

ラットスペルミジン合成酵素の基質結合部位の
三次元構造の解明

(研究課題番号 07672324)

平成7～9年度科学研究費補助金
基盤研究 (C)(2)

研究成果報告書

平成10年3月

鮫島啓二郎

0098030707

城西大学
水田記念図書館

0098030707

城西大学
水田記念図書館

ラットスペルミジン合成酵素の基質結合部位の
三次元構造の解明

(07672324)

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 鮫島啓二郎
(城西大学薬学部教授)

1.45
A.58

大学

ラットスペルミジン合成酵素の基質結合部位の
三次元構造の解明

(07672324)

平成7年度～平成9年度 科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 鮫島啓二郎
(城西大学薬学部教授)

城西大学
水田記念図書館

0098030707

ラットスベルミジン合成酵素の基質結合部位の三次元構造の解明

はしがき

スベルミジン合成酵素は、プトレシンに脱炭酸化S-アデノシルメチオニン (deAdoMet) のアミノプロピル基を転移する酵素である (Fig. 1) .

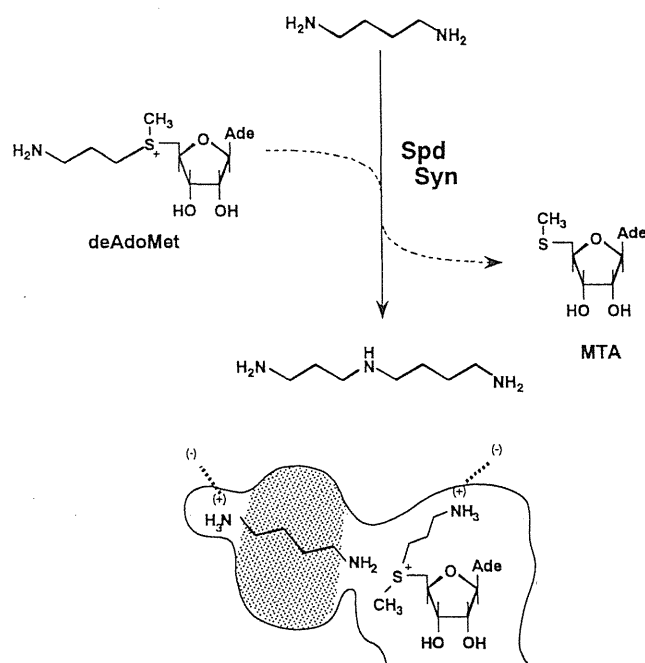


Fig.1 Biosynthesis of spermidine and active site of spermidine synthase

生物界に広く存在する各種ポリアミンの中で、本酵素により合成されるスベルミジンは中心的な存在であり、生命の維持にとって欠くことが出来ない。従って、本酵素について得られる情報は、ポリアミンの調節ひいては細胞増殖の調節に関して有用な指針を与える可能性がある。われわれは、既に本酵素の研究を進めるために必要な各種方法論、アミノプロピルトランスフェラーゼの基質および基質アナログの合成、¹⁾ 新規アフィニティカラムを用いる哺乳動物由来スベルミジン合成酵素の完全精製、²⁾ ラットおよびブタ由来スベルミジン合成酵素に対する抗血清の調製、³⁾ アミノプロピルトランスフェラーゼに対する新規阻害剤の合成、⁴⁾ などを開発してきた。本研究は、それらの研究の延長線上にあり、スベルミジン合成酵素の活性部位周辺のアミノ酸配列に関する情報を得るために行ったものである。

研究を進めるための前提として、本酵素の一次構造をまず決定しなければならない。哺乳動物スベルミジン合成酵素のアミノ酸配列については、ヒト、マウス、ラット由来酵素のDNA配列の解析結果が報告⁵⁾されているが、ヒトとマウスの極めて高い類似性に比べて、ラットのN末端凡そ30残基およびC末端凡そ20残基の類似性が乏しく、実際の酵素タンパクを用いて再検討する必要がある。純化酵素の供給については、はじめ、米国Pegg教授との協力により成功した組み換えDNAによるクローンを用いて多量に得る予定であったが、発現が不十分でそのための手段とはならず、ラット前立腺から少量の酵素を繰り返し精製しながら研究を進めることになった。従って、微量酵素タンパクを使って一次構造を決める必要があり、エドマン法のみならず、セミマイクロHPLC-MALDI-TOF-MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)を有効に利用することとした。さらに、活性部位に存在すると考えられているシステイン残基を目安に、市販のSH基蛍光標識試薬で標識されたペプチド断片の検索、およびタンパク質のSH基近傍に存在するアミノ酸配列の空間的位置関係を知るための新しい方法論の基礎的検討について報告する。

