 2 について解析が進められていたが、カルパインファミリーに属する他の分子種の寄与についても再検討されるべきであろう。本研究の対象である Rim13 とその哺乳類オルソログであるカルパイン 7 は、カルパインのプロトタイプとしてカルパインファミリーに共通した制御機構を備えていることが期待される。本研究で明らかにした知見は、これらプロトタイプ型カルパインの *in vitro* 活性測定法の開発に直接に結びつく成果である。確立した活性測定法を用いて、プロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性を検討すると共に、応答性の構造的基盤を明らかにすることができれば、カルパインファミリーに共通した制御機構の解明につながるだろう。このことはさらに、これまで経験論的にのみ導かれてきた食肉の熟成方法を、さらに良いもの、あるいはさらに新しいものとするための基礎知見を提供するものであることが期待される。

5. 今後の課題

本研究で開発した PGAM5 切断部位移植 Rim101 と PGAM5 切断端特異抗体とを用いた *in vitro* 活性測定法の確立を急ぐ必要がある。また、さらに高感度で切断を検出する方法論の確立が強く望まれるので、切断によって新たに生じる N 末端に対する抗体を調製することも引き続き試みたい。

高感度で切断を検出することが可能になったら、それを用いた Rim13 とカルパイン 7 の *in vitro* アッセイ系を確立したい。Rim13 は酵母から、その哺乳類オルソログであるカルパイン 7 は哺乳類培養細胞から、いずれも組換え DNA 技術を用いて導入した精製用のタグを利用して精製することが可能である。これらのカルパインはエンドソーム膜上、もしくは細胞膜上で活性プロテアーゼ複合体を形成することで活性化されると考えられているので、複数の構成因子に異なった精製用タグを導入することで、複合体を形成している画分のみを精製することも試みたい。膜脂質との相互作用が活性に必要である可能性も考えられるので、界面活性剤を工夫することや、脂質ナノディスクを調製することも必要かもしれない。ウエスタン法あるいは

ELISA 法を活用して微弱な切断活性を高感度に検出できるようになったら、プロテオリシスの反応条件の最適化を図り、それを用いてこれらプロトタイプ型カルパインのカルシウムや塩に対する応答性を明らかにしたい。これらの解析を通じて、最終的な目的である応答性の構造的基盤の解明に迫りたい。

6. 引用文献

- 1) Ono Y and Sorimachi H.
Calpains - an elaborate proteolytic system.
Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics 1824: 224-236 (2011)
- 2) Koohmaraie M.
Muscle proteinases and meat aging.
Meat Sci. 36: 93-104 (1994)
- 3) Hanna RA, Campbell RL, and Davies PL.
Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin.
Nature 456: 409-412 (2008)
- 4) Moldoveanu T, Gehring K, and Green DR.
Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains.
Nature 456: 404-408 (2008)
- 5) Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL.
A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain.
Cell 108: 649-660 (2002)
- 6) Hata S, Sorimachi H, Nakagawa K, Maeda T, Abe K, and Suzuki K.
Domain II of m-calpain is a Ca²⁺-dependent cysteine protease.
FEBS Lett. 501: 111-114 (2001)
- 7) Ono Y, Ojima K, Torii F, Takaya E, Doi N, Nakagawa K, Hata S, Abe K, Sorimachi H.
Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease.
J Biol Chem. 285: 22986-22998 (2010)
- 8) Maki M, Maemoto Y, Osako Y, Shibata H.
Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins.

- FEBS J. 279: 1414-1421 (2012)
- 9) Maeda T.
The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi.
FEBS J. 279: 1407-1413 (2012)
- 10) Hayashi M, Fukuzawa T, Sorimachi H, Maeda T.
Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway.
Mol Cell Biol. 25: 9478-9490 (2005)
- 11) Ishii S, Yokosawa H, Kumazaki T, Nakamura I.
Immobilized anhydrotrypsin as a specific affinity adsorbent for tryptic peptides.
Methods Enzymol. 91: 378-383 (1983)
- 12) Li W, Mitchell AP.
Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth.
Genetics. 145: 63-73 (1997)
- 13) Sekine S, Kanamaru Y, Koike M, Nishihara A, Okada M, Kinoshita H, Kamiyama M, Maruyama J, Uchiyama Y, Ishihara N, Takeda K, Ichijo H.
Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5.
J Biol Chem. 287: 34635-34645 (2012)
- 14) Horikoshi Y, Sakaguchi G, Becker AG, Gray AJ, Duff K, Aisen PS, Yamaguchi H, Maeda M, Kinoshita N, Matsuoka Y.
Development of Abeta terminal end-specific antibodies and sensitive ELISA for Abeta variant.
Biochem Biophys Res Commun. 319: 733-737 (2004)
- 15) Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, Hudecz F, Friedrich P.
On the sequential determinants of calpain cleavage.
J Biol Chem. 279: 20775-20785 (2004)
- 16) duVerle DA, Ono Y, Sorimachi H, Mamitsuka H.
Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning.
PLoS One 6:e19035 (2011)
- 17) Sakai K, Akanuma H, Imahori K, Kawashima S.
A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis.
J Biochem. 101: 911-918 (1987)
7. 論文業績および学会発表
- 発表時期: 2012年 3月 23日
投稿雑誌名: the FEBS Journal 279: 1407-1413
題目: 酵母と糸状菌における環境 pH 検知と適応のためのシグナル伝達機構(訳)
The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi.
- 発表時期: 2012年 09月 05日
発表学会名: 酵母遺伝学フォーラム・第45回研究報告会(京都大学宇治キャンパス)
題目: カルパイン様プロテアーゼ Rim13 による Rim101 切断部位の同定
- 発表時期: 2013年 8月 29日～9月 3日
発表学会名: 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology
題目: 酵母カルパイン様プロテアーゼ Rim13 によるアルカリ応答性転写因子 Rim101 における切断点の同定(訳)
Identification of the yeast calpain-like protease Rim13 cleavage site in the alkaline responsive transcriptional factor Rim101.

An Analysis of the Calcium- and Salt-Dependence of Prototypical Calpains

Tatsuya Maeda

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Summary

Calpains are typical metalloenzymes, which are originally identified as calcium-activated neutral proteases. They are key players of calcium signaling in living organisms, and thus are involved in various basic cellular functions, such as cell division, cellular movement, and cell death. On the other hand, during the course of meat aging, they contribute to meat tenderization and release of taste components including peptides and amino acids by degrading muscle proteins.

The mammalian genome encodes 14 members of calpains. Among which, calpain-7 is thought to be a prototype, as it is most widely conserved even to yeast and fungi. The yeast ortholog Rim13 contributes to the salt- and alkaline-tolerance of yeast, by being activated in response to salt and alkaline stresses, and proteolyzing and thereby activating its target substrate, the transcription factor Rim101. The calcium- and salt-responsiveness of these prototypical calpains are, however, poorly characterized, mainly because only limited biochemical research tools are available.

In this study, we have identified the Rim101 cleavage site by Rim13 as a peptide bond between Lys 533 and Ser 534. By comparing the peptide sequences around the cleavage sites of Rim101 orthologs from various fungal species, we found that the P1 residues are mostly Lys or Arg, the P2 residues are exclusively Gln, and the P5 residues are Ser or Gly. On the other hand, the sequences are poorly conserved at the C-terminal side of the cleavage site. When the well-conserved P1 residue Lys 533 was mutated to acidic Asp, or the P2 residue Gln 532 to Ala, the cleavage was inhibited. In contrast, when each of the C-terminal three residues was mutated to Ala, the cleavage was unaffected. Replacing the C-terminal three or four consecutive residues were replaced with those from PGAM5, whose cleavage is able to be monitored by the cleavage-specific antibody, the cleavage was almost normal.

From this study, a physiological cleavage site by a calpain-7/Rim13 ortholog was firmly determined for the first time in any organisms. It was also shown that the identity of the P1 and P2 residues is crucial for the substrate recognition by Rim13. Methodology to detect the Rim101 proteolytic cleavage by Rim13 with high sensitivity is being constructed.

