

ペプチド最終分解系に関与するエキソペプチダーゼの構造と機能

伊藤 潔¹, 中嶋 義隆¹, 田中 信忠², 芳本 忠¹

生体内のタンパク質の分解は、消化器系などで胃の酸性で変性を受けた後にトリプシンなどの種々のエンドペプチダーゼによって分解する系や、ユビキチン化を介してプロテアソームで分解される系のいずれかを經由してペプチドにまで断片化される。これらの機構は詳細に研究されてきたが、最終的にアミノ酸へ分解される機構は単にアミノペプチダーゼによると考えられ、その機構はあまり研究されてこなかった。我々は、この過程においてアミノペプチダーゼNが主役として働き、そのみでは全く切断できないX-Pro結合の切断を種々のプロリン特異性ペプチダーゼと共役することにより、アミノ酸に完全分解することを示す結果を、酵素化学的方法とX線結晶構造解析を用いた研究から得ることができたので紹介する。

1. はじめに

我々は25年前、本学会欧文誌へ投稿した論文で以下のことを明らかにした¹⁾。市販のアミノペプチダーゼN製品(当時はアミノペプチダーゼM, ミクロソーマルまたはメンブレンからMと呼ばれていた)は、広い基質特異性を持ち、全てのペプチド結合を切ると考えられていた。しかし、X-Pro結合まで切ること疑問を持ち、阻害剤ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)と*p*-クロロメルクリ安息香酸(PCMB)(ジペプチジルアミノペプチダーゼIVはセリン酵素, プロリダーゼはMn²⁺酵素であるがSH試薬に感受性である)を組合せ、タフトシン(Thr-Lys-Pro-Arg)

をモデル基質として、**図1**のように遊離するペプチドやアミノ酸量を測定した。その結果、アミノペプチダーゼNはX-Pro結合を切れないこと、製品に混入するジペプチジルアミノペプチダーゼIVとプロリダーゼが、完全分解の障害となるX-Proを特異的に除去することを明らかにし、これにより、アミノペプチダーゼNの作用が再開され完全分解が行われることを提唱した。

しかし、特にウシの眼球レンズのロイシニアミノペプチダーゼ(LAP)は早くから立体構造が明らかとなり²⁾、2個の亜鉛を活性部位に持つ触媒機構が詳細に研究されてきたこともあり、最近までアミノペプチダーゼというLAPを指すような状況であった。ロイシニアミノペプチダーゼは可溶性酵素で基質特異性が狭く、Clan MFと分類されて³⁾、生体内でのペプチドの分解への関与は考えにくい。一方、アミノペプチダーゼNは膜酵素であるためあまり研究が進まなかったが、自然界では微生物から哺乳類にいたるまで幅広く存在する。丁度、我々はプロリン特異性ペプチダーゼを研究していたため、2種のペプチド分解経路についてその機構を構造生物学的に解析することができた。

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(〒852-8521 長崎市文教町1番14号)

²昭和大学薬学部分析センター(〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8)

Structures and functions of the exopeptidases involved in the final steps of peptide degradation

Kiyoshi Ito¹, Yoshitaka Nakajima¹, Nobutada Tanaka², and Tadashi Yoshimoto¹ (1Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan; 2School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan)

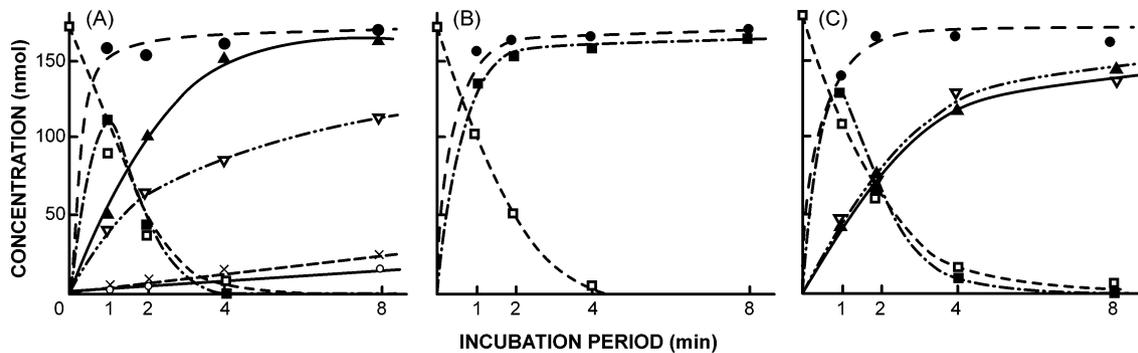


図1 市販のアミノペプチダーゼNによるタフトシンの分解¹⁾

(A)タフトシんに市販のアミノペプチダーゼNを加えて反応させた。(B)DFPを加えて反応させた。(C)PCMBを加えて反応させた。

□タフトシン (Thr-Lys-Pro-Arg), ■Lys-Pro-Arg, ▽Lys-Pro-X-Lys, ○Pro, ▲Arg, ●Thr

2. アミノペプチダーゼN

(1) M1ファミリーに属する酵素

生体内に広く分布する膜結合性のアミノペプチダーゼが存在し、Clan MAの中でのM1ファミリー酵素に分類される³⁾。の中には、本研究の膜結合アラニルアミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.2, アミノペプチダーゼN) 以外に、アミノペプチダーゼA (EC 3.4.11.7, 最初ラットやブタの腎臓で見出された、酸性アミノ酸に特異性を持ち、別名グルタミルアミノペプチダーゼとも呼ばれる)、シスチニルアミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.3, p-LAP, オキシトシンやバソプレッシンを不活性化することからオキシトシナーゼとも呼ばれる)、ピューロマイシン非感受性アミノペプチダーゼ (PILS-AP, 脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼとも呼ばれる)、ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.14, エンケファリン分解アミノペプチダーゼ, アミノペプチダーゼIIIとも呼ばれる)、ロイコトリエンA₄ヒドロラーゼ (EC 3.3.2.6, ロイコトリエンA₄をジヒドロキシロイコトリエンに加水分解する)、アミノペプチダーゼB (EC 3.4.11.6, アリルアミノ酸や塩基性アミノ酸に特異性を持つ)がある。

アミノペプチダーゼN (前述のごとくこれまでアミノペプチダーゼM, 膜結合アラニルアミノペプチダーゼとも呼ばれた)はヒト体内ではCD13抗原としても知られている⁴⁾。CD13抗原のアイソザイムは、様々な腫瘍細胞表面に存在し腫瘍の血管形成や湿潤・転移に関与することから、腫瘍マーカーとしても注目されている⁵⁾。また、ヒトアミノペプチダーゼNは、ヒトコロナウイルス229Eの受容体⁶⁾としても知られている。

(2) アミノペプチダーゼNの結晶構造

我々は大腸菌からアミノペプチダーゼNをコードする2610塩基対の遺伝子をクローニングし、組換え型酵素の

発現系を構築した。精製酵素を用いた結晶化に成功し、この結晶は空間群P3₁21に属し、 $a=b=120.5\text{Å}$ 、 $c=170.8\text{Å}$ 、 $\gamma=120^\circ$ の格子定数を持つことが判明した⁷⁾。また、シンクロトロン放射光を用いたX線回折データ測定と重原子同形置換法による位相決定から、 1.5Å 分解能でリガンドフリー型のアミノペプチダーゼNの結晶構造を明らかにした⁸⁾。アミノペプチダーゼNは単量体で、N末端β-ドメイン (Met1-Asp193)、触媒ドメイン (Phe194-Gly444)、ミドルβ-ドメイン (Thr445-Trp546)、C末端α-ドメイン (Ser547-Ala870)という四つのドメインから構成されていた (図2)。N末端β-ドメインは三つのβ-シートからなるβ-サンドイッチ構造を持つ。一つのβ-シートと8本のα-ヘリックスで構成される触媒ドメインの構造は*Bacillus thermoproteolyticus*由来のサーモライシン (PDB code: 4TLN)⁹⁾の構造と類似の構造を持っていた。ミドルβ-ドメインは二つのβ-シートから構成され、C末端α-ドメインは18本のα-ヘリックスがアンチパラレルに配置した結果、中心に小さな穴を持つドーム状の構造を形成していた。本酵素と同じM1ファミリーに属するロイコトリエンA₄ヒドロラーゼ^{10,11)}とTricorn interacting factor F3¹²⁾ (PDB code: 1HS6, 1Z1W)の全体構造を重ね合わせた結果、N末端β-ドメインと触媒ドメインの構造に相関性が高く、これらはよく重なった。