なお、本研究については継続中であり、研究発表は口頭発表のみで、学会誌への発表は現在準備中である。末尾には研究期間内に発表した本酵素に関する論文を参考資料として添付する。

研究組織

研究代表者：鮫島啓二郎（城西大学薬学部教授）

研究分担者：白幡 晶（城西大学薬学部助教授）

研究分担者：新津 勝（城西大学薬学部講師）

研究経費

平成7年度 1,200 千円

平成8年度 500 千円

平成9年度 500 千円

計 2,200 千円

研究発表

口頭発表

細田晴美，白幡 晶，鮫島啓二郎：スベルミジン合成酵素活性部位構造の解析，
第11回 日本ポリアミン研究会，1995年1月24,25日（浜松）

和田牧子，天野大介，細田晴美，白幡 晶，鮫島啓二郎：MALDI-TOF-MSの活用によるラットスベルミジン合成酵素の一次構造の究明，第13回 日本ポリアミン研究会，1998年1月26,27日（東京）

和田牧子，天野大介，細田晴美，白幡 晶，鮫島啓二郎：ラットスベルミジン合成酵素の一次構造，日本薬学会 第118年会，1998年3月31～4月2日（京都）

参考論文

Akira Shirahata, Harumi Hosoda, Norio Takahashi, Takanobu Beppu, Masaru Niitsu, and Keijiro Samejima : Enzymatic aminopropylation of certain secondary amines, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 355-359 (1995)

Takanobu Beppu, Akira Shirahata, Norio Takahashi, Harumi Hosoda, and keijiro Samejima : Specific depletion of spermidine and spermine in HTC cells treated with inhibitors of aminopropyltransferase, *J. Biochem.*, 117, 339-345 (1995)

1. ラットスベルミジン合成酵素の一次構造

1-1 エドマン法による解析

DNA配列の解析により報告された哺乳動物スベルミジン合成酵素のアミノ酸配列をFig. 2に示す。ラット由来酵素のN末端凡そ30残基およびC末端凡そ20残基が、ヒト、マウス由来酵素と違っていることもあり、はじめにエドマン法による検討を行った。リジルエンドペプチダーゼで加水分解して得られるペプチドを逆相系のHPLCで分離精製し、気相シーケンサーでアミノ酸配列を調べた。得られた各ペプチドのアミノ酸配列を、DNA配列に基づく結果と比較して当てはめたものがFig. 2の4列目に示してある。精製酵素量の制約のため、比較的短いペプチドの幾つかを除き、全部のアミノ酸配列が決められなかった。しかし、得られた結果はDNAから得られた配列を基準として考えてもよいことを強く示唆した。