高等植物由来ポリフェノールオキシダーゼにおける塩化物イオンによる 活性阻害機構の多核 NMR 法を用いた解析

吉村 悦郎, 井村 祐己

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

概要 ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)はポリフェノールのキノンへの酸化を触媒する酵素である。PPO の生理学的意義は明確になっていないが、食品ではコーヒーや紅茶の着色で有益な役割を演じている。一方では、野菜や果物類において、出荷、貯蔵ならびに処理工程における損傷で変色の原因ともなっている。したがって、食品工業では PPO 活性の制御は重要な因子といえる。

マッシュルーム由来の PPO を用いてカテコールのキノンへの酸化反応では、高濃度の基質が存在すると、反応速度が減少する基質阻害が存在することが明らかとなった。また、ハロゲン化物イオンは低濃度のカテコール存在下では PPO 活性を阻害したが、基質阻害が生じるカテコール濃度ではハロゲン化物イオンによる阻害は小さくなっていた。これらの結果は、PPO にはカテコールに対して活性部位(site A)と阻害部位(site B)を有していること、ならびに site B へのハロゲン化物イオンの結合は酵素活性を低下させることが明らかとなった。以上の二つのカテコール結合サイトを仮定して作成した反応速度式のパラメーターを非線形最小二乗法で求めた値は、実際の反応過程を忠実に再現した。

また、ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害は、低 pH 領域で生じることが明らかになった。PPO は、活性部位に複数の Cu を有しており、それぞれに3つの His 残基が結合している。したがって、低 pH において、活性部位では Cu-His 間の結合が切断され、そこにハロゲン化物イオンが配位し、反応を阻害すると解釈された。

基質と酵素との結合の解析では、カテコールを用いると反応が進行してしまい、複雑化する。このために、競合阻害剤の探索を行った。速度論の解析の結果、コウジ酸が PPO 活性に対して競合阻害を行うことが明らかになったため、これを用いて PPO との結合の解析を行った。

酵素と基質結合の熱力学的パラメーターを得るために、等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry; ITC)ならびに ^1H NMR での飽和移動差スペクトル Saturation transfer difference(STD)の測定を行った。その結果、コウジ酸は PPO に結合するものの、その結合力はハロゲン化物イオンが存在しても変化しないことが示された。活性部位の金属の酸化状態をたとえば、 $[\text{Cu}(\text{II})_2]$ のように示すと、PPO による酵素反応は、 $[\text{Cu}(\text{II})_2]$ 状態の酵素がカテコールを酸化して $[\text{Cu}(\text{I})_2]$ を形成し(過程1)、この酵素により酸素分子が還元されて $[\text{Cu}(\text{II})_2]$ と過酸化イオンが形成される(過程2)。この過酸化イオンがカテコールを酸化して $[\text{Cu}(\text{II})_2]$ 状態に戻る(過程3)の繰り返しで生じると考えられている。金属イオンと配位子間の結合の強さは HSAB(hard and soft acid and base)則で知ることができるが、これによると、F⁻イオンは主として $[\text{Cu}(\text{II})_2]$ 状態の Cu に結合することで過程1を阻害し、I⁻イオンは $[\text{Cu}(\text{I})_2]$ 状態の Cu と結合して過程2を阻害する阻害機構が考えられる。ハロゲン化物イオンによる阻害が、F⁻でもっとも大きく、次いで I⁻の順になること、還元状態の酵素だけが I⁻と結合を形成する実験事実はこの機構を支持するものである。

1. 研究の背景と目的

ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)はポリフェノールの

キノンへの酸化を触媒する酵素である。ポリフェノールは
キノンへの酸化に伴い電子を放出する。この電子は、酸

素分子が受容することで反応が完結する(**Figure 1**)。生成したキノン類は反応性に富んでいて、非酵素的に重合する。その結果、最終的には着色したメラニン色素を形成する¹⁾。

PPO は銅(Cu)を含む金属酵素である。Cu は酵素分子中に2個存在している。それぞれのCuは互いに近接しており、それぞれのCuには3個のHis残基が結合している²⁾。この複核銅構造が酵素の活性部位を形成している。PPOの活性部位の構造は、甲殻類の酸素運搬体であるヘモシアニンと類似している。すなわち、ヘモシアニンは酸素分子と可逆的な結合を行うが、PPOでは結合した酸素分子に電子を渡すことで触媒機能を発揮している。

PPOは、高等植物、動物、微生物に広く分布している。いくつかの生物種由来のPPOのアミノ酸配列が決定されているが、それらの間での相同性は高くない。しかし、活性部位を構成している、Cuに結合したHis残基が存在するタンパク質領域では高い相同性を有することが知られている³⁾。

PPOはほとんどの生物に存在することが知られているが、その生理学的意義は明確になっていない。食品工業においては、コーヒーや紅茶の着色で有益な役割を演じている。一方では、野菜や果物類において、出荷、貯蔵ならびに処理工程における損傷で変色の原因ともなっている。したがって、食品工業ではPPO活性の制御は重要な因子といえる。

PPO活性はさまざまな物質によって阻害を受ける。アスコルビン酸やシステインは反応溶液中の溶存酸素濃度を減少させるため阻害剤として機能するものと考えられる。切断したゴボウを水にさらして変色を防ぐのは、同様の機構によると考えられる。また、コウジ酸のような基質アナログとなる物質による阻害も知られている⁴⁾。これは、基質と反応を競合して阻害するもので、化粧品などに応用されている。一方、リンゴの果肉は空気にさらすと、褐色を呈するようになるが、食塩水へ浸漬することによりこの変色を防止することが知られている⁵⁾。これは、PPO活性がNaClで阻害されるからであるが、その機構の分子論に基づいた詳細な解析は行われていない。

本研究では、PPO阻害の速度論的な解析と多核NMR法を用いて、その機構の詳細をあきらかにすることを目的としている。果実や野菜の変色は食品加工や調理の現場

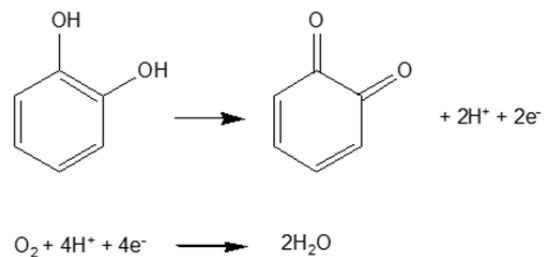


Figure 1. Reaction scheme of polyphenol oxidase. Oxidation of polyphenol is coupled with reduction of dioxygen. The quinones formed polymerize each other, producing dark colored pigments.

で頻繁に生じている現象である。塩化物イオンによるPPO活性阻害の詳細な機構を明らかにすることで、食品工業および調理の実際において変色防止の新たな方法論を提供することを目的としたものである。

2. 研究方法

2.1 試薬類

PPOはマッシュルーム由来の調製物(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いた。その他の試薬は、市販の高純度のものを用いた。

2.2 PPO活性の速度論的解析

(1) 酵素活性の測定

実験は全て200 mM酢酸緩衝液で行った。光路長1cmの石英セルに、2350 μLの酢酸緩衝液、300 μLカテコール、300 μLハロゲン化物イオンを加え混合し、温度コントローラー(Jasco ETC-505T)で30°Cに保った。この溶液に、50 μLの酵素溶液を加え、反応を開始した。410 nmの吸光度をモニターし、直線的に吸光度が上昇するところの傾きを最少二乗法で求め、酵素活性とした。PPO活性は、1 μmolの基質が1分間に反応する速度の酵素量を1 μUと定義した。

(2) 速度式の解析

酵素反応の速度定数は非線形最少二乗法で解析した。ソフトウェアはOrigin Lab(Northampton, MA, USA)製OriginPro 8.6 programを用いた。

2.3 等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry; ITC)によるPPOと低分子量分子との相互作用の解析

(1) コウジ酸と PPO の結合

ITC 装置は、MicroCal ITC-200 (GE Healthcare/Microcal)を用いた。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した PPO (200 μ M) に対して 1 mM コウジ酸で滴定を行った。実験は、10 mM NaCl 存在下と非存在下で行った。滴下は 2 min のインターバルを置いて 2 μ L ずつ行い、合計で 19 回の滴下を行った。コウジ酸の希釈熱は、酵素が存在しない溶液の滴定で求め、その値を補正した。

(2) 「イオンと PPO の結合

還元型 PPO および酸化型 PPO に対するヨウ化物イオンの結合について測定した。チャンバー側は 0.1 mM の PPO 溶液 200 μ L とし、シリンジ側は 1.0 mM の KI 溶液を充填した。PPO および KI は 20 mM リン酸-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。還元型 PPO は PPO 溶液に終濃度 5 mM のアスコルビン酸を加えることで調製した。滴下は 2 min のインターバルを置いて 2 μ L ずつ行い、合計で 19 回の滴下を行った。KI 溶液の希釈による熱変化を測定し、補正を行った。

2. 4 NMR による PPO と低分子量分子との相互作用の解析

(1) ^{19}F NMR 法によるフッ化物イオンの PPO への結合の解析

^{19}F NMR スペクトルはバリアン社製 600 MHz NMR 分光計を用い、565 MHz の測定周波数で観測を行った。試料は内径 5 mm の試料管にテフロン製のインナーを挿入して測定した。