アミノペプチダーゼNは、その触媒ドメインにM1ファミリーでよく保存された金属結合モチーフであるHEXXHX₁₈E配列を持ち、この配列の構成残基であるHis 297, His301, Glu320に亜鉛イオンが結合していた。この亜鉛イオンに触媒反応の求核剤と考えられる水1分子が配位しており、この水分子と水素結合を形成していたGlu 298が触媒塩基として働くと考えられる。これら活性中心の亜鉛イオンは触媒ドメイン中央に形成された溝中に見出された。N末端β-ドメインがこの溝の一端から、C末端α-ドメインが他端と上方から活性部位領域を覆うように配

置した結果、活性部位は酵素内部の空洞に存在していた。

(3) 広い基質特異性

アミノペプチダーゼ N は広い基質特異性を持つ¹³⁾。合成基質を用いた研究から、大腸菌アミノペプチダーゼ N は N 末端が酸性残基である Asp, Glu および Val を除いた基質に活性を示した。とりわけ、N 末端残基が Arg, Lys, Ala である基質に活性が高く、また N 末端が Pro である基質に対して活性を示すことが特徴的であった。我々は、野生型酵素と阻害剤であるアマスタチン、ベスタチンおよび L-Leu との複合体構造を明らかにした (図 3)。N 末端が L-Leu である基質は低濃度ではよい基質となるが、高濃度で活性が著しく低下した。これは、L-Leu による生産物阻害によると考えられる。三つの複合体構造において、これら阻害剤は亜鉛イオンに配位し、その N 末端アミノ基は M1 ファミリーによく保存された GAMEN 配列の Glu264、および N 末端 β -ドメインの Glu121 の二つのグルタミン酸残基によって認識されていた。リガンドフリー型とこれら複合体の全体構造を比較したところ、大きな違いは見られなかった。活性部位周辺の構造もよく一致していたが、唯一、Met260 の配座が大きく異なっていた。この Met260 残基は Gly261 から始まる GAMEN 配列の直前に位置し、その側鎖は活性部位の S1 ポケットに存在していた。アマスタチンとベスタチンにおいて、基質 P1 位に相当する部分は 2S-ヒドロキシ-3R-アミノ-5-メチルヘキサノイル基と 2S-ヒドロキシ-3R-アミノ-4-フェニルブタノイル基であり、これらは D-Leu と D-Phe を模した構造をしている。野生型酵素とそのアマスタチン、ベスタチン、L-Leu 複合体構造のすべてで Met260 側鎖の配座が変化したのは、これら N 末端残基の側鎖の大きさに合わせて、S1 ポケットの大きさを変化させたためと考えられる (図 4)。

(4) 部位特異的変異による解析

結晶構造の解析から、Met260 残基側鎖の配座の変化によって、S1 ポケットの大きさを変化させ、多様な基質を認識する機構を提唱した。この Met260 を Ala へと置換した部位特異的変異体 (M260A 変異体) を作製し、その N 末端残基の異なる合成基質に対する活性を測定したところ、各基質への反応性が野生型酵素と異なっていた。最も特徴的な変化としては、野生型酵素で確認された Pro 基質への活性が M260A 変異体では消失したことである。また L-Leu や L-Asn 基質への活性が、 k_{cat}/K_M でそれぞれ約 1.8 倍、4.2 倍と高くなったものの、野生型で高い活性を示す L-Lys 基質では約 13% に低下した。また L-Phe 基質に対する活性も約 5% に低下していた。大腸菌アミノペプチダーゼ N は、いくつかのアミノ酸が生産物阻害を示す。野生型酵素では L-Leu の K_i 値が 0.33mM であったのに対し、

M260A 変異体では 1.75mM と高かった。一方、M260A 変異体酵素は、L-Arg によって阻害され、その K_i 値は 0.32 mM と野生型酵素における 3.70mM から低下していた。

M260A 変異体とその L-Arg 複合体の構造を 1.8, 1.7 Å 分解能で決定した。M260A 変異体の構造は、野生型酵素と非常によく一致し、その活性部位の S1 ポケットは広い空間となっていた。野生型酵素が、速度は遅いものの Pro 基質に活性を示すことができるのは、Met260 側鎖の働きによって、Pro の収容に適した大きさの疎水性ポケットを S1 サイトに形成できるからではないだろうかと考えている。M260A 変異体で Pro 基質に対する活性が消失したのは、Ala260 の側鎖では Pro の結合に適した疎水性ポケットを形成することができないためであると説明できる。また Pro だけでなく、大腸菌アミノペプチダーゼ N は Met260 の配座を変えて、S1 ポケットを基質に適した大きさを変化させることで、幅広い基質に活性を示すと考えられる。M260A-L-Arg 複合体では、L-Arg 側鎖の N η 原子が Asn373 側鎖および Glu121 の主鎖と水素結合を形成し、グアニジノ基は Tyr376 のフェノール環とスタックするように配置していた。野生型酵素の L-Arg 基質に対する活性は高く、野生型でも基質 N 末端は同様の様式で活性部位に結合すると考えられる。しかしながら、野生型酵素に対する L-Arg の阻害活性は変異型酵素より低いことから、酵素タンパク質からの生産物の遊離に Met260 が関与している可能性がある。

(5) X-Pro 結合は切断できない

複合体構造の解析から、基質はミカエリス複合体を形成する際に、その加水分解されるペプチド結合のカルボニル基が亜鉛イオンへ配位し、イミノ基が Ala262 のカルボニル基と水素結合を形成すると考えられる。基質 P1' 位の側鎖は、触媒ドメイン上の溝の底部に相当する S1' サイトに収容される。アミノペプチダーゼ N を含む M1 ファミリーに属する酵素は X-Pro 結合を切ることができない。このことは種々のペプチド基質を用いた実験から判明していた。コンピュータシミュレーションによって活性部位に L-Leu-L-Pro を挿入したモデルを図 5 に示す。Pro の特異な構造によって、ピロリジン環は S1' ポケットに収容されず、Ala262 や Glu298 と立体障害を起こすことが推定された。このため P1' 位が Pro である基質は活性部位に結合することができず、X-Pro 結合を切断することができないことが構造面からも明らかになった。

生体には種々のプロリン特異性ペプチダーゼが存在する。特にジペプチジルアミノペプチダーゼ IV (アミノ末端から 2 番目にプロリンが存在するとプロリンのカルボキシル側を切断) は、アミノペプチダーゼによるペプチドの分解が X-Pro 結合の手前で止まっても、そのペプチドから

X-Proを除いてさらにアミノペプチダーゼが作用できるようにして、ペプチドのアミノ酸への完全分解における役割をなす。このことは小腸の刷子縁や腎臓の尿細管にアミノペプチダーゼとジペプチジルアミノペプチダーゼIVが同じ膜酵素として近い場所に存在することとも一致する。生じたX-Proはプロリダーゼによって各アミノ酸に分解される。

3. プロリン特異性ペプチダーゼによる除去

我々は最初オキシトシンやバソプレッシンを不活性化化する酵素を子ヒツジ腎に見出しポストプロリン切断酵素と名づけた(後にプロリルオリゴペプチダーゼと命名された)¹⁴⁻¹⁷⁾。その後、種々のプロリンに特異的なペプチダーゼについて酵素化学的に研究し、酵素遺伝子をクローニングし、また酵素の立体構造を明らかにしてきた¹⁸⁻²³⁾(図6)。プロリルオリゴペプチダーゼ、プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ、ジペプチジルアミノペプチダーゼIV、プロリルカルボキシルペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼはセリン酵素で、いずれもプロリンのカルボキシル基側を加水分解する。アミノ酸配列から同じプロリルオリゴペプチダーゼファミリーに属する。その中でプロリルオリゴペプチダーゼが唯一エンドペプチダーゼである。一方、アミノペプチダーゼPとプロリダーゼはプロリンのアミノ基側を加水分解し、金属酵素のメチオニンアミノペプチダーゼやクレアチナーゼと同じファミリー酵素である。