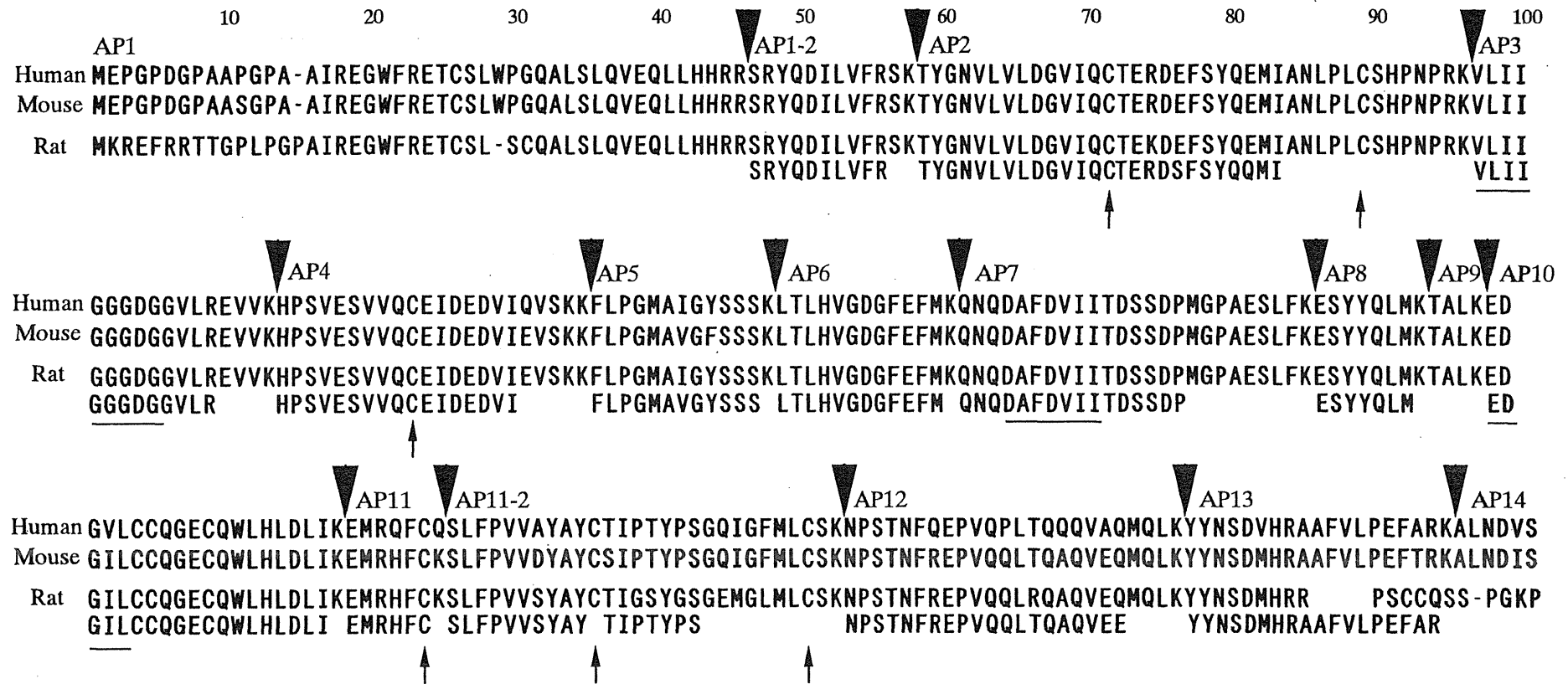


Fig.2 Amino acid sequence of mammalian spermidine synthase

1-2 MALDI-TOF-MSの利用

(1) リジルエンドペプチダーゼ処理

DNAから得られた配列を基準として、リジルエンドペプチダーゼ消化により得られるペプチドに番号をつけ (AP1~14), HPLCで分離精製したペプチド分画の微量を用いて, MALDI-TOF-MSで質量を測定した. AP7を含むと考えられる試料液のマススペクトルを一例として示す (Fig. 3).