(2) 飽和移動差スペクトル (Saturation transfer difference; STD) スペクトルの測定

NMR スペクトルは Inova 500 MHz NMR 分光器 (Variann) で測定した。PPO の選択的飽和はメチル基の 0.8 ppm の位置の照射 (on-resonance) で、コントロールとなる off-resonance スペクトルは -2 ppm の照射で行った。水分子の信号除去は WET シークエンスで行った。

3. 結果

3. 1 PPO 活性の速度論的解析

(1) PPO 活性に対するカテコール濃度の影響

カテコール濃度変化に対する PPO 酵素活性の変化を **Figure 2** に示した。カテコール濃度の低い領域 (1 mM 以下) ではカテコール濃度とともに酵素活性は上昇し、ミカ

エリスーメン型の反応形式を示した。一方、基質濃度が高くなると活性は徐々に小さくなり、100 mM カテコールでは最大活性の 40% 程度の値を示した。

以上の結果から、PPO には活性部位 (site A) とは別の基質結合部位 (site B) が存在し、site B へのカテコールの結合は酵素活性を阻害することが示唆された。この反応機構は **Figure 3** に示したモデルで示すことができる⁶⁾。

すなわち、基質分子が結合していない酵素を Eoo で表し、この site A にカテコールが結合した状態を ESo、site A

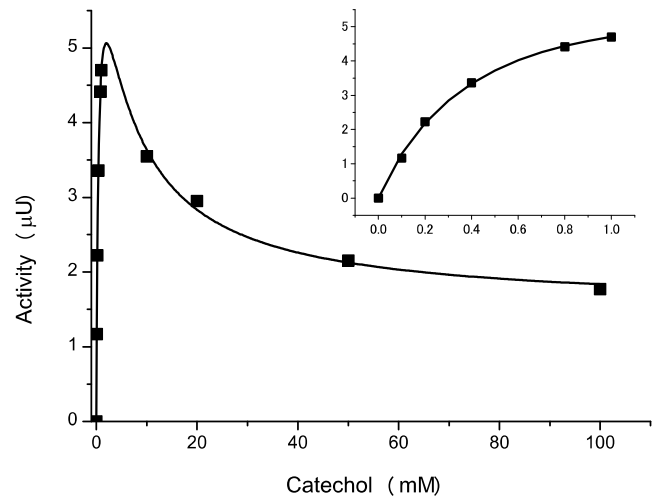


Figure 2. Polyphenol oxidase (PPO) activity was plotted as a function of catechol concentration. The assay was carried out at pH 5.0 and 30°C. Activity increased with catechol concentrations up to 1 mM, after which it decreased and then reached a plateau value of 1.77 μ U at 100 mM catechol. The expanded figure of catechol concentrations from 0 to 1 mM is displayed in the inset. The curve was drawn using parameters shown in Table 1.

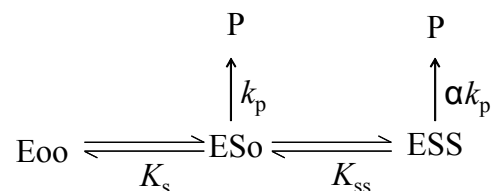


Figure 3. Reaction scheme for substrate inhibition of polyphenol oxidase (PPO). EXY denotes a PPO molecule occupied by X and Y at the first (site A) and the second (site B) catechol-binding site, respectively, where S indicates substrate and o represents an unoccupied site.

と site B の両方にカテコールが結合状態を ESS で表すと、それぞれの解離定数は、次式で示される。

$$K_s = \frac{[E_{oo}][S]}{[ESo]}$$

$$K_{ss} = \frac{[ESo][S]}{[ESS]}$$

この式で、S は基質分子を表している。ここで、site B に基質が結合した状態でも酵素は完全に失活せずに割合 α の活性を保持しているとする、

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S] \cdot (1 + \alpha \frac{[S]}{K_{ss}})}{K_s + [S] \cdot (1 + \frac{[S]}{K_{ss}})}$$

の速度式が導かれる。実測した反応速度に対して非線形の最少二乗法による解析を行い、そこで最適化されたパラメーターの値を **Table 1** に示した。Ks が 0.49 mM であるのに対して Kss は 5.67 mM と一桁大きいことから、カテコールの site B への結合は site A への結合に対して 10 分の 1 程度の大きさであることがわかる。また、 α が 0.20 の値を示したことから、site B にカテコールが結合した場合でも、20% 程度の活性を保持していることが示された。なお、ここで示したパラメーターを用いて描いた反応速度は実測した反応速度と良い一致を示した (Figure 2)。

(2) PPO 活性のカテコール濃度依存性に対するハロゲン化物イオンの影響

Figure 4 に種々の濃度のハロゲン化物イオンの存在下における、PPO 活性のカテコール濃度による変化を示した。塩化物イオン (A)、臭化物イオン (B) ヨウ化物イオン (C) とともに、ハロゲン化物イオンの濃度が増加するとともに PPO 活性が減少したが、この傾向は高濃度のカテコールでは減少し、100 mM カテコール存在下ではハロゲン化物イオンによる活性阻害はほとんど観測されなかった。

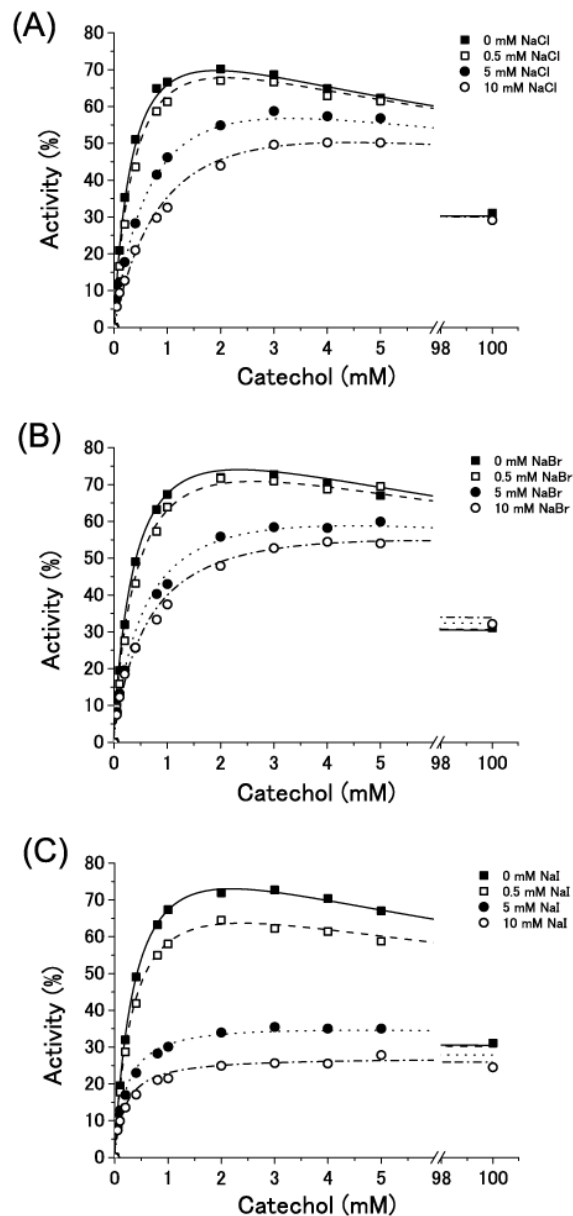


Figure 4. Polyphenol oxidase (PPO) activity plotted as a function of catechol concentration in the presence of NaCl (A), NaBr (B), or NaI (C). The halide concentrations are 0 (black squares), 0.5 (white squares), 5 (black circles), and 10 mM (white circles). Activity was normalized to the respective theoretical V_{max} values shown in Table 2. Curves were drawn using the parameters shown in Table 2.

Table 1. Estimation of polyphenol oxidase (PPO) substrate inhibition parameters determined by enzyme activity as a function of catechol concentration.^{a)}

V_{max} (μ U)	K_s (mM)	K_{ss} (mM)	α	$R^{2b)}$
7.56 ± 0.34	0.49 ± 0.05	5.67 ± 0.75	0.20 ± 0.01	0.998

^{a)}Figures represent the estimated value \pm standard error.

^{b)}R represents the correlation coefficient between experimentally determined activity and that estimated.