上述のごとく、生体に広く分布するアミノペプチダーゼNは広い基質特異性を持つが、唯一X-Pro結合を全く加水分解することができない。そのため、図7に示す二つの経路でプロリン特異性ペプチダーゼがプロリンを除き、アミノペプチダーゼNの作用を助けている。それぞれに関与する酵素について示す。

(1) X-ProまたはX-X-Proを除去する経路

アミノペプチダーゼNによる分解反応がプロリンの一つ手前で止まると、ジペプチジルアミノペプチダーゼIVがX-Proを除去する。その結果、アミノペプチダーゼNが再度作用することが可能となる。除去されたX-Proはプロリダーゼが分解する。なお、コラーゲンのように(X-Y-Pro)_nの繰り返し配列の場合にはプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼが働く。

a) ジペプチジルアミノペプチダーゼIV

ジペプチジルアミノペプチダーゼIVは、S9ファミリーに属するセリンペプチダーゼで、Hopsu-Havu & Glennerによって見出された²⁷⁾。哺乳類においては成長ホルモンやサプスタンスPを分解し、最近では、インスリンの生合成

や分泌に関与するグルカゴン様ペプチド1を不活性化することから、本酵素の阻害剤が新しい経口糖尿病治療薬になるとして注目されている²⁸⁾。

これまで、ブタ²⁹⁾やヒト^{30,31)}のジペプチジルアミノペプチダーゼIVの構造が明らかになっているが、我々は*Stenotrophomonas* (旧名*Xanthomonas*) *maltophilia*の酵素について研究した³²⁾。*S. maltophilia*はグラム陰性菌で院内感染を起こすことが知られている。度々抗生物質の多剤耐性を起こし、日和見感染を起こす。我々は、この菌がジペプチジルアミノペプチダーゼIVを持つことを微生物では初めて見出した。本酵素は、分子量82,000の同一サブユニットから成る二量体である。本菌のジペプチジルアミノペプチダーゼIV遺伝子をクローニングし、発現ベクターを構築した。大腸菌を用いた高発現系を確立させ、酵素を精製、結晶化し、X線結晶構造解析を行った。この結晶は、P4₃21の空間群に属し、格子定数は、 $a=b=105.9\text{Å}$ 、 $c=161.9\text{Å}$ であった。CuK α 線を用いたX線回折データ測定と重原子同形置換法から、2.8Å分解能で結晶構造を明らかにした³³⁾。本酵素は、哺乳類由来酵素と同様にN末端 β -プロペラドメインおよびC末端触媒ドメインの二つのドメインで構成されていた(図8(a))。

触媒ドメインには触媒3残基(Ser610, Asp685, and His717)が存在し、Tyr524がブタやヒトの酵素(Tyr547)と同様にオキシアニオンホールを形成すると思われる。プロリンを認識する疎水ポケットはAsn611, Val636, Trp639, Tyr642, Tyr646, Val688で構成される。また、プロペラドメインに存在する二つのグルタミン酸残基(Glu206とGlu207)が基質のN末端と結合する(図8(b))。

b) プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ

歯周病の原因菌には、好気性、嫌気性を含め十数種類の細菌が知られている。日本人成人の80%が、いずれかの細菌に感染しているといわれている。さらに、日和見感染として全身に広がると脳膿瘍など重篤となることが知られている。主要な病原菌の一つとして知られる嫌気性グラム陰性細菌である*Porphyromonas gingivalis*は、糖を利用することができず、主に外界のペプチドをエネルギー源、栄養源として利用している³⁴⁾。そのため、菌体外に強力なペプチダーゼ群を産生しており、これらが歯周病の原因酵素であることが知られている。このペプチダーゼ群には、コラゲナーゼと共にジペプチジルアミノペプチダーゼIV³⁵⁾とプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ¹⁹⁾といったプロリン特異的ペプチダーゼが存在している。我々はプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの阻害剤が有効な治療薬となると考え、酵素を結晶化して³⁶⁾、X線結晶構造解析から本酵素の構造を決定した³⁷⁾。

プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼは、分子量

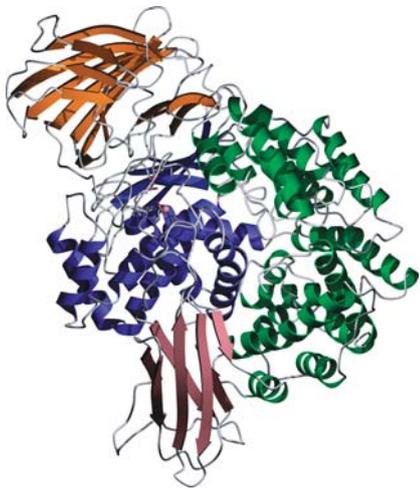


図2 アミノペプチダーゼNの全体構造
アミノペプチダーゼNのサブユニットはN末端β-ドメイン（オレンジ）、触媒ドメイン（青）、ミドルβ-ドメイン（ピンク）、C末端α-ドメイン（緑）の四つのドメインから構成されていた。活性中心のイオンは触媒ドメインに結合していた。

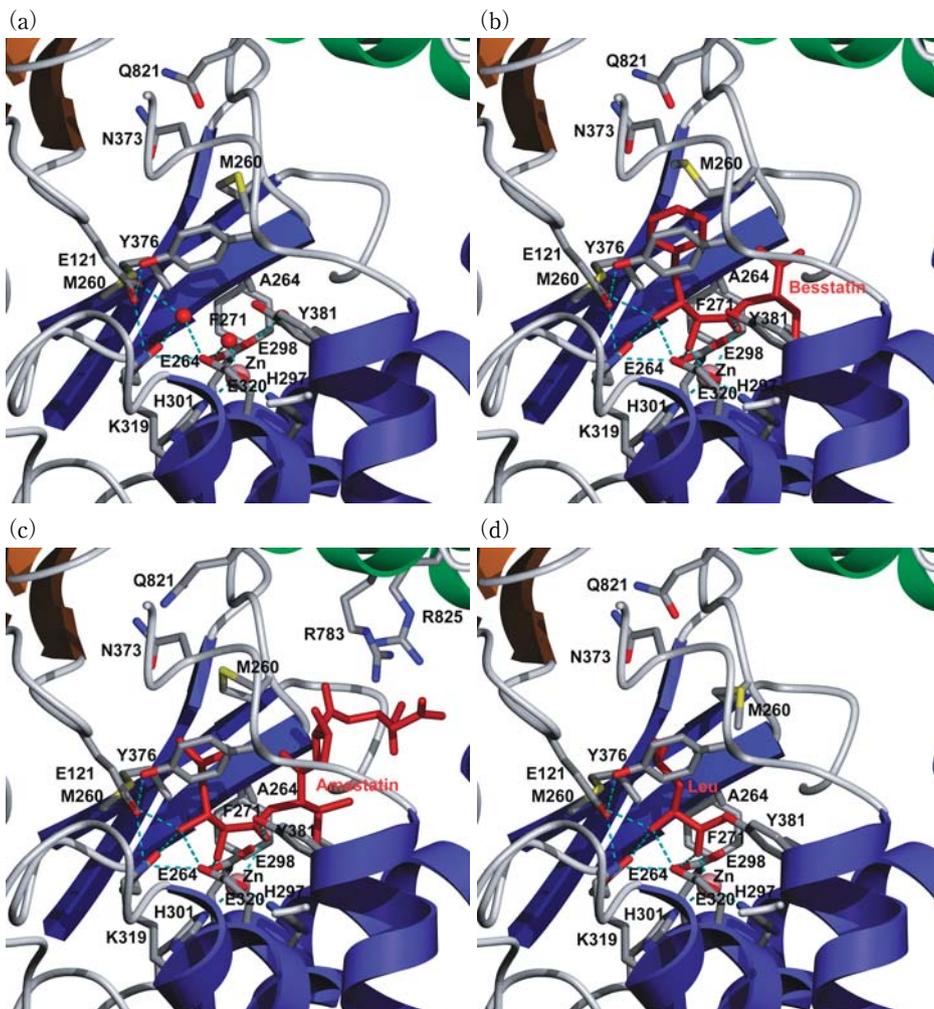


図3 アミノペプチダーゼNの活性部位構造

(a)リガンドフリー型、(b)ベスタチン複合体型、(c)アマスタチン複合体型、(d)L-Leu複合体型の活性部位をリボンスティックモデルで示す。阻害剤は、赤いスティックモデルで示す。リガンドフリー型では活性中心の亜鉛イオンは His297, His301, Glu320 に配位し、さらに1個の水分子が配位していた。この水分子は Glu298 と水素結合していた。各阻害剤のN末端アミノ基は Glu121 と Glu264 に認識される。これら活性部位の残基の位置と配向は非常によく一致していたが、Met260 だけが異なっていた。