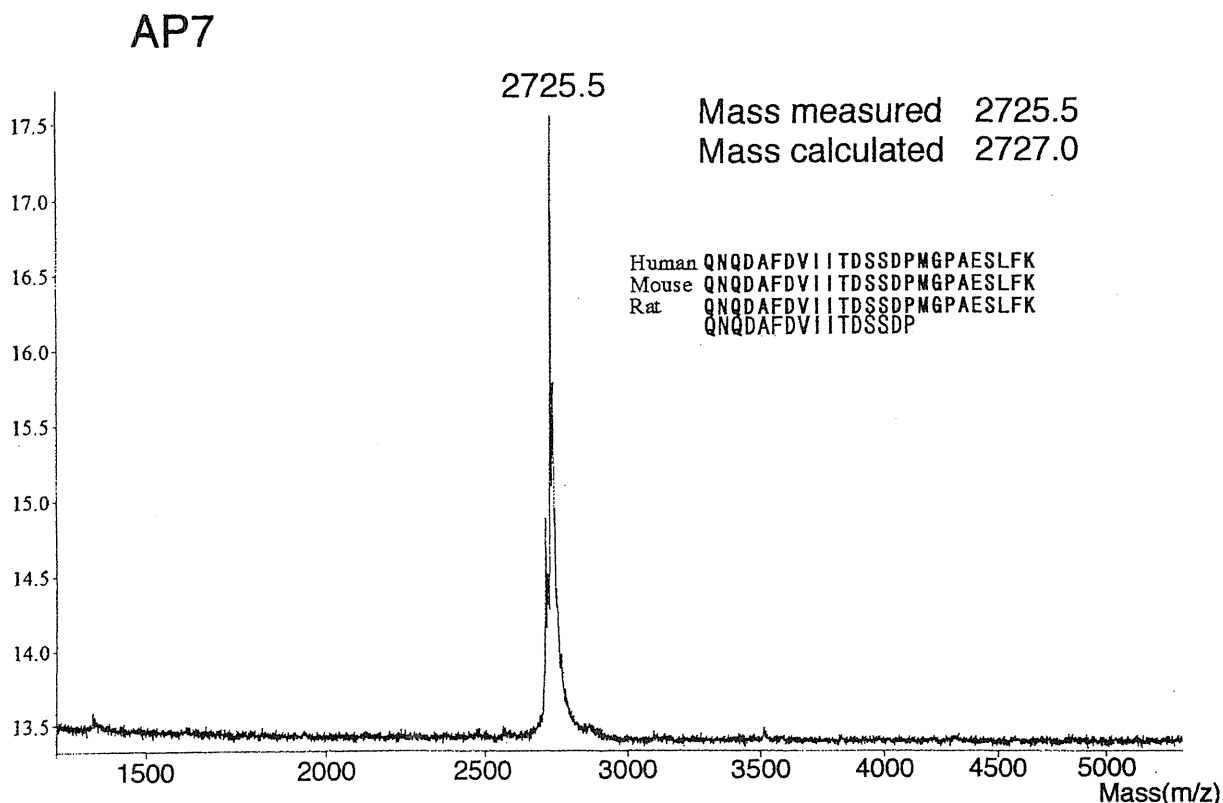
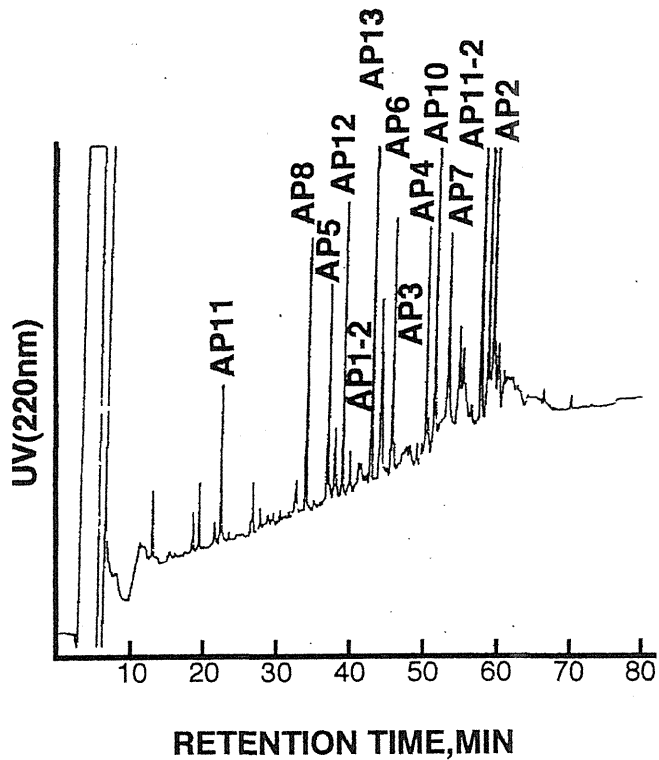


Fig.3 MALDI-TOF-MS spectrum of peptide purified by reversed-phase HPLC

エドマン法では16番目のアミノ酸まで配列を決めることができたが, 残りの9個のアミノ酸を決定することができなかった. もし, 残りの9個がDNAの結果と同じとすれば, 質量は2727.0になるはずである. 実測値は2725.5となり, 1.5の質量差はDNAの結果を十分に支持した. 同様にして他の精製分画についても検討を加え, いずれもDNAから得られた配列を支持するものであった (Fig. 4).

