

タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用

1. はじめに

タンパク質架橋化酵素（トランスグルタミナーゼ：以下TGaseと略記）は、幅広く生物界に存在し、特定のタンパク質間における共有結合レベルでの架橋化（接着）反応を触媒する。この反応はタンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間にイソペプチド結合を形成させるが、グルタミン残基に一級アミンを付加させたり、水分子の付加によってグルタミン酸へと変換させたりする反応も触媒する（図1）¹⁻³⁾。高等動物の場合は、カルシウムイオンが活性に必要であり、細胞内外での活性制御因子となっている。

TGaseは高等動物では八つのアイソザイムからなるファミリーを構成し、それぞれが独自の組織分布と基質を有して多彩な生命現象に関与する。このうち、主要なアイソザイムとしては、factor XIII（血液凝固第XIII因子）とTGase 2（組織型TGase）がある。factor XIIIは主に血漿中に存在し、トロンビンによる限定分解で活性化され、血液凝固の最終段階としてフィブリンを架橋する。TGase 2は幅広い組織に存在し、細胞死促進や転写調節因子の制御、またGTP結合タンパク質としての機能も併せ持つ等、多彩な役割が

挙げられていながらもその意義や局在等では不明な点も多い。皮膚表皮に発現するTGase 1, TGase 3, TGase 5は角質化に関与する。これらは、表皮細胞の分化に伴って活性化し、様々な構造タンパク質を協調的に架橋重合させ、細胞膜直下に安定な構造体（cornified envelope）を形成させる^{4,5)}。他のアイソザイム（TGase 4-TGase 7）については生化学的性質や生理的意義の知見はまだ少ない。

TGaseは、動物以外にも植物、微生物と幅広く存在が確認されている。特に放線菌（*Streptomyces mobaraensis*）由来のTGaseは、動物とは異なる構造を有しながらも、同じ反応機構でタンパク質間に架橋化反応をもたらす。この酵素はカルシウム非依存性で、大量取得も可能なため食品の弾性や質感の改変等に用いられている⁶⁾。

このようにTGaseファミリーによる架橋化反応は、どれも同じ反応様式でありながら、好んで架橋する相手となる基質タンパク質は様々である。この違いは主に、基質タンパク質の中のどのグルタミン残基（およびリジン残基）が酵素に認識されるかの差異による。言い換れば、タンパク質表面のどのグルタミン残基やリジン残基にも等しく反応するというものではない。すなわち、各アイソザイムについて両残基への一定の選択性があることが、架橋する基質タンパク質を決定していると言える。これまでの知見では、グルタミン残基への選択性が特に重要であり、一級アミンやリジン残基については、その選択性は低いとされている¹⁾。しかしこれまでに、各アイソザイムについての、

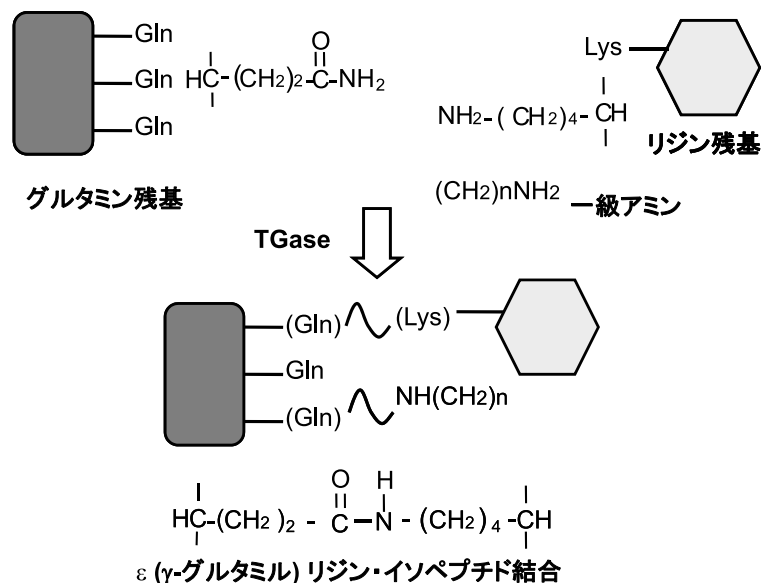


図1 トランスグルタミナーゼの反応様式

基質となる残基を決定づける明確な情報は少なかった。

TGaseの基質タンパク質は、様々な組織から *in vitro*, *in vivo* のレベルで多数同定されており^{3,7)}、基質となりやすい配列を集積したホームページもある (TRANSDAB: http://genomics.dote.hu/wiki/index.php/Main_Page)。さらに、反応性の良い基質と判明したタンパク質の中でどのグルタミン残基が反応に関わるかを調べ、反応残基を含めた領域を絞り込んで、ペプチドとしても良い基質として再現されることを示した報告もある。しかしこのような情報を集積する帰納的な方法では、反応しやすさの正確な評価を得ることは困難であった。そのため、反応されやすい残基を含む一次配列としての特徴をランダムな配列群から探れば、基質配列としての傾向を明らかにできると考えた。