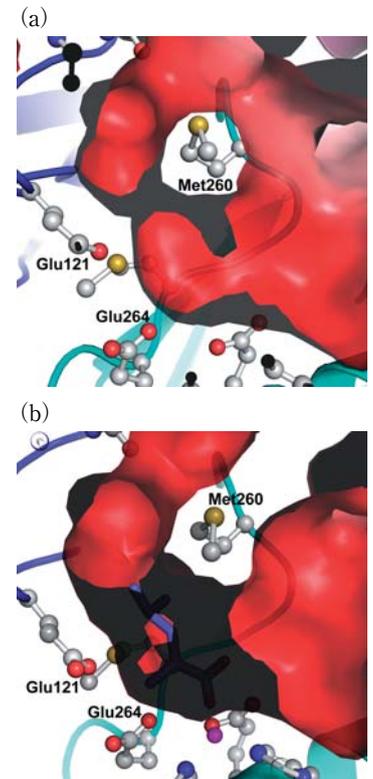


図4 活性部位のタンパク質表面図
(a)リガンドフリー型、(b)L-Leu結合型の活性部位表面図。活性部位を構成する残基の中で Met260 の配向が大きく変化していた。その結果、基質N末端残基側鎖を収容する空間が変化していた。このような Met260 の配向変化で S1 ポケットの大きさを変化させて多様な基質を認識すると考えられる。

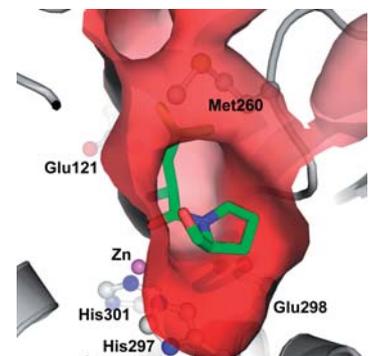


図5 アミノペプチダーゼNのLeu-Pro結合モデル

L-Leu複合体構造に基づいて構築したLeu-Pro基質結合推定図を活性部位表面図とともに示す。基質のN末端から2番目がProであると、そのピロリジン環4位と5位部分がタンパク質と立体障害を起こしていた。

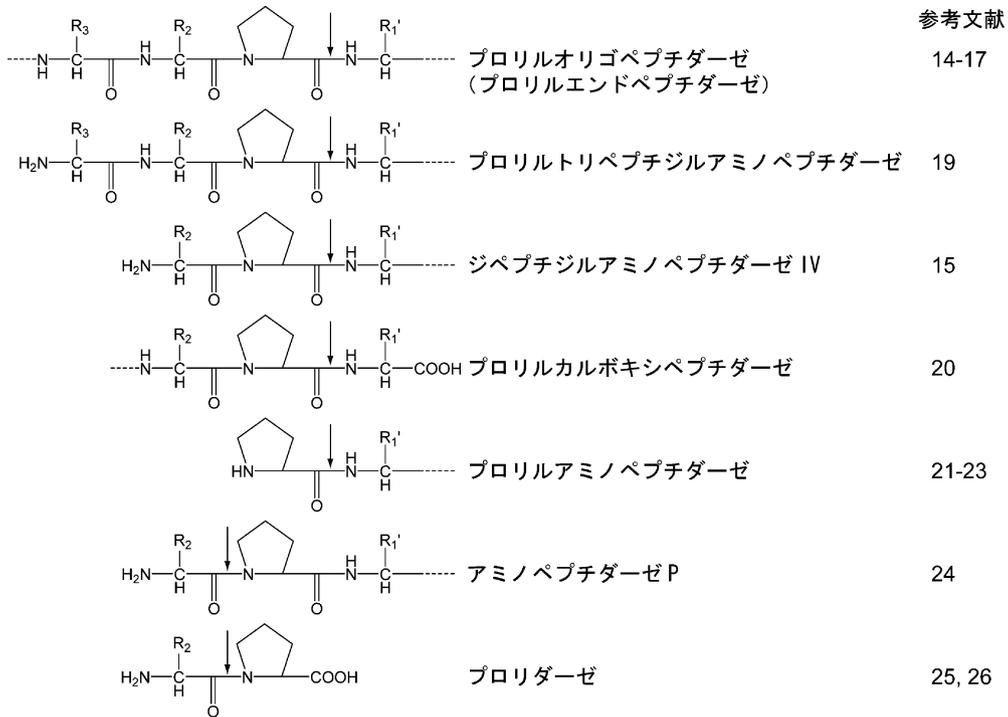


図6 プロリン特異性ペプチダーゼ

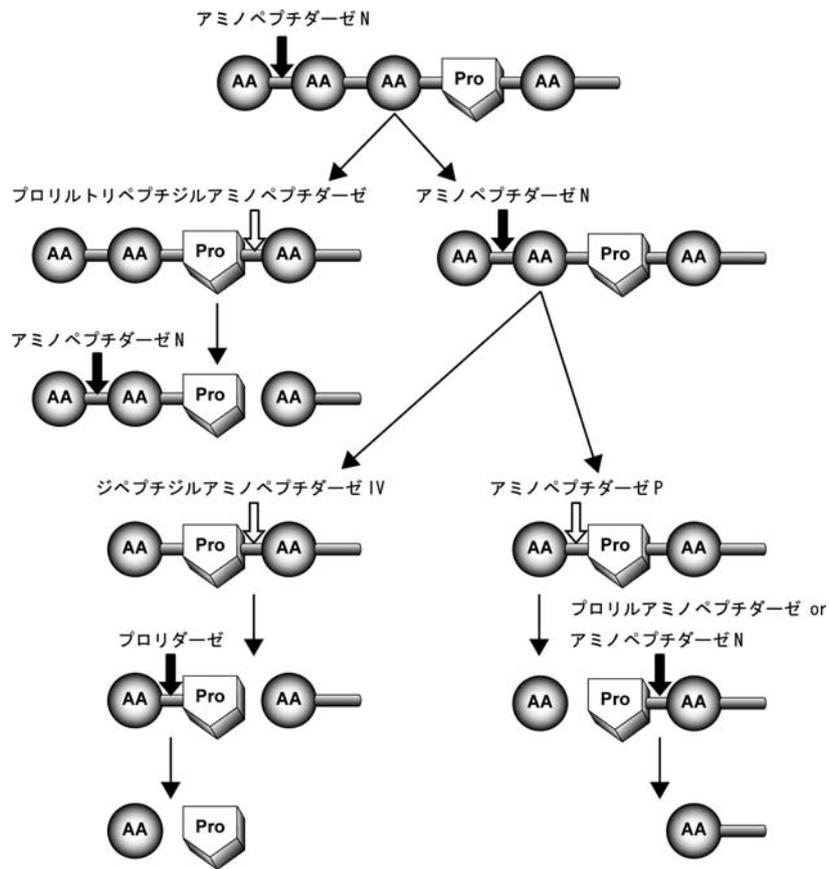


図7 ペプチドの分解経路

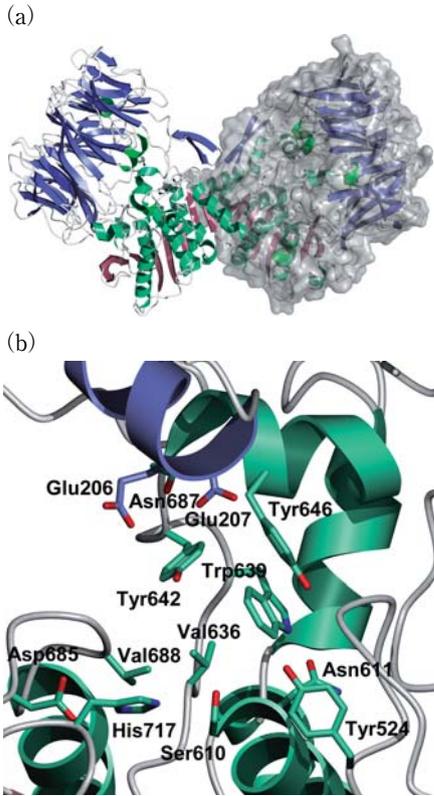


図8 *S. maltophilia* 由来ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV

(a)二量体の一方をリボンモデルで、他方をタンパク質表面図で示す。各サブユニットはβ-プロペラドメイン(青)と触媒ドメイン(緑、ピンク)の二つのドメインから構成され、活性部位は二つのドメイン境界に存在していた。(b)活性部位構造をリボン-スティックモデルで示す。β-プロペラドメインに属する残基を青、触媒ドメインに属する残基を緑のスティックモデルで示す。

