

(研究題目)

$^{67}\text{Zn}$  NMRを用いたアミノペプチダーゼMの構造化学的研究

Structural and Chemical Study of Aminopeptidase M by Using  $^{67}\text{Zn}$  NMR Spectroscopy

(研究者)

小駒喜郎

信州大学 繊維学部 機能高分子学科 助手

Yoshiro Ogoma,

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Associate

## Summary

$^{67}\text{Zn}$  NMR is highly useful direct method for the studying the dynamic and static behavior of  $\text{Zn}^{2+}$  interacting with protein. In this report, an aminopeptidase M (APM), which is one of the  $\text{Zn}^{2+}$ -required enzymes, was purified from porcine brain and  $^{67}\text{Zn}$  NMR was measured in order to elucidate the binding-condition of  $\text{Zn}^{2+}$  to the APM. It was suggested that the binding-condition of  $\text{Zn}^{2+}$  to the brain and kidney APMs was different from each other.

## 研究目的

生体内において、 $\text{Zn}^{2+}$ は存在量は微量ながら、様々な代謝に必要なおよそ300種もの酵素の活性中心として働いている。従って、これらの酵素における $\text{Zn}^{2+}$ の状態を分析することは、それらの酵素の活性発現機構の研究に重要な知見を提供するものと思はれる。しかし、 $\text{Zn}^{2+}$ は非発色性、反磁性のため、分光学的に $\text{Zn}^{2+}$ を直接捉えることは困難であった。その中において、 $^{67}\text{Zn}$  NMRは唯一の直接的な観察手段であり、最近のNMR装置の進歩と相まって、その応用面の研究に期待がもたれている。そこで、本研究ではアミノペプチダーゼM (APM) という $\text{Zn}^{2+}$ 酵素における $\text{Zn}^{2+}$ の存在状態と活性発現の相関性を $^{67}\text{Zn}$  NMRを用いて検討した。

## 実験方法

APMをブタ脳より新たに精製し、純度はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により同定した。APM活性は、基質に種々のアミノ酸の

-

ニトロアニリド誘導体およびβ-ナフチルアミド誘導体を用い、加水分解により生じた

-

本電子JNM-A400 FT-NMRを用い、共鳴周波数24.9 MHz、 $^{67}\text{Zn}$ 濃度は2 mMとし、20 °C下、すべて0.2 M HEPES-KOH (pH 7.0)中で測定した。

## 研究成果

精製したブタ脳由来のAPMは、電気泳動的に単一バンドであり、分子量100,000の単一鎖であった。市販のブタ腎臓由来のAPMが分子量140,000のサブユニットからなるホモダイマーであることと著しく異なっていた。そこで、以下の測定にはこの2種類のAPMを比較として用いた。9種類の基質 (Ala, Leu, Val, Ile, Phe, Trp, Ser, Tyr, Arg) についてAPM活性を測定した結果、脳および腎臓由来のAPMは類似した $K_m$ ,  $V_{max}$ 値が得られ、共に顕著な差のない幅広い基質特異性が認められた。

APMは活性中心の $\text{Zn}^{2+}$ をキレートすることで不活性化される（これをアポ酵素と言う）。そこで、EDTAを用いて、脳および腎臓由来のアポAPMを調製し、種々の二価金属イオンの添加による活性の回復能を調べた。その結果、両者のAPM共に $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ において活性の回復が認められた。しかも、これらの金属イオンに対する親和性は脳由来のAPMの方が腎臓由来のAPMより高いことが示された。また、 $\text{Mg}^{2+}$ は全くAPM活性を回復させなかった。 $\text{Zn}^{2+}$ 酵素における $\text{Co}^{2+}$ や $\text{Mn}^{2+}$ による活性化の理由については

"Vallec-Williamsひずみ説" が提唱されている。しかし、 $\text{Zn}^{2+}$ の親和性の相違について、その理由は不明であるが、この結果は両者のAPMにおいて $\text{Zn}^{2+}$ の存在状態が異なっている可能性を示唆している。そこで次に、この可能性を検討するために、 $^{67}\text{Zn}$  NMRを適用した。