以上の実験結果は、カテコールとハロゲン化物イオンが site B に対して競合的に結合し、両者とも酵素活性を阻害することを示していた。そのため、カテコールによる基質阻害とハロゲン化物イオンによる活性阻害に対して、Figure 5 に示した反応機構が考えられた⁶⁾。

ここで、H はハロゲン化物イオンを示し、site B にハロゲン化物イオンが結合し、site A に基質が結合した酵素複合体を ESH で、また site A に基質が結合していない酵素複合体を EoH で示した。ここで K_{h1} は、site A に基質が結合していないときのハロゲン化物イオンの解離定数であり、次式で示される。

$$K_{h1} = \frac{[Eoo][H]}{[EoH]}$$

また、 K_{h2} はカテコールが site A に結合している酵素複合体に対するハロゲン化物イオンの解離定数であり、次式で与えられる。

$$K_{h2} = \frac{[ESo][H]}{[ESH]}$$

Figure 5 に示した反応機構から、速度式が以下のように求められる。

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S] \cdot \left(1 + \alpha \frac{[S]}{K_{ss}} + \beta \frac{[H]}{K_{h2}}\right)}{K_s \cdot \left(1 + \frac{[H]}{K_{h1}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_{ss}} + \frac{[H]}{K_{h2}}\right)}$$

実測した酵素反応に対して非線形最少二乗法による解析を行い、最適化されたパラメーターを Table 2 に示した。 α 値 (ESS からの生成物合成の速度) は 0.24~0.27 の値で

あり、この数値はハロゲン化物イオンが存在しないときの値 0.20 と良い一致を示した。また K_s の値は、ここで得られた値 (0.37~0.43mM) は Table 1 に示した値 (0.49 mM) と近い値となっており、さらに K_{ss} もここで得られた値 (6.20~8.82 mM) は Table 1 で示した値 (5.67 mM) とほぼ一致した。これらの結果はこの解析が正確に行われていることを示していると考えられる。また、このパラメーターで得られる反応速度を Figure 4 の曲線で示したが、実測値との整合性もよく、このこともこの解析の正当性を示しているといえる。

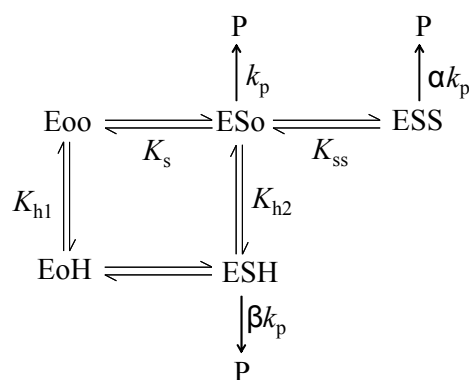


Figure 5. Scheme of the catechol reaction model and halide inhibition of polyphenol oxidase (PPO). Nomenclature is the same as that used in Fig. 3. In this scheme, H denotes halide. K_{h1} and K_{h2} indicate dissociation constants, which are expressed as $K_{h1} = [Eoo][H]/[EoH]$ and $K_{h2} = [ESo][H]/[ESH]$. β is a ratio relative to the turnover number for the reaction from ESo to Eoo and P.

Table 2. Estimation of the polyphenol oxidase (PPO) parameters for halide and substrate inhibition determined by enzyme activity as a function of catechol concentration.^{a)}

	V_{\max} (μ U)	K_s (mM)	K_{ss} (mM)	α
NaCl	6.07 \pm 0.20	0.37 \pm 0.03	6.20 \pm 0.87	0.27 \pm 0.01
NaBr	8.48 \pm 0.34	0.43 \pm 0.04	8.82 \pm 1.79	0.24 \pm 0.02
NaI	8.54 \pm 0.19	0.43 \pm 0.02	7.42 \pm 0.73	0.25 \pm 0.01
	K_{h1} (mM)	K_{h2} (mM)	β	$R^{2b)}$
NaCl	3.20 \pm 0.46	23.46 \pm 13.27	0.23 \pm 0.21	0.996
NaBr	2.34 \pm 0.42	4.40 \pm 1.14	0.52 \pm 0.03	0.996
NaI	5.34 \pm 0.70	1.97 \pm 0.14	0.13 \pm 0.01	0.999

^{a)}Figures represent the estimated value \pm standard error.

^{b)}R represents the correlation coefficient.

ハロゲン化物イオンが site B に結合したときのカテコールの site A に対する解離定数 K_{sh} は以下の式から求めることが可能であり、その結果を **Table 3** に示した。

$$K_{sh} = \frac{[EoH][S]}{[ESH]} = \frac{K_s K_{h2}}{K_{h1}}$$

すなわち、カテコールの site A に対する解離定数は、site B が free のときの値 (0.49 mM) と比べて、塩化物イオン、あるいは臭化物イオンが site B に結合したときには大きな値を示し、またヨウ化物イオンが site B に結合したときには小さな値となっている (**Table 3**)。このことは、site B にハロゲン化物イオンが結合することにより site A の構造あるいは機能を変化させていることを示唆しており、ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害機構は、これらイオンに

よるアロステリック効果であることを物語っているものと考えられた。

(3) ハロゲン化物イオンによる PPO 活性阻害の pH 依存性

ハロゲン化物イオンによる PPO 活性阻害の pH による影響を **Figure 6** に示した。PPO 活性は pH に依存して、pH の減少とともに小さくなる傾向が認められた (それぞれの図の black square)。F⁻ による PPO 活性阻害は pH 8.0 では認められず、pH が下がるにつれて増大することが示された (**Figure 6(a)**)。同様の傾向は Cl⁻、Br⁻、I⁻ でも認められた (**Figure 6(b), (c), (d)**)。また、pH 5.0 での PPO 活性の阻害の程度は F⁻ がもっとも大きく、次いで I⁻ であり、Cl⁻ と Br⁻ による阻害は同程度で比較的低いものと判断された。

Table 3. Calculation of dissociation constant, K_{sh} , from the estimated parameters in Table 2.^{a)}

K_{sh} (mM)		
NaCl	NaBr	NaI
2.71 ± 1.60	0.81 ± 0.27	0.16 ± 0.02

Figures represent the estimated value \pm standard error

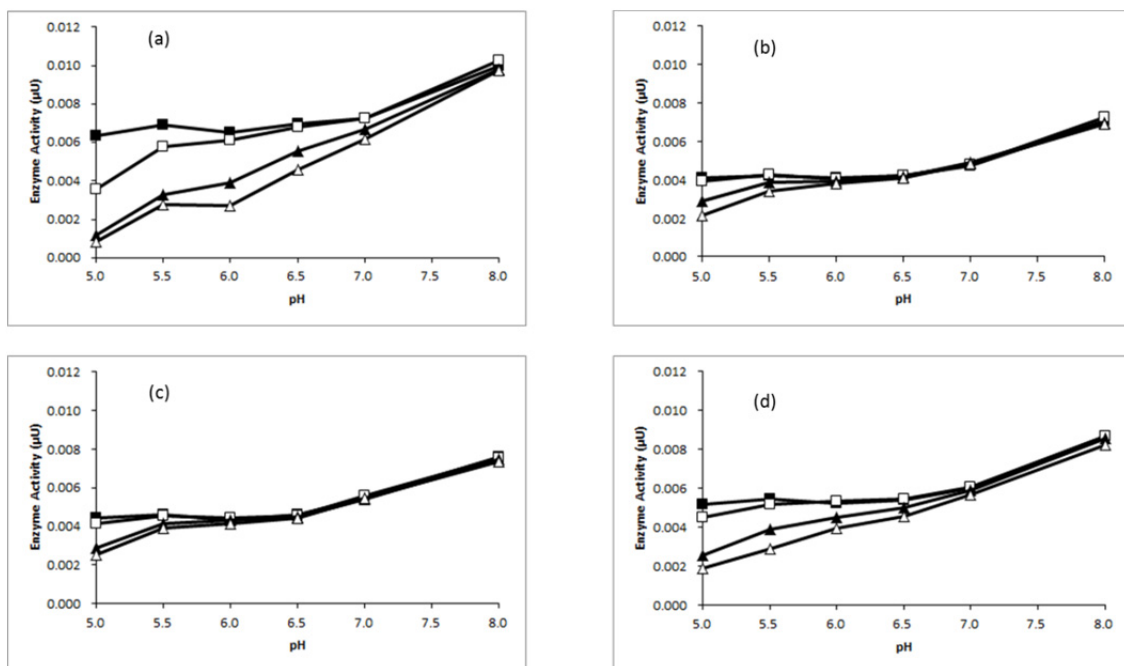


Figure 6. Polyphenol oxidase (PPO) activity plotted as a function of pH in the presence of NaF(a), NaCl(b), NaBr (c), and NaI (d). The halide concentrations are 0 (black squares), 0.5 (white squares), 5 (black triangles), and 10 mM (white triangles).