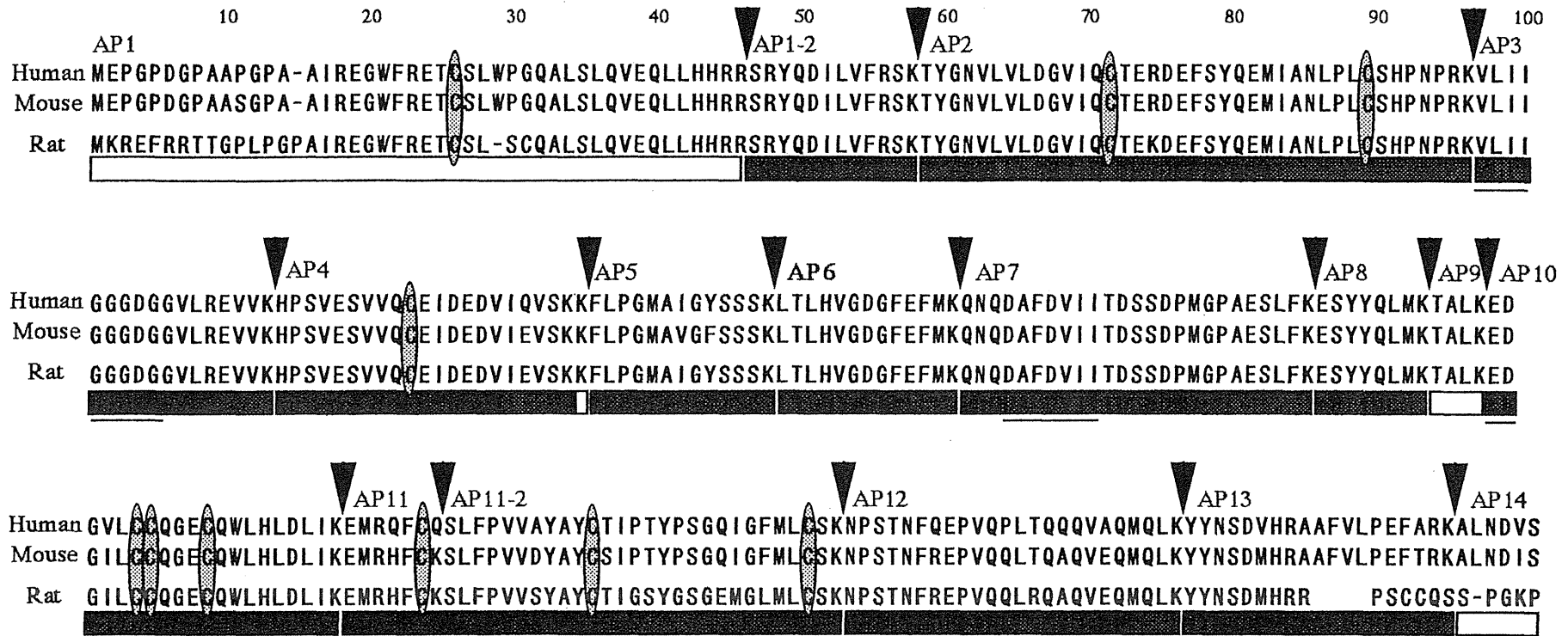


Fragment	m/z		
	$[M+H]^+$ _{calc}	$[M+H]^+$ _{obs}	
AP1	1-45	5064.8	nd
AP1-2	46-57	1512.7	1513.0
AP2	58-96	4568.2	4567.9
AP3	97-113	1682.0	1682.5
AP4	114-134	2400.6	2399.6
Lys	135-135	147.2	nd
AP5	136-148	1344.6	1345.3
AP6	149-161	1494.8	1494.6
AP7	162-186	2727.0	2725.5
AP8	187-194	1062.2	1063.5
AP9	195-198	432.5	nd
AP10	199-218	2491.9	2490.0
AP11	219-225	1009.2	1010.6
AP11-2	226-253	3190.8	3188.9
AP12	254-277	2817.2	2816.2
AP13	278-296	2346.7	2346.8
AP14	297-302	632.7	nd

Fig.4

HPLC separation and mass analysis of lysylendopeptidase digests of spermidine synthase.

