

単純分化細胞（放線菌）におけるプロテアーゼ・インヒビター相互作用系

Molecular Communication between Protease and Protease Inhibitor in *Streptomyces*

研究代表者： 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 助手 田口 精一
Assistant Professor, Dept. of Biological Science and Technology, Science Univ. of Tokyo
Seiichi TAGUCHI

Most of the microbial extracellular inhibitory proteins discovered so far have been isolated from *Streptomyces* and classified as members of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) family (termed SIL) on the basis of their common structure and protease inhibitory specificity. Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of the isolated SIL proteins revealed strong correlation between the reactive center region of inhibitors and inhibition specificities toward target proteases (termed SAL). From the findings obtained in this study, I have been establishing the concept that protease inhibitors such as SILs may regulate endogenous extracellular proteolytic activities of SAL proteases by binding to and inactivating these proteases.

【研究目的】

近年、生体内反応のバイオモジュレーターともいべきプロテアーゼインヒビターの生理的意義や存在状態については、さまざまな病態（癌転移、アルツハイマー病、エイズウイルス感染など）と関連した研究の進展とあまってホットな話題である。抗生物質生産（代謝分化）や形態分化など多彩な顔を見せる放線菌において、両者の形質発現制御が密接に関わっていることが分子レベルで解明されつつあるが、プロテアーゼとそのインヒビターが生産される生理的役割についてはほとんど不明である。放線菌起源のSSI (*Streptomyces* subtilisin inhibitor) は、国内の生化学研究グループにより構造活性相関研究が多角的に進められてきた蛋白質だが、本来の生理的意義についてはいまだ謎であり、それを解き明かすことが本研究課題の目的である。

【研究経過】

これまで申請者は、SSI類似蛋白質（SIL蛋白質群と命名）が放線菌群にほぼ普遍的に存在することを発見し、それら

の構造・機能特性の解析を進めてきている。改めて調査してみると、これらSIL蛋白質群は、微生物起源のものとしては唯一の明確に確立されたファミリーであった。そこで、SIL蛋白質群の生理的意義を追究するには、(1) SIL蛋白質群の構造・機能・分子進化解析をおこない、(2) インヒビターと相互作用する内因性標的酵素の同定と特徴を掴むこと、は本質的に重要であると考え、これらを主要課題として設定し研究を展開してきた。

【研究成果】

(1-1) 総計18種のSIL蛋白質の全一次構造を丹念に決定した。その結果、疎水コアなどの分子内部のアミノ酸残基や二量体界面を構成する β シート上に存在するアミノ酸残基では保存率が高く、アミノ酸残基の置換や挿入、欠失は β 1-strandと β 2-strandの間のループ領域、反応部位のN末端側に存在するフレキシブルループ領域や α ヘリックスなどの分子表面で起きていることがわかる。また、疎水コア内でアミノ酸置換が起きる場合には側鎖による立体障害や空隙の生成が起こらないように、側鎖

の packing rearrangement が起こっているようである。さらに、S S Iの部位特異的変異体の解析から S S Iがプロテアーゼインヒビターとして機能するために必要であることが示されている構造やアミノ酸残基、たとえば、反応部位近傍のゆらぎを抑えているジスルフィド結合やAsn99、C末端のカルボキシル基と塩結合を形成しているArg29、 β シートと α 1-ヘリックスの間に存在して疎水相互作用をしている

Trp86、さらに β シートの束が形成する二量体界面に存在し、S S Iの二量体形成に寄与しているVal13などは、これらのインヒビター群の中で完全に保存されていることが明らかになった。

(1-2) S I L蛋白質の阻害特性は次のようにまとめられる。トリプシンを阻害するものではP1部位がLysあるいはArgであり、P4部位の側鎖が大きくなったり、フレキシブルループ領域にアミノ酸残基の挿入があると阻害活性は低下し、一方P4部位の側鎖が小さくなると阻害活性は強くなる傾向があること、またキモトリプシンを阻害するものについてはP1部位がMetである他、P4部位が側鎖の小さいアミノ酸が必要であることがわかる。サチライシンに対してはSIL4に見られるようにP4部位の側鎖が大きいと阻害活性が強くなることがわかる。さらにサチライシンを強く阻害するSIL15はP1部位にGlnをもつユニークなインヒビターである。そしてこれらの結果は、S S Iの部位特異的変異体の実験結果ともよい対応を示した。

(1-3) 近隣結合法と最大結合法によってS I L蛋白質群の分子系統解析をおこなったところ、それぞれの生産菌自体の系統関係と相関のあることが判明した。また、阻害反応中心におけるアミノ酸置換頻度は平均的で、哺乳類血漿中のプロテアーゼインヒビターでいわれている強いDarwinian selectionは働いていないと結論された。