(4) コウジ酸による PPO 活性の阻害

コウジ酸存在下における PPO 活性を、カテコール濃度を変化させて測定した (Figure 7)。コウジ酸の濃度が上昇するにつれ、PPO 活性は減少した。阻害の程度は大きく、0.6 mM のコウジ酸は PPO 活性を 85%減少させた。

PPO 活性がカテコールとコウジ酸の競合阻害であるとすると、その活性は次式で示した両方の濃度の関数で与えられる⁷⁾。

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(\frac{1+[I]}{K_{ic}} \right) + [S]}$$

コウジ酸によるカテコールの競合阻害定数 (K_{ic}) を求めるために Figure 7 に示したデータを非線形最小二乗法で解析した。結果を Table 4 に示した。Figure 7 に示した曲線はこのシミュレーションで得られたパラメーターを用いて描いたものであり、よい一致が得られた。また K_{ic} として 11 μM の値が得られた。

Figure 7 のデータを Dixon plot⁷⁾で解析した結果を Figure 8 に示した。すべての直線はコウジ酸濃度の値 (横軸) が 0.01 mM で重なり、この結果からもコウジ酸がカテコールを基質とした PPO の酵素反応において、競合阻害剤として機能していることを支持するものである。

3. 2 ITC による PPO と低分子量分子との結合解析

(1) コウジ酸と PPO との結合

PPO を含む溶液をコウジ酸で滴定すると発熱ピークが現れ、その強度は滴定とともに減少していった (Figure 9A)。この発熱ピークを滴定に用いたコウジ酸に対してプロットし非線形最小二乗法で解析すると、PPO のコウジ酸結合サイトの数が1であり、結合定数 K は $1.43 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と求められた。

同様の ITC の測定を 10 mM NaCl 存在下で行った結果を Figure 10 に示した。コウジ酸の添加で発熱ピークが現れ (Figure 10A)、この強度をコウジ酸添加量に対してプロットし (Figure 10B)、非線形最小二乗法で解析を行った。

その結果、PPO に対するコウジ酸の結合サイトの数は 1 個であり、その結合定数として $1.51 \times 10^4 \pm 4.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ の値が得られた。

以上の結果から、ハロゲン化物イオンはコウジ酸の site A への結合に対して影響を及ぼさないことが明らかになった。

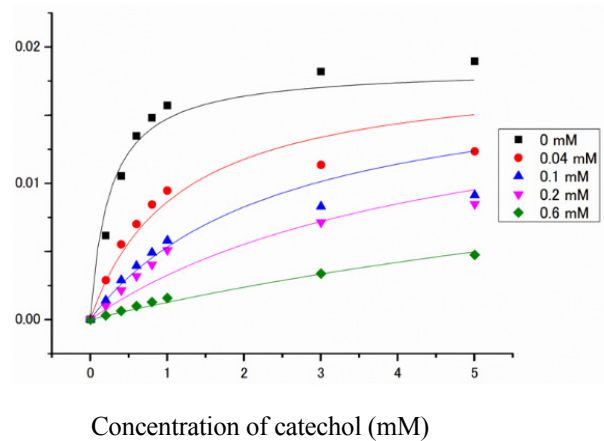


Figure 7. Line-fitting using Origin software. Data from Figure 1 at catechol concentrations below 1 mM, where there is no substrate inhibition, was used. The kinetic parameters were estimated using equation for competitive inhibition.

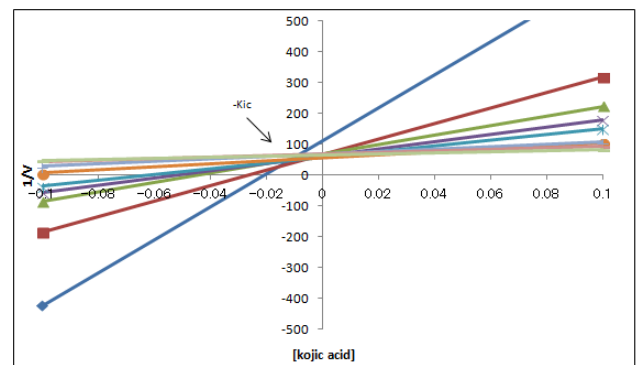


Figure 8. Dixon plot for the competitive inhibition of kojic acid. The x-coordinate where all straight lines converge is taken as $-K_{ic}$. The K_{ic} value is estimated at 0.01 mM.

Table 4. Estimation of kinetic parameters for kojic acid inhibition determined from the enzyme activity as a function of catechol concentration

$V_{\max}, \mu\text{U}$	K_m, mM	K_{ic}, mM
0.018	0.26	0.011

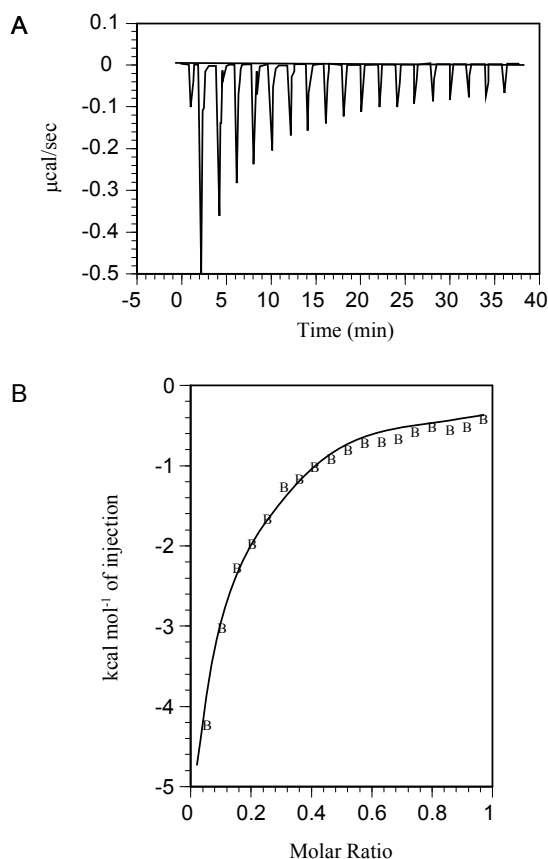


Figure 9. Isothermal titration calorimetry measurements at 25°C of 200 μM polyphenol oxidase and kojic acid interaction. In (a), the heat in $\mu\text{cal/sec}$ for each injection of ligand is shown while (b) shows the plot of enthalpy (kcal/mol) versus the PPO-kojic acid molar ratio. The values for the binding constant (K), enthalpy (ΔH), and entropy (ΔS) are stated in the inset of (b).

ITCの結果を **Figure 11** に示す。酸化型 PPO に対してヨウ化物イオンを滴下した結果 (Figure 11 左図)、発熱は全ての滴下で 1.00 kcal/mol 以下であり、ほとんど熱変化が観測されなかった。一方、還元型 PPO へ滴下した結果 (Figure 11 右図)、滴下の終盤では 18 kcal/mol の発熱が生じ、酸化型と比較して大きな熱変化が観測された。

3. 3 NMRによるPPOと低分子量化合物の相互作用の解析

(1) ^{19}F NMRによるフッ化物イオンのPPOに対する結合

^{19}F NMR スペクトルを **Figure 12** に示した。200 μM NaF は化学シフト 2.38 ppm 付近にシグナルを与えた (a)。400 μM NaF に 200 μM PPO を加えると、信号は 2.45 ppm と多

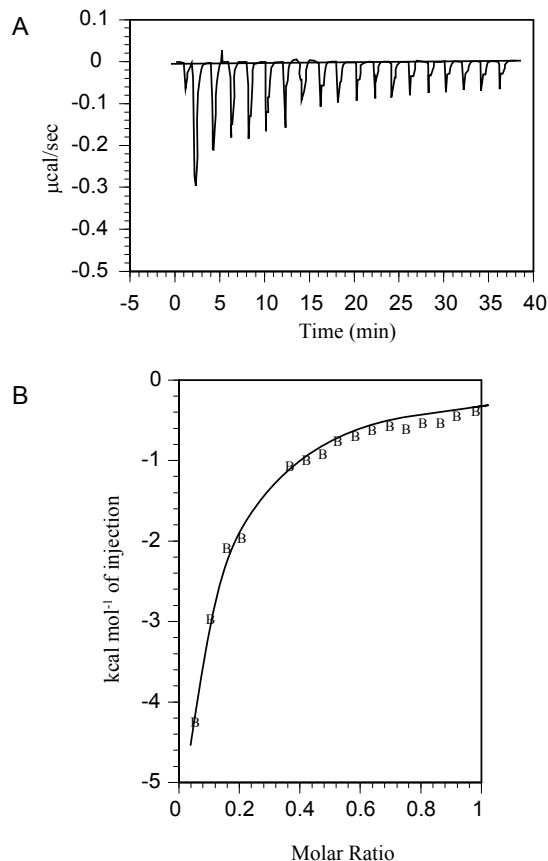


Figure 10. Isothermal titration calorimetry measurements at 25°C of 200 μM polyphenol oxidase and kojic acid interaction, in the presence of 10 mM NaCl in the macromolecule. The experiment was carried out following the same procedure for Figure 3.