82,000の同一サブユニットから成る二量体であり、N末端に疎水性の膜結合部位を持つII型の膜結合酵素である。ジペプチジルアミノペプチダーゼIVと同じS9ファミリーに属するセリンペプチダーゼである。ジペプチジルアミノペプチダーゼIVがN末端から2番目がProである基質を加水分解するのに対し、本酵素はN末端から3番目がProである基質からN末端3残基を遊離するペプチダーゼである。プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼは、*P. gingivalis*由来ジペプチジルアミノペプチダーゼIVと23%の相同性を示し、ヒト、ブタ由来ジペプチジルアミノペプチダーゼIVとも16%、15%の相同性がある。可溶画分に発現させるため膜結合部位を含むN末端38残基を除いた酵素遺伝子をPCR法で作製し、この酵素を大腸菌の系で大量発現した。組換え酵素を用いた結晶化に成功し、シンクロトン放射光を用いたデータ測定と重原子

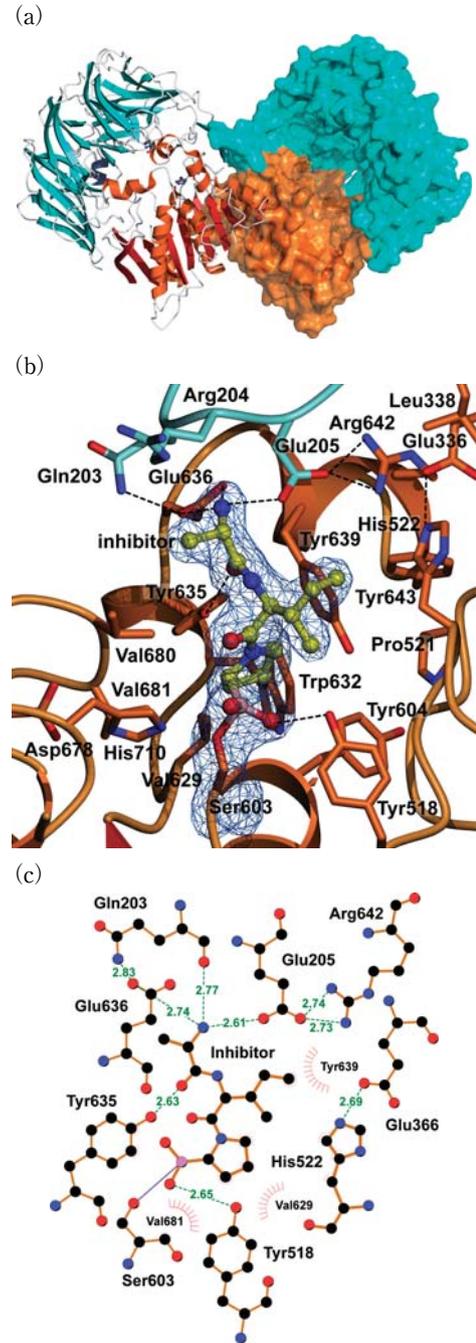


図9 *P. gingivalis* 由来プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ

(a)二量体を一方のサブユニットをリボンモデルで、他方をタンパク質表面図で示す。各サブユニットはβ-プロペラドメイン(シアン)と触媒ドメイン(オレンジ、赤)の二つのドメインで構成され、活性部位はこれらドメイン境界に位置していた。(b)β-プロペラドメインの残基をシアン、触媒ドメインの残基をオレンジで示す。阻害剤は、*F_o-F_c* omit mapとともに黄色のボールアンドスティックモデルで示す。阻害剤は活性中心のSer603と結合していた。(c)阻害剤複合体の活性部位模式図を示す。

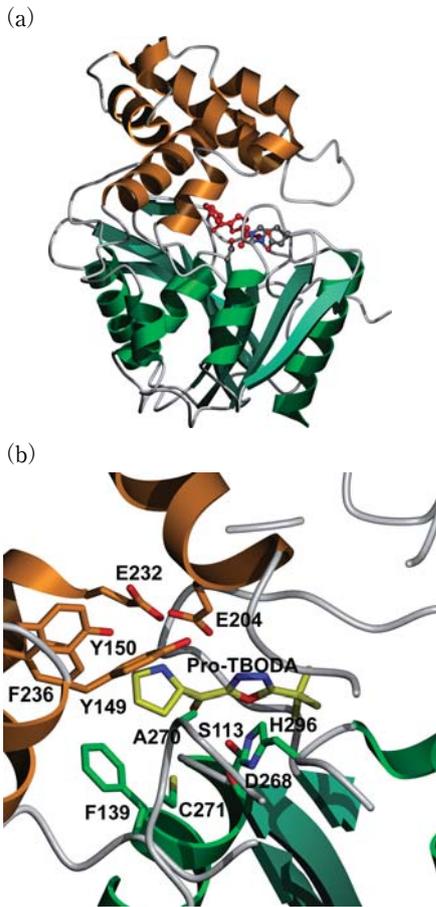


図10 *S. marcescens* 由来プロリルアミノペプチダーゼ
(a)全体構造をリボンモデルで示す。サブユニットは触媒ドメイン(緑)とヘリックスドメイン(オレンジ)の二つのドメインで構成される。阻害剤 Pro-TBODA を赤のボールアンドスティックモデルで示す。(b)活性部位のリボン-スティックモデル。触媒ドメインの残基は緑、ヘリックスドメインの残基はオレンジで示し、阻害剤 Pro-TBODA は黄色のスティックモデルで示す。

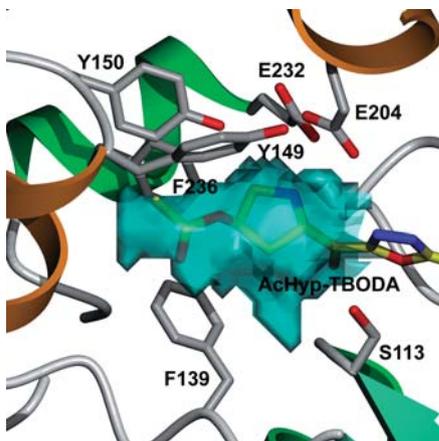


図11 AcHyp-TBODA 結合モデル
Pro-TBODA 複合体の構造に基づいて構築した AcHyp-TBODA 結合推定図。活性部位の空間を青で示す。活性部位には、基質 N 末端 Pro の 4 位官能基を収容できる空間が存在し、その大きさはアセトキシ基を収容できる。

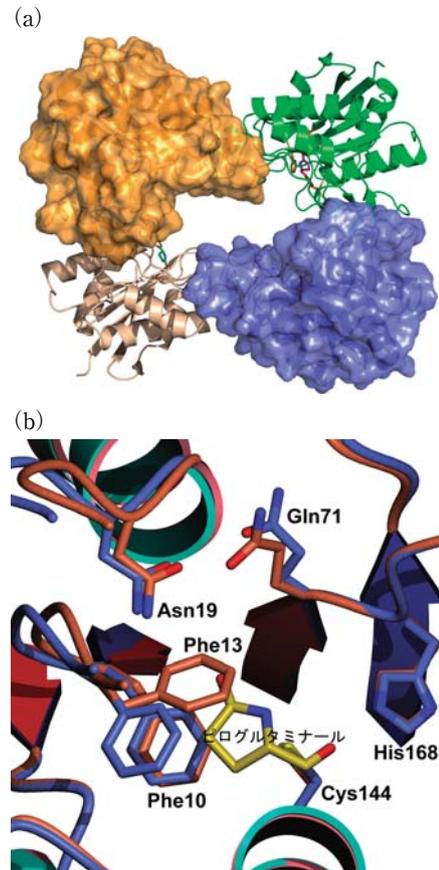


図12 プログルタミルペプチダーゼ
(a)四量体構造をリボンモデルとタンパク質表面図で示す。活性部位は各サブユニットに存在する。(b)リガンドフリー型と阻害剤複合体の活性部位を重ね合わせた図。リガンドフリー型の残基を青、阻害剤複合体型の残基をオレンジのスティックモデルで示す。阻害剤プログルタミナルは黄色のスティックモデルで示した。