$^{67}\text{Zn}^{2+}$ 溶液に脳および腎臓由来のアポAPMを添加すると、 $^{67}\text{Zn}$  NMRスペクトルは共にブロードになった（図1）。アポAPMのかわりに、活性発現に $\text{Zn}^{2+}$ の関与しない乳酸脱水素酵素を添加しても、このようなスペクトルの変化は全く認められなかった。従って、このような線幅の広がりには $^{67}\text{Zn}^{2+}$ がアポAPM結合したことによって生じたものと考えられる。しかも、この線幅の広がりには添加したアポAPM濃度に依存しており、さらに、腎臓由来のAPMの方が脳由来のAPMよりも低濃度の添加でほぼ同程度の広がりを示した（図2）。この結果は、脳由来のAPMの方が腎臓由来のものよりも $^{67}\text{Zn}^{2+}$ に対する親和性が高いことを示唆しており、先のAPM活性の結果とも良く対応している。

また、腎臓由来のAPMだけにおいて、 $^{67}\text{Zn}$  NMRスペクトルは線幅の広がりだけでなく、濃度依存的な低磁場側へのケミカルシフトも同時に認められた。このようなケミカルシフトは現在のところ他に見いだされておらず、その解釈は困難であるが、少なくとも両者のAPM間で $\text{Zn}^{2+}$ の存在状態の相違が大きく起因しているものと推測される。

以上、 $^{67}\text{Zn}$  NMRを $\text{Zn}^{2+}$ 酵素であるAPM適用することによって、それぞれの酵素における $\text{Zn}^{2+}$ の存在状態の相違が示唆された。今後、先のケミカルシフトの原因を明らかにするとともに、他の多くの $\text{Zn}^{2+}$ 酵素についても応用していく予定である。

最後に、本研究に多大なご協力をいただいた、信州大学繊維学部 近藤慶之教授、同研究室の副島信一郎氏、天野晴夫氏、および長野県工業試験場 伊東健氏に深く感謝いたします。