少低磁場シフトして観測された (b)。また、線幅は NaF だけのときの 4.72 Hz と比べて、13.60 Hz と広幅化が生じていた。この溶液に過剰量の NaCl (4 mM) を加えると、共鳴位置は変化せず、また線幅は 12.95 Hz と多少の減少が観測された (c)。

スペクトルでは、フッ化物イオン単独のときよりも PPO が存在すると信号の広幅化が観測された。PPO と NaF が存在する溶液の ^{19}F NMR スペクトルの温度依存性の測定から F⁻イオンは PPO と NMR の timescale で遅い交換をしていることが明らかになった。したがって、PPO 存在下で広幅化が生じたのは F⁻イオンの自由イオンとしての寿命が短くなったためと考えられる。ここで観測された線幅の変化は比較的小さいものであったが、これはこのイオンと PPO

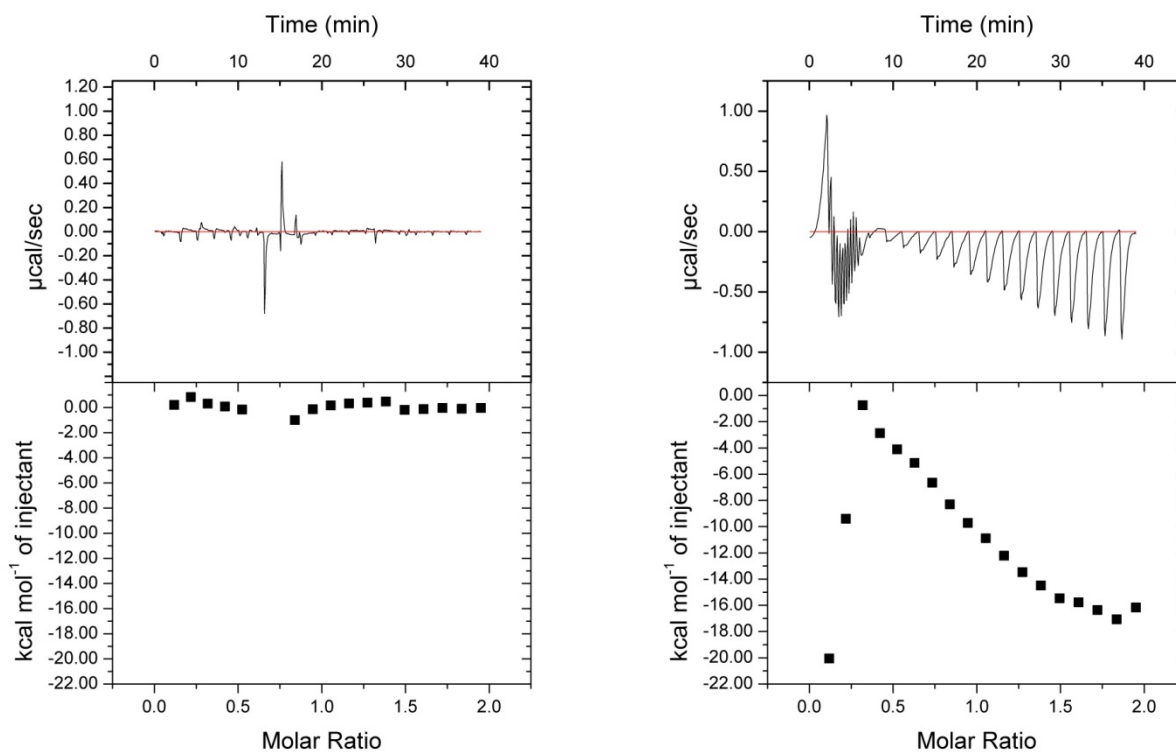


Figure 11. Isothermal titration calorimetry measurements at 25°C of 100 μM polyphenol oxidase in the absence (left) and the presence of 5 mM ascorbic acid. The titration was undertaken for the solution buffered at pH 5.0 by 20 mM phosphate-citrate buffer.

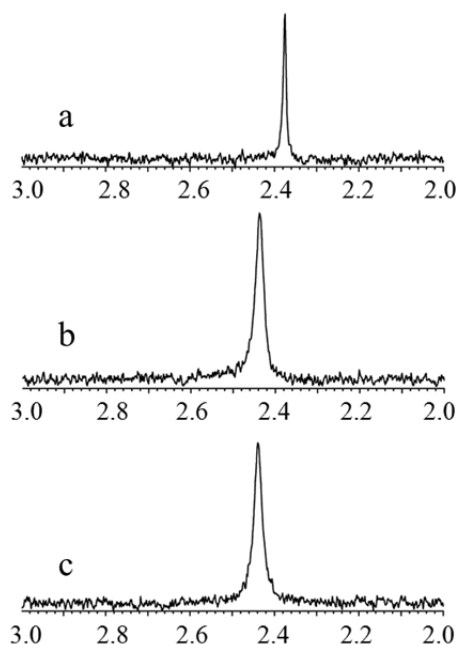


Figure 12. ^{19}F NMR spectra of NaF. The spectra shown was obtained from a solution containing a, 200 μM NaF; b, 400 μM NaF and 200 μM PPO, and c, 400 μM NaF, 200 μM PPO and 4 mM NaCl.

との相互作用が小さいことを示唆しているものと考えられた。ハロゲン化物イオンの PPO との解離定数 (K_{h1}) が数 mM とかなり大きな値を示していることは、この考えを支持している。また、大過剰の NaCl を加えても、線幅の減少はかなり限定的なものであったことから、 Cl^- イオンの結合は F^- イオンに比べてかなり弱いものと考えられた。

(2) STD-NMR による基質と PPO の相互作用

PPO (100 μM) とコウジ酸 (10 mM) を含む溶液 (100 mM リン酸緩衝液, pH 7.0, 重水溶液) の 1D ^1H NMR スペクトルを **Figure 13** に示した。コウジ酸のプロトンは、 $\text{H}_{(a)}$ 、 $\text{H}_{(b)}$ 、 $\text{H}_{(c)}$ がそれぞれ化学シフト 8.0、6.5、5.1 ppm の位置にシャープなシグナルとして現れた。PPO によるシグナルは、化学シフト 0.8 から 4 ppm にかけて幅広いシグナルとして現れた。なお、3.2 から 4.8 ppm に現れるシャープなシグナルは狭雑物として含まれる糖によると考えられた。PPO によるシグナルは 0.8 ppm の位置にメチルプロトンがピークとして現れるため、このプロトンを選択的に照射することにした (on-resonance)。コントロールとしてのスペクトル (off-resonance) は、PPO が信号を与えない 2 ppm の位置

を照射したものとした。

Figure 14B に 1 mM PPO と 20 mM コウジ酸を含む溶液の STD-NMR スペクトルを示した (Figure 14A は off-resonance スペクトルを示す)。STD-NMR スペクトルではコウジ酸のすべての H の信号が観察されたことから PPO にコウジ酸が結合することを示している。なお、メチレン(H(c))の信号は、線幅が小さすぎたために差スペクトルが正確に得られていないが、負の方向に現れていることから信号強度がコウジ酸の他の H よりも小さくなっているものと考えられるまた、メチレン H はコウジ酸の他の H の 2 倍存在するため、本来の強度も 2 倍となることも考慮に入れると、このメチレンプロトンの運動性が大きいことを示唆するものであり、コウジ酸の PPO への結合が6員環の部分を通して生じていることを示していると考えられた。

Figure 15B に 1 μ M PPO に対してコウジ酸(20 mM)とカテコール(10 mM)、NaCl(20 mM)を含む溶液の STD-NMR スペクトルを示した (Figure 15A は off-resonance スペクトルを示す)。STD-NMR スペクトルにはコウジ酸のほかにカテコールのプロトンによる信号が観察され(6.8 から 6.9 ppm)、カテコールとコウジ酸の両者が mPPO に結合することが示された。またこのスペクトルのパターンは、NaCl 非存在下ならびに NaCl 濃度が 100 mM となっても変化が認められなかった。

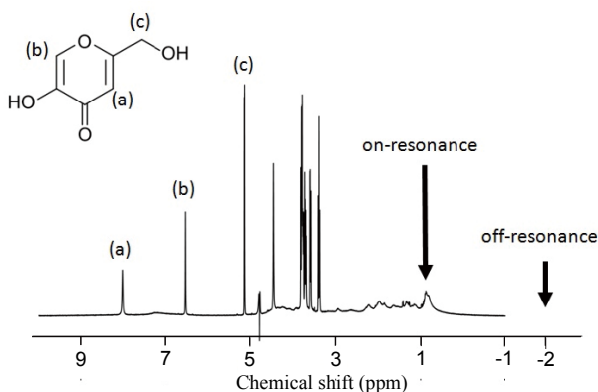


Figure 13. 1D ^1H NMR spectra of 0.1 mM PPO and 10 mM kojic acid in pH 7.0 phosphate buffer (0.1 M phosphate buffer in 100% D_2O). The relative degree of saturation of individual protons of kojic acid is mapped into the structure. PPO resonances show intensity at around 0.8 ppm. This region was irradiated to take the on-resonance spectrum. Off-resonance spectrum was recorded by irradiation at -2.0 ppm.