同置換法から、野生型酵素の構造を 2.1 Å 分解能で決定することに成功した。プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの構造は、基本的にはジペプチジルアミノペプチダーゼ IV と同じ二量体構造を形成しており、各サブユニットは N 末端 β-プロペラドメインおよび C 末端触媒ドメインの二つのドメインで構成されていた(図 9(a))。

我々は、プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの阻害剤として、H-Ala-Ile-pyrrolidine-2-yl boronic acid を開発した。この阻害剤はプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼに対して、 K_i 値 88nM と非常に高い阻害活性を示した。阻害剤との共結晶化により複合体結晶を作製し、2.2 Å 分解能で複合体構造を明らかにした。プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの触媒 3 残基は Ser603, Asp678, His710 であり、阻害剤のホウ酸基が Ser603 に結合していた。活性部位には Tyr518, Tyr604, Trp632, Tyr635, Tyr639, Val680, Val681 で構成された疎水性ポケット

トが存在し、阻害剤のピロリジン環部分がこの疎水性ポケットに結合していた。基質アミノ基は β -プロペラドメインのGlu205と触媒ドメインのGlu636の二つのGlu残基により認識されていた(図9(b, c))。

ジペプチジルアミノペプチダーゼIVにおいて、基質アミノ基は β -プロペラドメインの二つのGlu残基(*S. maltophilia* 酵素のGlu206, Glu207)によって認識される。これらGlu残基の存在する部分はヘリックス構造である。一方、トリペプチジルアミノペプチダーゼにおける相当領域は、ジペプチジルアミノペプチダーゼIVから3残基の欠損がありループ構造を形成していた。このループ上に一つのGlu残基(Glu205)が保存されていた。さらに、ヘリックス構造からループへ変化したことで、そのGlu205と活性中心のSer603間の距離は、ジペプチジルアミノペプチダーゼIVの相当残基間の距離より遠ざかっていた。さらにGlu636が活性部位のタンパク質表面に露出することによって、ジペプチジルアミノペプチダーゼIVより1残基長い基質を結合できる空間が形成されたと考えられる。

c) プロリダーゼ

プロリダーゼはブタ小腸から最初に見出され酵素学的研究がなされた^{38,39}。ヒトプロリダーゼ遺伝子はEndoらにより明らかにされた⁴⁰。我々は*Aureobacterium esteraromaticum*よりプロリダーゼを見出し、酵素遺伝子をクローニングしたが、これまで報告のあるプロリダーゼとは全くホモロジーが見られず新しいタイプのプロリダーゼであった。

*Pyrococcus furiosus*由来のプロリダーゼはGhoshら⁴¹により遺伝子発現が行われ、Maherらによって立体構造(PDB code: 1PV9)が報告された⁴²。酵素は2量体でその単量体は二つのドメインから成る。C末端ドメインは触媒ドメインで2個のMnを持つ活性部位が存在し、ピタパン構造と呼ばれる。この2金属で架橋されたヒドロキシルイオンがX-Pro結合のアミドを求核攻撃し加水分解が起こる。プロリダーゼと後述するアミノペプチダーゼPは、そのアミノ酸配列が類似するように立体構造を重ね合わせると、非常に構造が似ている。唯一大きく異なるのは、プロリダーゼのループ(291-300)が触媒部位に向かって出ているのに対し、相当するアミノペプチダーゼのループ(361-369)は逆に外に向かっている点である。プロリダーゼに特異的な阻害剤としてAHMH-Pro((2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl-proline)が開発され複合体構造が解析された。ループ(291-300)がプロリダーゼにジペプチドの基質特異性をもたらしていることが明らかになった。現在ではヒトプロリダーゼの構造(PDB code: 2OKN)も明らかになっている。

(2) 末端XとProを段階的に除去する経路

アミノペプチダーゼNによる分解反応がプロリンの一つ手前で止まると、アミノペプチダーゼPが末端アミノ酸Xを除去する。さらに新しく生じたProをプロリルアミノペプチダーゼが除去する。その結果、アミノペプチダーゼNが再度作用することが可能となる。生物によってはプロリルアミノペプチダーゼを持たないものもあり、アミノペプチダーゼNがその働きをする。

a) アミノペプチダーゼP

アミノ末端から2番目にプロリンが存在すると作用し、X-Pro結合を切断できる。そのため、この活性を指標に最初大腸菌に見出され⁴³、ついで哺乳類からも精製された。我々はGly-Pro- β -ナフチルアミドを基質としてプロリルアミノペプチダーゼをカップリングする測定方法を開発し⁴⁴、これを用いて大腸菌のアミノペプチダーゼPとしては初めて遺伝子のクローニングに成功した^{45,46}。微生物の酵素は可溶性画分に存在するが、哺乳類の酵素は膜結合酵素でホスファチジルイノシトールで膜にアンカーされ、糖を介して酵素が結合している。このためホスホリパーゼで可溶化したのち、精製されている。Hydeらによりブタ酵素遺伝子がクローニングされた⁴⁷。

大腸菌酵素はWilceらによって立体構造(PDB code: 2bha)が明らかにされた⁴⁸。配列から推定されたごとく、アミノペプチダーゼPはプロリダーゼと非常に構造が似ている。疎水ポケット(His79, Cys59, Cys70, Tyr62, Tyr65, Phe177, Trp221)にプロリンが入る機構は他のプロリン特異性ペプチダーゼと同じである。Simmonsらによって特異的な阻害剤apstatinが開発され($K_i=14\ \mu\text{M}$)、大腸菌アミノペプチダーゼPとの複合体構造が明らかになった(PDB code: 1N51)⁴⁹。

b) プロリルアミノペプチダーゼ

アミノ末端がプロリンのときプロリンを遊離する酵素である。種々の微生物に見出され^{21,22}、我々も多くの微生物から酵素遺伝子をクローニングしてきた。*Serratia marcescens*はグラム陰性嫌気性桿菌であり、院内感染による日和見感染症の原因菌の一つとして知られる。この*S. marcescens*由来プロリルアミノペプチダーゼ(EC 3.4.11.5)は分子量36,000、アミノ酸317残基から成る単量体酵素で、ペプチダーゼファミリーS33に属するセリンペプチダーゼである。

この酵素は、N末端残基がプロリンであるペプチド基質に対して特異的に活性を示す。またアラニン、サルコシンに対しても活性を示す。我々は、セラチア菌からプロリルアミノペプチダーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた大量発現系を確立した²³。X線結晶学的手法を用い

て研究を行った結果、酵素の立体構造を決定することに成功した⁵⁰⁾(図10(a)).

プロリルアミノペプチダーゼは、 β -hydrolase fold を持つ触媒ドメインと6本の α -ヘリックスで構成されるヘリックスドメインの二つのドメインで構成されている。二つのドメイン間にはトンネル状のキャビティが形成されており、この空間が活性部位である。触媒3残基はSer113, Asp268, His298であり、これらは触媒ドメインに位置する。活性部位の内部には、触媒ドメインのPhe139, Ala270, Cys271およびヘリックスドメインのTyr149, Tyr150, Phe236で構成された疎水性ポケットのあることが明らかにされた⁵¹⁾。

三つの阻害剤(Pro-2-*tert*-butyl-(1,3,4)-oxadiazole (Pro-TBODA), Ala-TBODA, Sar-TBODA)を合成し、これら阻害剤との複合体構造をそれぞれ明らかにした。Pro-TBODA複合体構造において、阻害剤のPro残基はこの疎水性ポケットに収容され、そのイミノ基はGlu204, Glu232と水素結合を形成していた(図10(b))⁵²⁾。