(2-1) 全てのS S I消失変異株において増殖速度・気菌糸着生（最初の分化過程）能の低下（走査電顕で確認）とプロテアーゼ生産の増大を示す多面的形質変化を

観察した。これらの現象は、他種の放線菌株でも認められた。したがって、S I L蛋白質は菌の生育に必須ではないが、少なくとも分化をはじめとする生理的制御に関わっていることが示唆された。

(2-2) 抽出DNA画分のパルスフィールドゲル電気泳動分析（広島大・木梨博士と共同）の結果から、S S I生産消失は、本遺伝子が線状クロモソームの末端に位置し、非常に欠失しやすい状態にあることが原因であることが判明した。そして、同じ現象が他のS I L生産菌でも認められた。

(2-3) S S Iの内因性標的プロテアーゼが3種類特定でき、S S Iの生理的機能解明の出発点に立った。まず、20 kDaプロテアーゼSAM-P20について詳細な解析をおこない、以下のような性質が明らかとなった。SAM-P20は、天然界最小のセリンプロテアーゼであり、キモトリプシン様の基質特異性を有していた。S S Iと特異的に複合体（モル比1:1、 $K_i=8.0 \times 10^{-10}$ ）を形成し不活性化されること、S S Iの反応阻害部位が、Met73-Val74のペプチド結合であることが判明した。

(2-4) SAM-P20遺伝子上流には、メタロチオネイン様蛋白質をコードし得る読み枠が存在し、その機能をフレームシフトにより解析したところ、SAM-P20遺伝子の発現を負に制御することが推定された。またSAM-P20遺伝子の下流には、それと相同な遺伝子が見つかり、独立に転写されることも明らかとなった。またこの遺伝子産物は、26 kDaの内因性標的プロテアーゼSAM-P26と同一であることが、塩基配列分析とペプチドマッピングの結果から明らかとなった。

(2-5) 45 kDaの内因性標的プロテアーゼSAM-P45は、110 kDaの前駆体として生合成され、菌体外へ分泌することが推定された。一次構造から本プロテアーゼは、サチライシンファミリーの新規メンバーであることがわかった。基質特異性は、トリプシン類似で活性発現にCaイオンを要求する。成熟領域の後には、膜にアンカーする能力をもつと思われるプロ領域が存在

し、いわゆるプロホルモンプロセッシング酵素フリンははじめとするKex2型プロテアーゼに類すると考えられた。

(総括) 以上の結果から考えられる分化微生物放線菌におけるプロテアーゼとそのインヒビターとの関係を図1にまとめた。インヒビターの生理的機能として、外界での役割と生産菌自身の内なる役割とに大別してみる。放線菌の主な生育舞台は土壌である。当然枯草菌などの他種の微生物の産生するプロテアーゼ(その代表としてサチライシン)と遭遇する局面は容易に想像され、特に形態分化時の細胞はデリケートな状態になるので外来プロテアーゼには感受性になる。その生体防御システムとしてプロテアーゼインヒビター分子の菌体外放出は有効に機能するであろう。一方内なる役割として考えられるのは、内因性標的プロテアーゼ群(SALs)の生理的機能たとえば栄養摂取、形態分化、二次代謝物の産生などを制御するというものである。事実、SAM-P20遺伝子発現が栄養状態に応答して誘発されるという結果を得ている。したがって、SAM-P20の栄養条件に依存した産生および活性が、遺伝子発現

レベルそして翻訳後のSSIによる活性阻害という2つの過程で制御されている姿が見えてきている。またSAM-P20遺伝子に相同のSAM-P26遺伝子がゲノム上でタンデムに位置している理由は何なのか? 真核細胞でよく見られる遺伝子重複のメカニズムがこの場合働いているのか? さらにSAM-P45が膜にアンカーするということが実証されれば、膜上での生理的役割に興味を持たれる。そのときSSIがどの様に関わってくるのか検討課題である。そして特筆すべきは、これまで調べた全ての菌株で共通することは、一種類の蛋白質性のインヒビター(SILs)が複数のプロテアーゼをマルチプルに制御し得るということである。現在のところ、我々の放線菌以外の微生物でこのようなプロテアーゼ・インヒビター相互作用系について研究されていないので、ここで筆者が提出した仮説が微生物界に普遍的なものかどうか議論することはできないが、このような視点でさまざまな微生物の生理生態を眺めてみるのもおもしろいのではないかと考えている。