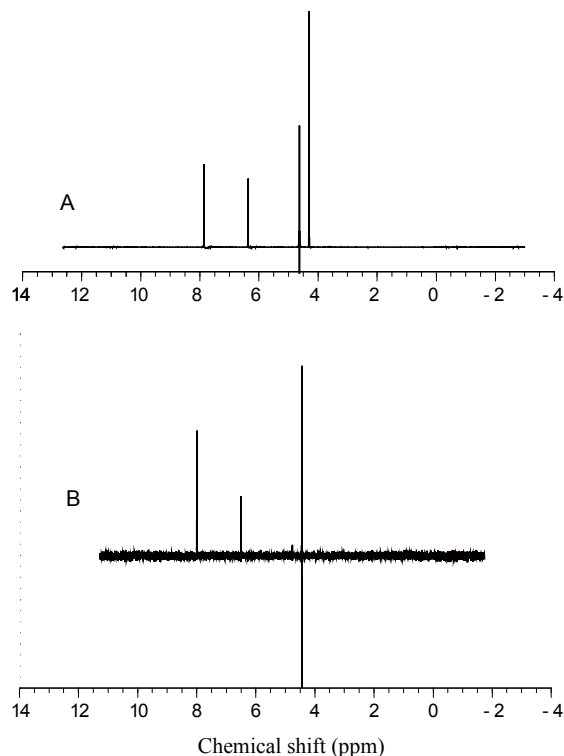


Figure 14. Reference ^1H NMR of 1 μM mPPO with 20 mM kojic acid (A) and its corresponding STD-NMR spectrum (B).

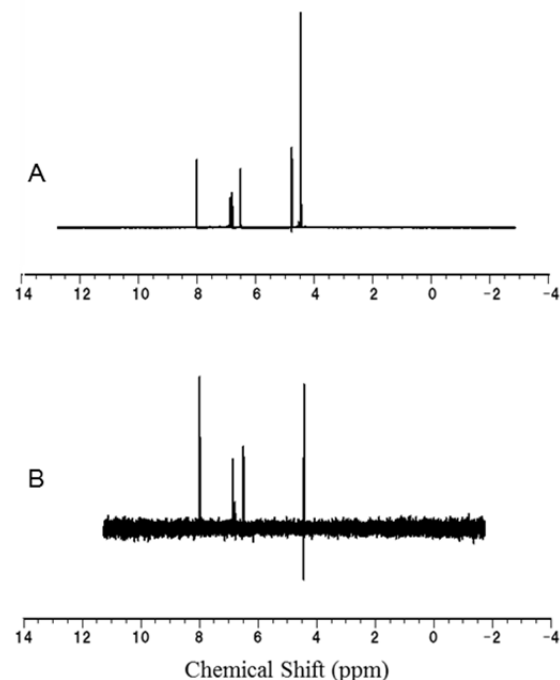


Figure 15. Reference ^1H NMR of 1 μM mPPO with 20 mM kojic acid, 10 mM catechol, and 20 mM NaCl (A) and its corresponding STD-NMR spectra (B). The addition of chloride did not change the NMR spectrum.

4. 考 察

4. 1 PPO の基質結合サイト

カテコールを基質とした酵素反応速度論の解析から、**Figure 16** に示すように PPO には二つのカテコール結合サイトが存在することが判明した。ひとつは活性部位 (site A) であり、もう一方は阻害部位 (site B) である。このため、PPO はカテコール濃度が高い場合は酵素活性に対して阻害的に働き、基質阻害を引き起こす。PPO の活性はハロゲン化物イオンにより生じる。この場合、PPO の基質阻害の程度が減少することから、ハロゲン化物イオンによる阻害は、site B へのハロゲン化物イオンの結合で生じると結論付けられる。酵素活性を指標とした、速度論的な解析からは、ハロゲン化物イオンの site B への結合は、site A に対して何らかの変化を引き起こすと考えられた。

一方、ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害は、低 pH 側で顕著に現れていた。アミノ酸残基の中で低 pH 側に pKa を持つものとして His があげられる。His のイミダゾール基に結合した H⁺ の pKa は 6.04 であり、この値より低い pH ではイミダゾール基は H⁺ 化していると考えられる。すなわち、PPO の活性部位には 2 つの Cu イオンに対して、それぞれ 3 個の His 残基が結合していると考えられている。

したがって、pH が減少するに従い His は H⁺ 化して Cu イオンとの結合が切断されると推定される。

以上を踏まえると、ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害は、**Figure 17** のようにまとめることができる。すなわち、pH の低下に伴い空位となった Cu 配位座に対してハロゲン化物イオンが結合し、酵素活性を阻害すると考えられる (**Figure 17(A)**)。一方、基質カテコールも空位となった Cu 配位座近傍に結合し、酵素活性の阻害を行うのであろう (**Figure 17(B)**, 機構は不明)。

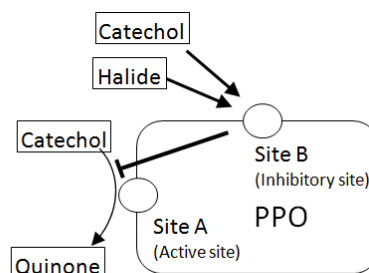


Figure 16. Illustration of the catechol reaction model and halide inhibition of polyphenol oxidase (PPO). Catechol and halides compete with site B, both of which inhibit oxidase activity of PPO.

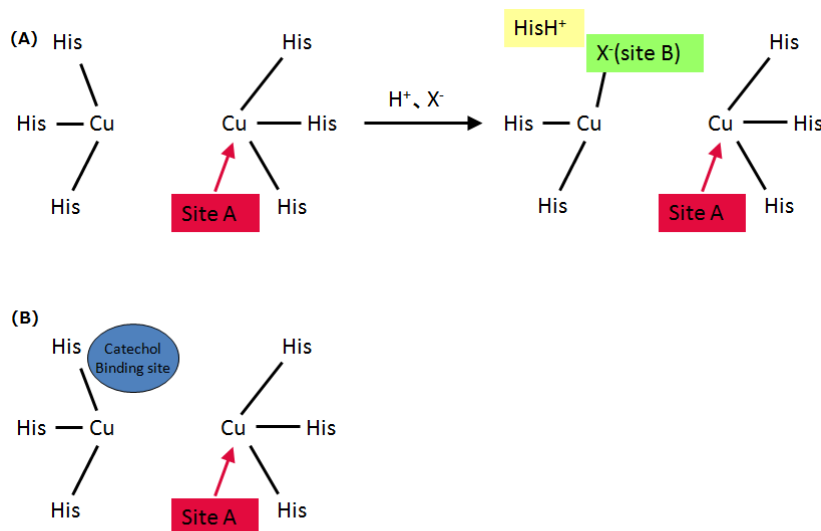
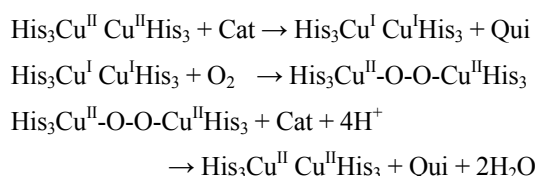


Figure 17. Proposed binding of halide and catechol to site B of PPO. Halide binds most effectively under acidic conditions where a histidine bound to copper at the active site is protonated and detaches (A). Catechol also binds to site B but at a different site proximate to the halide binding site (B).