コラーゲンはその三重ヘリックス構造を安定化するため、ピロリジン環の4位あるいは3位がヒドロキシル化したヒドロキシプロリン残基を含む。我々は、4-ヒドロキシプロリン- β ナフチルアミド(Hyp- β NA)とその4-ヒドロキシル基をアセチル化した4-アセトキシプロリン- β ナフチルアミド(AcHyp- β NA)を合成し、*S. marcescens*由来酵素と*Bacillus coagulans*由来酵素のそれぞれの合成基質に対する活性を比較した。*B. coagulans*由来酵素はプロリン- β ナフチルアミド(Pro- β NA)に特異的に活性を示し、Hyp- β NA, AcHyp- β NAに対してはPro- β NAの1.2%, 0.46%と非常に低い活性しか示さなかった。一方、*S. marcescens*由来酵素は、Hyp- β NAに対してPro- β NAの26%と比較的よく作用し、さらにアセチル化された基質に対して非常に強力に作用するという新しい性質が見出された。阻害剤複合体構造に基づいて、AcHyp-TBODA複合体モデルを構築したのが図11である。AcHypの4-アセトキシ基は活性部位ポケットに結合していた。*S. marcescens*由来プロリルアミノペプチダーゼのAcHyp基質に対する高い活性は、活性部位の基質ポケットが、4-アセトキシプロリンを結合するのに適した形状と大きさを有することに由来することが判明した⁵³⁾。

c) アミノペプチダーゼNがPro-X結合を切る

上述のプロリルアミノペプチダーゼは最初Saridら⁵⁴⁾により大腸菌に見出された。我々は大腸菌のプロリルアミノペプチダーゼ遺伝子をクローニングしようと、Pro- β NAを基質にした活性スクリーニングによりショットガンライブラリーからポジティブクローンを単離したが、その塩基配列はアミノペプチダーゼN遺伝子のものであった。速度

は遅いがPro-X結合を切ることができ、高発現していたため酵素活性でのスクリーニングにかかったことになる。この遺伝子を発現して研究したのが上述のアミノペプチダーゼNの結晶構造解析である⁸⁾。そこで大腸菌のアミノペプチダーゼN遺伝子をノックアウトし、プロリルアミノペプチダーゼ活性を測定したが、全く活性を検出することはできなかった。大腸菌の染色体をBLAST検索してもプロリルアミノペプチダーゼと相同性を有する遺伝子は検出できない。推定ではあるが、アミノペプチダーゼPとアミノペプチダーゼNの作用によっても、生体に必要な速度の完全分解が進むことを示しているのではないかと考えている。同様に哺乳類でプロリルアミノペプチダーゼとして見出されたのがロイシルアミノペプチダーゼ(多分アミノペプチダーゼN)であったとの報告があり⁵⁵⁾、今のところ哺乳類のプロリルアミノペプチダーゼの報告はない。ジペプチジルアミノペプチダーゼとプロリダーゼ系が哺乳類には広く分布しており、図7の左下の経路でプロリン含有ペプチドの分解活性を担っていると考えられる。一方、アミノペプチダーゼPとアミノペプチダーゼNの系が、これらの分解に関与しているかどうかは不明である。

4. その他のアミノ末端修飾基の除去

アミノペプチダーゼNの作用を妨害するものとして、プロリン以外にアミノ末端の修飾があり、修飾されたアミノ酸の除去酵素も生体に存在する。

a) ピログルタミルペプチダーゼ

エキソペプチダーゼによってペプチド中のグルタミンの一つ手前で切断されると、グルタミンが自己閉環してピログルタミン酸になることが知られている。アミノ末端がピログルタミン酸であるとアミノペプチダーゼNは加水分解することができない。一方、生体にはこのピログルタミル残基を除去するピログルタミルペプチダーゼが存在する。

我々は*Bacillus amyloliquefaciens*から酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌で高発現に成功した⁵⁶⁾。さらに、酵素を結晶化し、X線結晶回折法により立体構造を明らかにした。酵素は四量体でドーナツ構造をとり、酵素の活性部位は内部に存在する(図12(a))。触媒部位にはCys144, His168, Glu81とシステインプロテアーゼと同様の触媒3残基が存在する。Cys144の近くに疎水ポケット(Phe13, Phe10, Phe142)が存在する。この酵素に特異的な阻害剤としてピログルタミナルを新規に合成し、酵素との複合体の解析を行ったところ図12(b)のようにピログルタミン酸の5員環が疎水ポケットに挿入され、阻害剤のアルデヒド部分が酵素の触媒残基Cys144と共有結合していることが明らかとなった。さらに興味あることに、酵素に阻害剤

が入ることにより Phe13 が回転していることから、基質であるピログルタミン酸がまず Phe142 とスタッキングし、さらに上から Phe13 が覆うことにより分子認識が行われることが明らかになった⁵⁸⁾。

本酵素は常温酵素であるが、好熱菌の酵素の立体構造との比較から、サブユニット間に S-S 結合を形成させることにより大幅な熱安定性を付加することができることを示した⁵⁹⁾。

b) アシルアミノ酸遊離酵素

アミノ末端がアセチル化された場合、アシルアミノ酸を取り除く酵素である。Tsunasawa & Narita らによりラット肝臓に見出され⁶⁰⁾、クローニングされた酵素遺伝子のアミノ酸配列のホモロジーからプロリルオリゴペプチダーゼファミリー酵素であることが明らかになった⁶¹⁾。さらに、立体構造が明らかになっている (PDB code: 1VE6)⁶³⁾。酵素は二量体構造で、プロリルオリゴペプチダーゼと似てプロペラドメインと触媒ドメインがぴったり重なる。また、プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼやジペプチジルアミノペプチダーゼ IV のように側面から基質が入る空間はない。このことはプロリルオリゴペプチダーゼと同様に短い基質にしか作用しないことと符合する。

5. おわりに

ペプシンやキモトリプシンなど多くのタンパク質分解酵素は比較的分子量が小さく、酵素タンパク質の表面に活性部位が存在し加水分解が行われる。しかし、本文で紹介した酵素の触媒部位は殆どがタンパク質の内部に存在する。これは、ペプチドを効率よくアミノ末端から分解するために、フォールディングしている状態から直鎖状に延ばした形にして活性部位に次々と入るように工夫した方法のように思える。特にプロリンを含むペプチドの場合、折れ曲がる必要があると推測されるが、X 線結晶構造解析の弱点である動的な姿、すなわち基質の侵入と生産物の遊離を捉えるには別の手法が必要である。

これまであまり研究されていなかったペプチドのアミノ酸への最終分解過程に焦点を当てた。アミノペプチダーゼ N、ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV、アミノペプチダーゼおよびピログルタミルペプチダーゼの立体構造を明らかにした。さらに特異的な阻害剤を開発して複合体構造の詳細な解析を行い、酵素の基質特異性の機構を明確にした。この結果、ペプチドの分解機構がアミノペプチダーゼ N と幾つかのプロリン特異性ペプチダーゼの共役により行われることを構造生物学的に初めて明らかにした。しかし、生体内ではそれらの酵素が単なるペプチドの最終分解だけでなく、生理活性ペプチドの代謝調節や、細胞内で複雑に制御された生理機能に関与していると推定されてい