Hypothetical biological role of SIL proteins

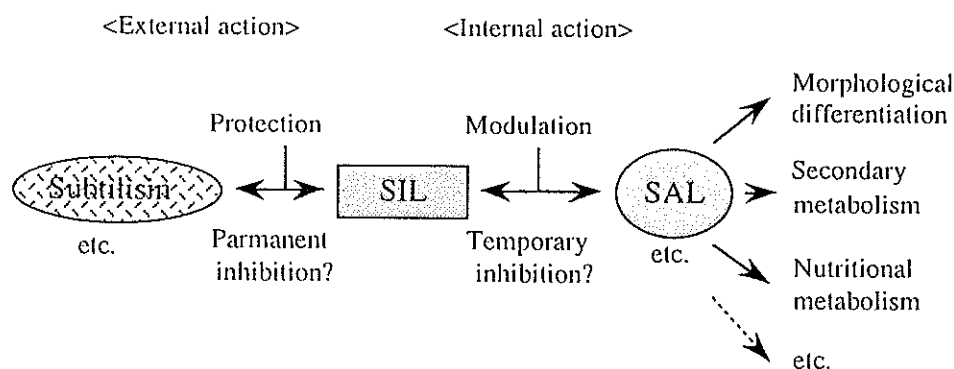


図1 放線菌におけるプロテアーゼ・プロテアーゼインヒビターの生理的制御の仮説

【今後の課題と発展】

このように、SSIの内因性標的プロテアーゼが複数存在(SALs)することがわかり、それらの酵素学的性質が解明されつつあるが、さらにSILsとSALsの当該遺伝子を特異的にノックアウトしてそれらの機能解析をするという課題が残された。放線菌の場合、菌種によって制限・修飾系の問題が立ちはだかり容易に破壊ベクターが生細胞に導入できないので、地道に安定なDNA導入法を確立していく必要がある。またSIL遺伝子が、線状クロモソームの末端に位置し、欠失しやすいというショッキングな結果を得たので、その周辺状況を探ることはSILsの生理的意義解明において意義深い。今後、SILsとS

ALsの相互作用系を軸に、分化微生物放線菌の特殊性を調べ上げていくことによって、他種生物との違いあるいは共通性を浮き彫りにしていけるものと期待している。

【謝辞】

終始激励およびアドバイスを賜りました当研究室教授、百瀬春生博士そして日夜実験に励んでいただいた学生各位に深謝申し上げます。学習院大・生命研の三浦謹一郎、小島修一両博士にはSIL蛋白質群の構造・機能相関研究で御尽力頂きました。また研究を遂行するにあたり、貴財団からの助成は大いに経済的研究基盤となりました。ここにあらためて感謝申し上げます。

【発表論文リスト】

- (1) Seiichi TAGUCHI, Shuichi KOJIMA, Kinichiro MIURA, Haruo MOMOSE: "Taxonomic characterization of closely related *Streptomyces* spp. based on the amino acid sequence analysis of protease inhibitor proteins", FEMS Microbiol. Lett., Vol. 135, pp. 169-173, 1996.
- (2) Mahito TERABE, Shuichi KOJIMA, Seiichi TAGUCHI, Haruo MOMOSE, Kinichiro MIURA: "New subtilisin-trypsin inhibitors produced by *Streptomyces*: primary structures and their relationship to other proteinase inhibitors from *Streptomyces*", Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1292, No.2, pp. 233-240, 1996.
- (3) Akinori KURAMOTO, Alexander LEZHAVA, Seiichi TAGUCHI, Haruo MOMOSE, Haruyasu KINASHI: "The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in *Streptomyces* species by pulsed-field gel electrophoresis", FEMS Microbiol. Lett., Vol. 139, No. 1, pp. 37-42, 1996.
- (4) Masayuki SUZUKI, Seiichi TAGUCHI, Shigeru YAMADA, Shuichi KOJIMA, Kinichiro MIURA, Haruo MOMOSE: "A novel member of subtilisin-like protease family from *Streptomyces albogriseolus*", J. Bacteriol., Vol. 179, No. 2, pp. 430-438, 1997.
- (5) Hidenori KANO, Seiichi TAGUCHI, Haruo MOMOSE: "Cold adaptation of a mesophilic serine protease, subtilisin, by in vitro random mutagenesis", Appl. Microbiol. Biotech., Vol. 47, No. 1, pp. 46-51, 1997.
- (6) Seiichi TAGUCHI, Shuichi KOJIMA, Mahito TERABE, Yoshinori KUMAZAWA, Hiroshi Kohriyama, Masayuki SUZUKI, Kinichiro MIURA, Haruo MOMOSE: "Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family", J. Mol. Evol., Vol. 44, No. 5, pp. 542-551, 1997.
- (7) Seiichi TAGUCHI, Takahiro OGAWA, Takeshi ENDO, Haruo MOMOSE: "A homologous gene to *Streptomyces* chymotrypsin-like protease (SAM-P20) gene is tandemly located", Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 61, No. 5, pp. 909-913, 1997.