それぞれのアイソザイムにおいて、どのような基質タンパク質を標的とするかのルール (配列の傾向) は、基質や架橋に関わる残基の同定に有用な情報を与えることができる。また、ペプチドとしての優れた「最小基質」を得れば、本酵素研究のツールや有効活用をはじめとして様々な展開が可能になる。

2. ランダムペプチドライブラリーを用いた高反応性基質配列の同定

近年筆者の研究グループは、M13 バクテリオファージ提示型のランダムペプチドライブラリーを用い、基質として高い反応性を有するペプチド配列を同定することに従事してきた。ファージ提示型ライブラリーは本来、提示ペプチドとの親和性に基づいて、特定のリガンドに対して結合する分子の探索やエピトープマッピング等に用いられるものである。しかし我々は提示ペプチド (12 残基) を含むファージ自体を、酵素反応の「基質」として扱うという新しい視点からの探索法に成功した^{8,9)}。

その方法の概略を図 2 に示す。ファージライブラリーとビオチン標識一級アミンを TGase の存在下で架橋化反応させ、反応しやすい (グルタミン残基を含む) 配列を提示しているファージに取り込ませる。ビオチンを取り込んだファージを、アビジンゲルとの親和性を利用して選別し、感染増殖を行って再び酵素反応に供する。このサイクルを何度か繰り返すことで、基質となりやすいグルタミン残基を含むペプチドを提示するファージを選別する。こうして選んだファージの提示ペプチド配列から、TGase が好む基質配列 (候補) 群を明らかにできる。得られた配列は、組換え融合タンパク質やペプチドとして解析することにより、反応性の高いものをさらに選別しうる。

これまでに factor XIII, TGase 1, TGase 2, 放線菌由来の TGase (MTG) についてそれぞれの高い反応性を有する基質配列群を同定し、得た配列の特異性や反応性を解析した。その結果、配列はアイソザイム毎に、それぞれ「類似する」傾向を示した (TGase 1; Q-x-K/R-ψ-x-x-W-P, TGase 2; Q-x-P-ψ-x-D (P), factor XIII; Q-x-x-ψ-x-W-P, MTG; φ-x-ψ-Q-x (R)-x-φ: ψ は疎水性アミノ酸, φ は芳香族アミノ酸, x は任意のアミノ酸)。さらに得られた配列群の中から、反応性や特異性に最も優れたペプチド配列を、それぞれのアイソザイムについて決定した^{8,10,11)}。

3. 高反応性基質配列の活用

このような配列は、既知の基質中の配列に基づくデータ集積からは決して得られなかったものであり、本酵素反応での「各アイソザイムの好み」を評価する上でも、有用な情報を提供できた。TGase 2 や factor XIII については、これまでに天然に存在する基質タンパク質の反応しやすい部分配列は報告されていたが、ランダムペプチドライブラリーから得られた配列は、天然の基質を超える反応性と特異性を有していた^{8,9)}。そのため、これらのペプチドを利用して様々な応用展開が可能になり、いくつかの成果を出しつつある。

第一に、これらの基質配列を、特定の機能を持ったタンパク質に付加して方向制御的な固相化を行うことである。本酵素を用いたタンパク質の固相化は、すでにいくつかの報告がなされているが¹²⁾、得た配列を用いればより効率的に方向性を保った固相化が可能になる。すなわち、機能を持ったタンパク質の活性に影響を与えずに、N 末端または C 末端にこの配列を導入して、「基質化」を施す。このような改変タンパク質は、グルタミン残基受容基質としての一級アミンが付与された固相であれば、TGase による架橋化反応で固相化が可能になる。

我々はこの方法を一本鎖抗体及び酵素 (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) を対象に試みた。TGase 2 の高反応性基質配列を遺伝子工学的に付加させ、より良く「基質化」したこれらのタンパク質の効率的な固相化に成功している¹³⁾。方法としては、アミノ基と反応する活性化セファロースゲルにジアミンを反応させ、二つのアミノ基の片方をゲルに、もう一方をフリーの状態にしておく。そのゲルと「基質化」されたタンパク質を TGase の酵素反応に供すると、方向制御的に効率よく保持された。固相化の担体として、今後は他の素材についても検討を進めたい。