る。事実そのような目的でエキソペプチダーゼに関して研究した成果が見られ、今後研究が進み新しい発見があると期待される。

最後に、本研究へのきっかけを与え、指導および常に励ましを与えていただいた鶴大典長崎大学名誉教授に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Yoshimoto, T. & Tsuru, D. (1983) *J. Biochem.*, 94, 619-622.
- 2) Burley, S.K., David, P.R., Sweet, R.M., Taylor, A., & Lipscomb, W.N. (1992) *J. Mol. Biol.*, 224, 113-140.
- 3) Barret, A.J., Rawlings, N.D., & Woessner, J.F., (2003) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier Academic Press.
- 4) Look, A.T., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., & Peiper, S.C. (1989) *J. Clin. Invest.*, 83, 1299-1307.
- 5) Zhang, Z., Harada, H., Tanabe, K., Hatta, H., Hiraoka, M., & Nishimoto, S. (2005) *Peptides*, 26, 2182-2187.
- 6) Wentworth, D.E., Tresnan, D.B., Turner, B.C., Lerman, I.R., Bullis, B., Hemmila, E.M., Levis, R., Shapiro, L.H., & Holmes, K.B. (2005) *Virology*, 335, 185-197.
- 7) Onohara, Y., Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., Nakashima, K., Ito, T., & Yoshimoto, T. (2006) *Acta Cryst.*, F62, 699-701.
- 8) Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., & Yoshimoto, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 33664-33676.
- 9) Holmes, M.A. & Matthews, B.W. (1982) *J. Mol. Biol.*, 160, 623-639.
- 10) Hunnissen, M.M., Nordlund, P., & Haeggstrom, J.Z. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, 8, 131-135.
- 11) Rudberg, P.C., Tholander, F., Thunnissen, M.M.G.M., & Haeggstrom, J.Z. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 1398-1404.
- 12) Kyrieleis, O.J.P., Goettig, P., Kiefersauer, R., Huber, R., & Brandstetter, H. (2005) *J. Mol. Biol.*, 349, 787-800.
- 13) Yoshimoto, T., Tamesa, Y., Gushi, K., Murayama, N., & Tsuru, D. (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52, 217-225.
- 14) Yoshimoto, T., Orłowski, R.C. & Walter, R. (1977) *Biochemistry*, 16, 2942-2948.
- 15) Walter, R. & Yoshimoto, T. (1978) *Biochemistry*, 17, 4139-4144.
- 16) Yoshimoto, T., Fischl, M., Orłowski, R.C., & Walter, R. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 3708-3716.
- 17) Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M., & Tsuru, D. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 569, 184-192.
- 18) Yoshimoto, T., Walter, R., & Tsuru, D. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4786-4792.
- 19) Banbula, A., Mark, P., Bugno, M., Silberring, J., Dubin, A., Nelson D., Travis, J., & Potempa, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 9246-9252.
- 20) Tan, F., Morris, P.W., Skidgel, R.A., & Erdős, E.G. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 16631-16638.
- 21) Kitazono, A., Kabashima, T., Huang, H-S., Ito, K., & Yoshimoto, T. (1996) *Arch. Biophys. Biochem.*, 336, 35-41.
- 22) Kitazono, A., Kitano, A., Tsuru, D., & Yoshimoto, T. (1994) *J. Biochem.*, 116, 818-825.
- 23) Kabashima, T., Kitazono, A., Kitano, A., Ito, K., & Yoshimoto, T. (1997) *J. Biochem.*, 122, 601-605.
- 24) Yarron, A. & Mlynar, D. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Com-*

- mun.*, 32, 658–663.
- 25) Bergman, M. & Furuton, J.S. (1937) *J. Biol. Chem.*, 117, 189–202.
 - 26) Yoshimoto, T., Matsubara, F., Kawano, E., & Tsuru, D. (1983) *J. Biochem.*, 94, 1889–1896.
 - 27) Hopsu-Havu, V.K. & Glenner, G.G. (1966) *Histochemie*, 7, 197–201.
 - 28) Pederson, R.A., White, H.A., Schlenzig, D., Pauly, R.P., Meintosh, C.H., & Demuth, H.U. (1998) *Diabetes*, 47, 1253–1258.
 - 29) Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.U., & Brandstetter, H. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5063–5068.
 - 30) Hiramatsu, H., Kyono, K., Higashiyama, Y., Fukushima, C., Shima, H., Sugiyama, S., Inaka, K., Yamamoto, A., & Shimizu, R. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 302, 849–854.
 - 31) Rasmussen, H.B., Branner, S., Wiberg, R.C., & Wagtmann, N. (2003) *Nature Struct. Biol.*, 10, 19–25.
 - 32) Kabashima, T., Ito, K., & Yoshimoto, T., (1996) *J. Biochem.*, 120, 1111–1117.
 - 33) Nakajima, Y., Toshima, T., Ito, K., Egawa, T., Kyono, K., Zheng, H., Oyama, H., & Yoshimoto, T. (2008) *J. Bacteriol.*, 190, 7819–7829.
 - 34) Shah, H.N. & Williams, R.A.D. (1987) *Curr. Microbiol.*, 15, 241–246.
 - 35) Grenier, D. & McBride, B.C. (1987) *Infect. Immun.*, 55, 3131–3136.
 - 36) Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., & Yoshimoto, T. (2005) *Acta Cryst.*, F61, 1046–1048.
 - 37) Ito, K., Nakajima, Y., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., Matsubara, F., Kabashima, T., Nakayama, K., & Yoshimoto, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, 362, 228–240.
 - 38) Davis, N.C. & Smith, E.L. (1957) *J. Biol. Chem.*, 224, 261–275.
 - 39) Yoshimoto, T., Matsubara, F., Kawano, E., & Tsuru, D. (1983) *J. Biochem.*, 94, 1889–1896.
 - 40) Endo, F., Tanoue, A., Nakai, H., Hata, A., Indo, Y., Titani, K., & Matsuda, I. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 4476–4481.
 - 41) Ghosh, M., Grunden, A.M., Dunn, D.M., Weiss, R., & Adams, M.W. (1998) *J. Bacteriol.*, 180, 4781–4789.
 - 42) Maher, M.J., Ghosh, M., Grunden, A.M., Menon, A.L., Adams, M.W.W., Freeman, H.C., & Guss, J.M. (2004) *Biochemistry*, 43, 2771–2783.
 - 43) Yaron, A. & Mlynar, D. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 658–663.
 - 44) Yoshimoto, T., Murayama, N., & Tsuru, D. (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1957–1963.
 - 45) Yoshimoto, T., Murayama, N., Honda, T., Tone, H., & Tsuru, D. (1988) *J. Biochem.*, 104, 93–97.
 - 46) Yoshimoto, T., Tone, H., Honda, T., Osatomi, K., Kobayashi, R., & Tsuru, D. (1989) *J. Biochem.*, 105, 412–416.
 - 47) Hyde, R.J., Hooper, N.M., & Turner, A.J. (1996) *Biochem. J.*, 319, 197–201.
 - 48) Wilce, M.C.J., Bond, C.S., Dixon, N.E., Freeman, H.C., Guss, J.M., Lilley, P.E., & Wilce, J.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3472–3477.
 - 49) Graham, S.C., Maher, M.J., Simmons, W.H., Freeman, H.C., & Guss, J.M. (2004) *Acta Cryst.*, D60, 1770–1779.
 - 50) Yoshimoto, T., Kabashima, T., Uchikawa, K., Inoue, T., Tanaka, N., Nakamura, K.T., Tsuru, M., & Ito, K. (1999) *J. Biochem.*, 126, 559–565.
 - 51) Ito, K., Inoue, T., Kabashima, T., Kanada, N., Huang, H-S., Ma, X., Azmi, N., Azab, E., & Yoshimoto, T. (2000) *J. Biochem.*, 128, 673–678.
 - 52) Inoue, T., Ito, K., Tosaka, T., Hatakeyama, S., Tanaka, N., Nakamura, K.T., & Yoshimoto, T. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, 416, 147–154.
 - 53) Nakajima, Y., Ito, K., Sakata, M., Xu, Y., Nakashima, K., Matsubara, F., Hatakeyama, S., & Yoshimoto, T. (2006) *J. Bacteriol.*, 188, 1599–1606.
 - 54) Sarid, S., Berger, A., & Katchalski, E. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 1740–1744.
 - 55) Matsushima, M., Takahashi, T., Ichinose, M., Miki, K., Kurokawa, K., & Takahashi, K. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 178, 1459–1464.
 - 56) Yoshimoto, T., Shimoda, T., Kitazono, A., Kabashima, T., Ito, K., & Tsuru, D. (1993) *J. Biochem.*, 113, 67–73.
 - 57) Odagaki, Y., Hayashi, A., Okada, K., Hirotsu, K., Kabashima, T., Ito, K., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Sato, M., & Clardy, J. (1999) *Structure*, 7, 399–411.
 - 58) Ito, K., Inoue, T., Takahashi, T., Huang, H-S., Esumi, T., Hatakeyama, S., Tanaka, N., Nakamura, K.T., & Yoshimoto, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 18557–18562.
 - 59) Kabashima, T., Ri, Y., Kanada, N., Ito, K., & Yoshimoto, T. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, 1547, 214–220.
 - 60) Tsunasawa, S. & Narita, K. (1976) *Meth. Enzymol.*, 45, 552–561.
 - 61) Mitta, M., Asada, K., Uchimura, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Sakiyama, F., & Tsunasawa, S. (1989) *J. Biochem.*, 106, 548–551.
 - 62) Bartlam, M., Wang, G., Yang, H., Gao, R., Zhao, X., Xie, G., Cao, S., Feng, Y., & Rao, Z. (2004) *Structure*, 12, 1481–1488.