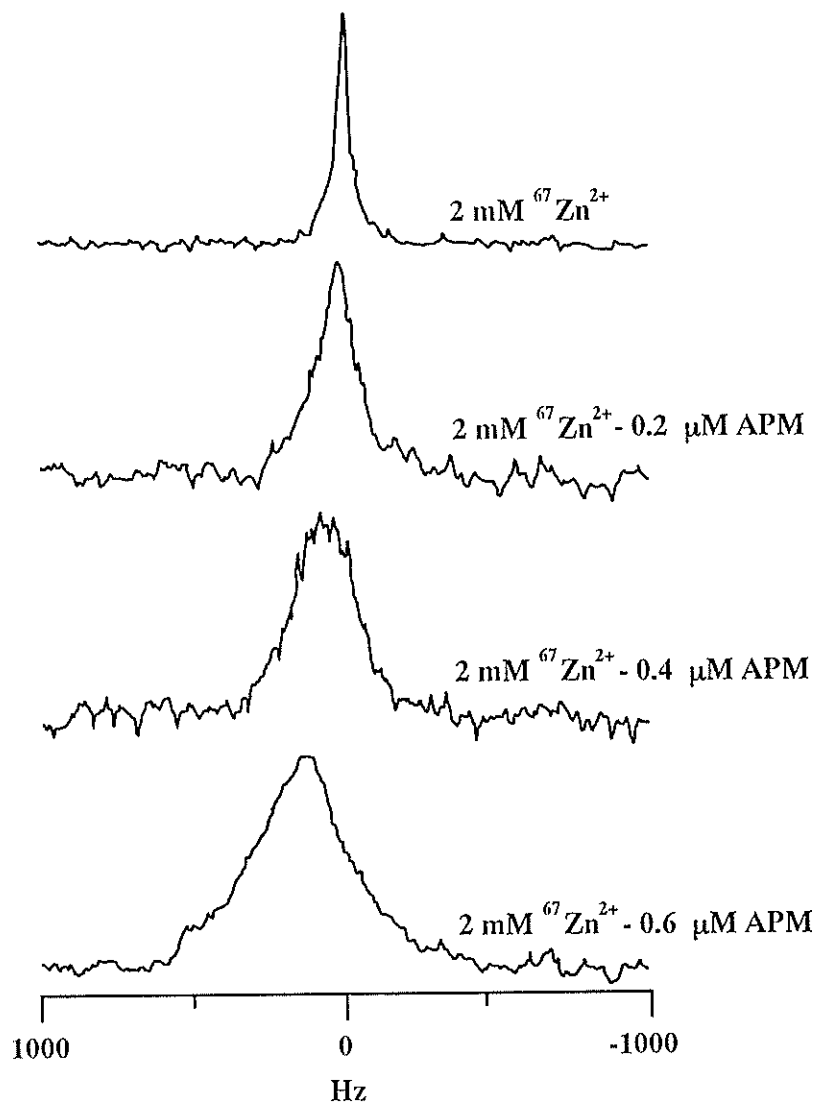


図1 腎臓由来のAPM添加による $^{67}\text{Zn}$  NMRスペクトルの変化

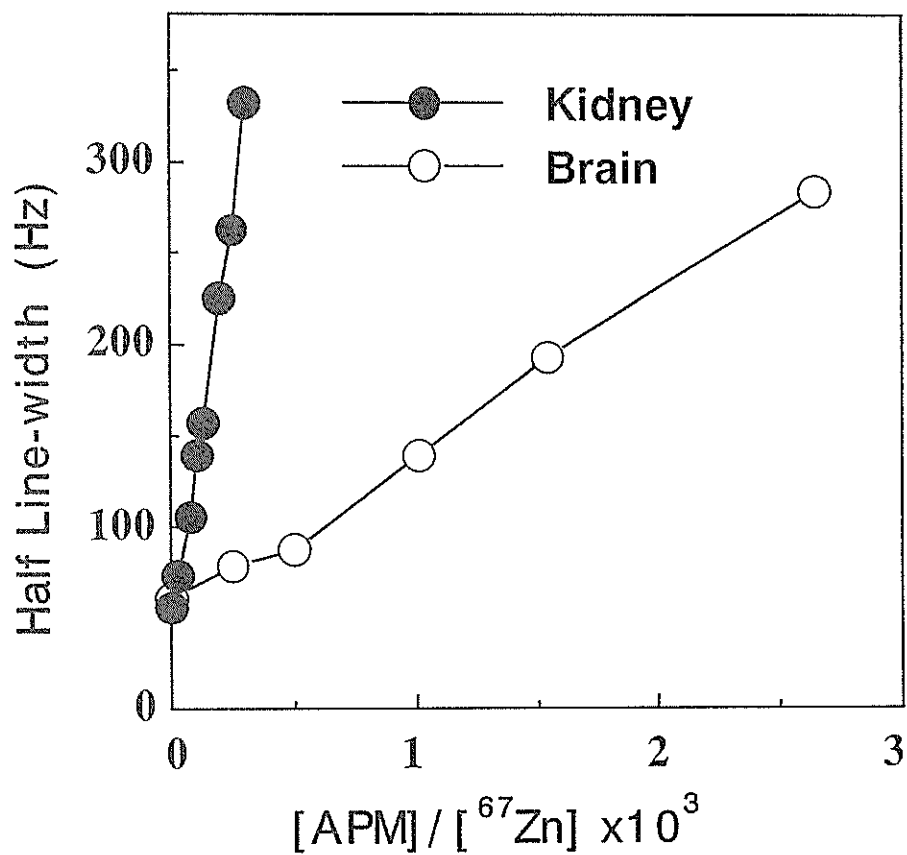


図2 脳および腎臓由来のAPM添加による半値幅の変化