第二に、組織中の酵素活性を視覚化することにも応用で

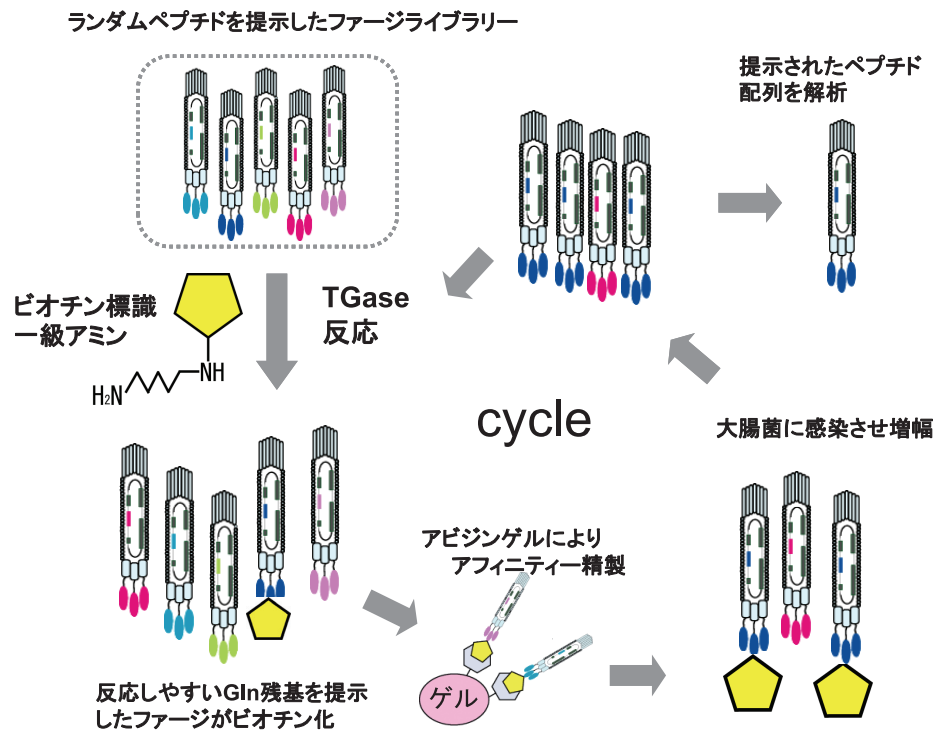


図2 M13 ファージ提示型ランダムペプチドライブラリーを用いた高反応性基質配列のスクリーニング

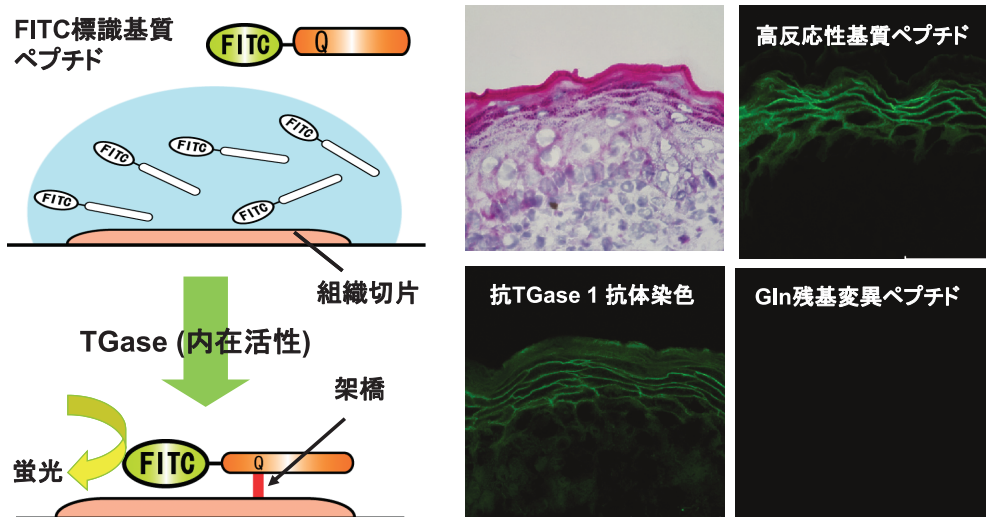


図3 皮膚特異的TGase (TGase 1) に対する高反応性基質ペプチドを用いた、マウス皮膚表皮での架橋産物の視覚化

方法の概略(左)と活性染色の結果(右)を示す(bar, 50 μ m). 左上;ヘマトキシリン・エオシン染色, 左下;抗TGase 1抗体による免疫染色, 右上;蛍光標識したTGase 1高反応性基質ペプチドを用いた架橋化反応, 右下;グルタミン残基をアスパラギン残基に変異させたペプチドを用いた反応.