4. 2 ハロゲン化物イオンによる PPO 活性の阻害

カテコールの site A への結合を詳細に調べるために、カテコールと競合的に反応する物質の探索を行った。その候補として選択したコウジ酸は速度論の解析からカテコールと競合的に site A に結合することが示された。さらに、コウジ酸の site A への結合を STD-NMR ならびに ITC を用いて検討した。その結果、site A への結合は示されたものの、ハロゲン化物イオンは結合の強さに対して影響を与えないことが分かった。

つまり、酵素反応と基質の結合という観点からみると矛盾した結論になったように見られるが、酵素反応が電子移動によって生じていることを考慮すると合理的な説明が可能である。今までに想定される酵素反応は、休止状態では Cu は 2 価の酸化状態を取っているため、活性部位の構造を $\text{His}_3\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{His}_3$ で、基質と生成物をそれぞれ Cat と Qui で示すと以下のようになる⁸⁾。



つまり、Cu は Cu(II)イオンが基質から電子を受容し(基質を酸化し)、酸素に電子を供与する(酸素を還元し)ことで酵素反応が進行する。このとき、酸性領域では His との結合が切断された Cu にハロゲン化物イオンが結合すると考えられる。この場合の Cu イオンとハロゲン化物イオンとの結合の安定性は、HSAB(hard and soft acid and base) 則により予測することができる⁹⁾。これによると、Cu(II)イオンとの結合では、 $\text{F} > \text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$ の順に弱くなり、Cu(I)に対しては $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ の順に強くなる。したがって、Fイオンは Cu(II)の状態の活性部位に、また Iイオンは Cu(I)の状態の活性部位に結合を形成すると考えられる。Cl⁻と Br⁻イオンは Cu(I)と Cu(II)の両者に結合できると考えられるが、その結合力は F⁻や I⁻と比べると小さいものであろう。ここで、Fイオンが結合した活性部位を考えると、Fイオンは Cu(II)イオンの状態を安定化させる傾向が強く、Cat の酸化を阻害すると考えられる⁹⁾。一方、Iイオンが結合した活性部位は Cu(I)イオンの状態を安定化させるため O₂の還元に対して阻害的に働くと推定される。ITC 測定において、還元型の PPO だけが I⁻と結合を形成したことは上記のモデルを支持するものと考えられる。また、ハロゲン化物

による PPO 活性の阻害が、F⁻と I⁻で顕著であることも説明できる。まとめると、ハロゲン化物イオンは活性部位の Cu イオンと結合するだけであり、基質の結合そのものには影響を与えるものではないが、電子の移動を制御することで PPO 活性を阻害していると結論付けられる。

5. 今後の課題

本研究により、ハロゲン化物イオンによる PPO 活性に阻害機構として新規なモデルを提案することができた。このモデルからは、活性部位に F⁻イオンが結合すると活性中心の酸化還元電位を上昇させ、また、I⁻イオンが結合することで酸化還元電位は低下させると予想される。したがって、モデルの正当性の検証のために、ハロゲン化物イオンが結合した状態における酵素の酸化還元電位を測定することが必要である。

基質の結合部位(site A)に関しては大きな構造変化は生じないと考えられるが、ハロゲン化物イオンの結合部位(site B)では何らかの構造変化が生じていると考えられる。これを調べるには、¹H NMR で活性部位近傍に存在する信号を検出すればよいと考えられる。

この際に、圧倒的に多数存在する、常磁性シフトを行わない信号が強く現れるため、測定ダイナミックレンジを大きくとる必要がある。現在、broadband WET 法によりこれらの信号強度を低下させて ¹H NMR スペクトルの測定が可能になっており¹⁰⁾、この解析から構造変化の様子を明確にすることができると考えている。

食品生産において、ハロゲン化物による PPO 活性阻害として新規な機構を提案したことは意義深いと考えられる。今後、Cu(I)あるいは Cu(II)イオンに対する結合力の大きい物質を探索することで、食品工業において貢献できると考えている。

6. 引用文献

- 1) M. Friedman, Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. J. Agric. Food Chem. 45, 1523-1540.
- 2) G. Battain, E. Monzani, L. Casella, E. Lonardi, A.W.J.W. Tepper, G.W. Canters, L. Bubacco, Tyrosinase-catalyzed oxidation of fluorophenol. J. Biol. Chem. 47, 44606-44612 (2002).

- 3) E.C. Ramirez, J.R. Whitaker, V.M. Virador, Polyphenol, In Handbook of Food Enzymology, pp. 509-523 (2003) Eds. J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.C. Wong, Marcel Dekker.
- 4) S. Parvez, M. Kang, H.-S. Chung, H. Bae, Naturally occurring tryptophanase inhibitors: Mechanisms and applications in skin health, cosmetics and agricultural industries. *Phyto. Res.* 21, 805-816 (2007).
- 5) A.H. Janovitz, F.C. Richard, P.M. Goupy, J.J. Nicolas, Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 926-931 (1990).
- 6) G.G.F Lim, Y. Imura, E. Yoshimura, Substrate inhibition competes with halide inhibition in polyphenol oxidase. *Protein J.* 31: 609-614 (2012).
- 7) H. Bisswanger, *Enzyme Kinetics, Principles and methods* (2nd Ed.), Wiley-VCH (2008).
- 8) P.E.M. Siegbahn, Catalytic cycle of catechol oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 577-590 (2004).
- 9) 吉村悦郎、基礎生物無機化学、pp.68-73、丸善、2014.
- 10) K. Furihata, J. Zhang, M. Koda, T. Miyakawa, M. Tanokura, Broadband WET: a novel technique for quantitative characterization of minor components in foods. *Mag. Reson. Chem.* In press (2014), DOI:

10.1002/mrc.4066.

7. 研究業績および学会発表

論文発表

- G.G.F Lim, Y. Imura, E. Yoshimura, Substrate inhibition competes with halide inhibition in polyphenol oxidase. *Protein J.* 31: 609-614 (2012).

学会発表

- G.G.F Lim, 井村祐己, 吉村悦郎, Polyphenol oxidase inhibition by halide ions and factors affecting the inhibition.
- 第 72 回分析化学討論会、1012 年 5 月 19 日～20 日、鹿児島大学工学部(鹿児島)

謝 辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の援助によって実施した結果である。謹んで感謝申し上げます。ITC の測定に関して、東京大学大学院農学生命科学研究科の朝倉富子特任教授に、また、Broadband WET 法による NMR 測定において、東京大学大学院農学生命科学研究科の降旗一夫助教の指導を受けた。ここに謝意を表する。

Multinuclear NMR Study on Inhibitory Mechanisms by Chloride Ions of Polyphenol Oxidases Derived from Higher Plants

Etsuro Yoshimura, Yuuki Imura

School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo
Department of Applied Biological Chemistry

Summary

Polyphenol oxidase (PPO) is the enzyme that catalyzes the oxidation of polyphenol to quinone. PPO's physiological significance has not been yet definite. It produces the coloring that is beneficial for food products such as coffee and tea. On the other hand, it is also the enzyme that causes the discoloration in fruits and vegetables when damaged during shipping, storage, as well as other manufacturing processes. Therefore, the regulation of PPO activity is an important study in the food industry.

In our research using mushroom PPO and catechol as a substrate, the reaction rate was decreased in the presence of higher levels of substrate. In addition, halides inhibited PPO activity at lower concentration range of catechol, where substrate inhibition was not perceived, whereas halides inhibited the activity at a lower level in the presence of higher levels of catechol. These findings lead us to propose the existence of a second binding site for catechol in addition to the substrate-binding active site (site A). Substrate binding to this second site (site B) causes the inhibition of the enzyme's activity. Further, chloride binds to site B and can also cause enzyme inhibition. Our mathematical model that take into account the binding sites steadily followed the measured activity, confirming the justification of the model.

Kojic acid, a competitive inhibitor of the enzyme was used to explore the binding of substrate to PPO. Isothermal titration calorimetry (ITC) and saturation transfer difference (STD) spectrometry were undertaken to probe the binding mode. These measurements indicated that although kojic acid binds to PPO, halides did not affect the binding strength of kojic acid.

Active site of PPO is composed by a dicopper site with each copper bound by three His residues. When we abbreviate the site as $[\text{Cu(I)}_2]$ and $[\text{Cu(II)}_2]$ depending on the oxidation state of Cu, the enzyme reaction is proposed to proceed in such a way that $[\text{Cu(II)}_2]$ oxidize catechol to produce $[\text{Cu(I)}_2]$ and quinone (step 1), dioxygen oxidize $[\text{Cu(I)}_2]$ to produce $[\text{Cu(II)}_2]$ and peroxide ions (step2), and then the peroxide oxidize catechol, leaving $[\text{Cu(II)}_2]$. Based on a HSAB principle, which indicates Cu(II) preferentially binds to F^- , while Cu(I) does to I^- , it is most likely that F^- binds $[\text{Cu(II)}_2]$ and inhibits step 1. I^- ion, on the other hand, binds $[\text{Cu(I)}_2]$ and interfere with the process of step 2. The findings that inhibition PPO activity was most severe for F^- followed by I^- with similar inhibitory effect of Cl^- and Br^- and that ITC experiment showed I^- bind PPO at the reduced form alone support the inhibitory model.

プロジェクト助成研究報告書（食品科学）

Project Research Report (Food Science)

平成27年3月

March, 2015

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団

The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル

Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712

URL <http://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 4 0 - 7

助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究（2011～2013）

金属が活性を調節する食品関連酵素への塩効果とその加工・調理学的意義の解明

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団