きる。これまで抗体でTGaseの存在を観察できても、活性の存在としての検出は困難であった。特にアイトザイムを区別しての活性検出はまだ確実な方法はなかった。そこで高反応性基質配列に相当するペプチドを蛍光標識し、組織切片と反応させ、内在性の酵素活性によって（グルタミン受容側の）基質にペプチドを取り込ませれば、架橋化反応産物を検出できると考えた。

はじめに、皮膚特異的TGaseのひとつ（TGase 1）に対する高反応性基質配列を用いて試みた¹¹⁾。マウス皮膚表皮の凍結切片を調製し、蛍光標識したペプチドを加えて反応させた。図3に方法と結果を示しているが、TGase 1の存在する場所（表皮細胞の細胞膜）に相当してシグナルが観察された。グルタミン残基を変異させたペプチドではこのようなシグナルは存在しない。また、図では省略したが、カルシウムイオンキレート存在下やTGase 1ノックアウトマウス由来の皮膚表皮切片の場合にも観察されない。

この方法により、原理的にはどの組織でも、「活きた」酵素の存在を検証することが可能と考えられる。組織のアイトザイム特異的なTGase活性を高感度に検出するシステムとして今後詳細な研究を展開する予定である。また、さらに第三の活用法として現在、これらのペプチドを利用して、簡易で高感度・高特異性を持つTGaseのアッセイ系も確立している。

TGaseの異常な活性レベルが関与する疾病が、血液凝固や皮膚表皮の形成不全の他、アルツハイマー病等の脳神経疾患や小腸での自己免疫疾患（セリアック病）等、広範な組織で明らかにされている^{14,15)}。このような疾病に関する研究では、血中や組織の酵素活性を高感度に検出することが求められている。これらの研究において、組織での活性の視覚化や微量アッセイ系が役立てられると考えている。今後は、細胞内外の新たな基質検索等の基礎的知見の拡大に加え、先に述べた工学的な応用とあわせて幅広い展開をめざしたい。

本研究は筆者の所属する研究室において、杉村禎昭博士、細野真代氏、北村三矢子氏らとの研究成果であり、紹介して感謝の意を表したい。

- 1) Lorand, L. & Graham, R.M. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 140-156.
- 2) Beninati, S., Bergamini, C.M., & Piacentini, M. (2009) *Amino Acids*, 36, 591-598.
- 3) 人見清隆 (2005) 生化学, 77, 552-558.
- 4) Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005) *Nat. Rev. Mol.*

Cell Bio., 6, 328-340.

- 5) Hitomi, K. (2005) *Eur. J. Dermatol.*, 15, 313-319.
- 6) Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 447-454.
- 7) Esposito, C. & Caputo, I. (2005) *FEBS J.*, 272, 615-631.
- 8) Sugimura, Y., Hosono, M., Wada, F., Yoshimura, T., Maki, M., & Hitomi, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 17699-17706.
- 9) Hitomi, K., Kitamura, Y., & Sugimura, Y. (2009) *Amino Acids*, 36, 619-624.
- 10) Sugimura, Y., Yokoyama, Y., Nio, N., Maki, M., & Hitomi, K. (2008) *Arch. Biophys. Biochem.*, 477, 379-383.
- 11) Sugimura, Y., Hosono, M., Kitamura, M., Tsuda, T., Yamaniishi, K., Maki, M., & Hitomi, K. (2008) *FEBS J.*, 275, 5667-5677.
- 12) Tanaka, Y., Turuda, Y., Nishi, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2007) *Org. Biomol. Chem.*, 5, 1764-1770.
- 13) Sugimura, Y., Ueda, H., Maki, M., & Hitomi, K. (2007) *J. Biotechnol.*, 131, 121-127.
- 14) Hartley, D.M., Zhao, C., Speier, A.C., Woodard, G.A., Li, S., Li, Z., & Walz, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 16790-16800.
- 15) Sollid, L.M. (2002) *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 647-655.

人見 清隆

(名古屋大学大学院生命農学研究科
応用分子生命科学専攻)

Identification and application of the preferred substrate peptides for transglutaminases

Kiyotaka Hitomi (Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan)

Dock ファミリータンパク質による細胞形態・運動の制御

1. はじめに

細胞はアクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格を使ってその形態を変化させたり維持したりしている。細胞骨格は外界からの刺激によって引き起こされる細胞内のシグナル伝達によって厳密にコントロールされており、そのシグナル伝達に重要な役割を担っているのがRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質（Gタンパク質）である。RhoファミリーGタンパク質は、GTPが結合することにより活性状態に、GDPが結合することにより不活性状態になることで、細胞内シグナル伝達分子スイッチとして働いている。またRhoファミリーGタンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子（guanine nucleotide exchange