これまでの結果をまとめるとFig. 5のようになり，N末端を含むペプチド（AP1），AP9およびC末端を含むペプチド（AP14）が検出されず，別の選択的加水分解法の導入が必要であった。

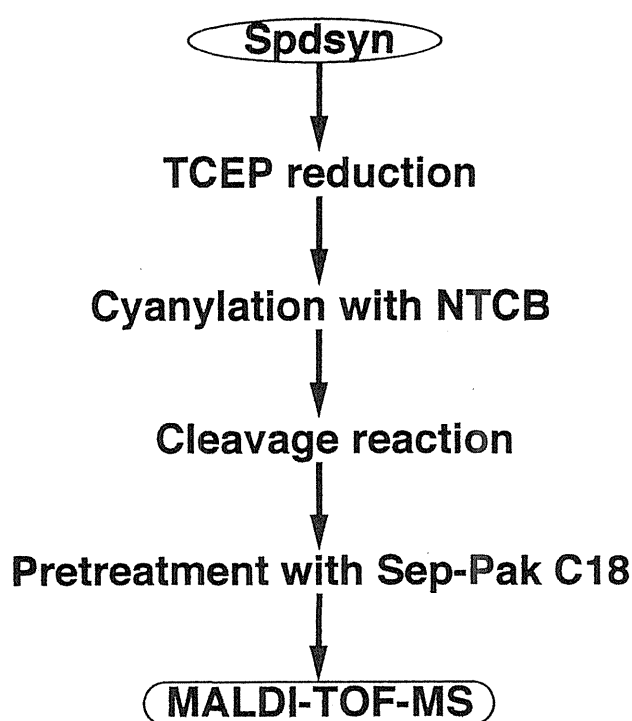


Sequence matched with calculated mw(2amu) from mouse sequence ████████,
 matched with calculated mw(5amu) from mouse sequence ████████, undetected .

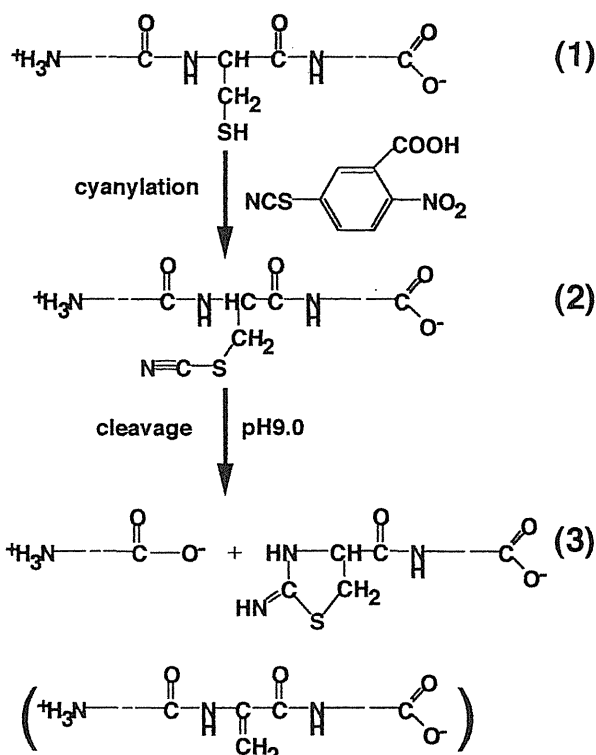
Fig.5 Lysylendopeptidase digests of spermidine synthase placed on known mammalian sequences

(2) システイン残基での化学的切断

DNAから得られた配列に基づき、26番目のシステインのN端側で切断できれば、手頃な長さでN末端を含むペプチドが検出されるだろうと思われた。そこで2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸 (NTCB) および還元剤としてはトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を用いる切断法を検討した (Fig. 6)。



TCEP: Tris(2-carboxyethyl)phosphine
 NTCB: 2-Nitro-5-thiocyano-benzoic acid



From ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 235,161-174(1996)
 by Jiang Wu, Douglas A. Gage, and J. Throck Watson

Fig.6

Specific cleavage at cystein residue by NTCB reaction

文献にしたがいTCEP, NTCB処理後, トリスでpH9にして切断し, マススペクトルを調べたところ, 幾つかのペプチドについて質量103プラスされたピークを伴うことがわかった. (Fig.7)

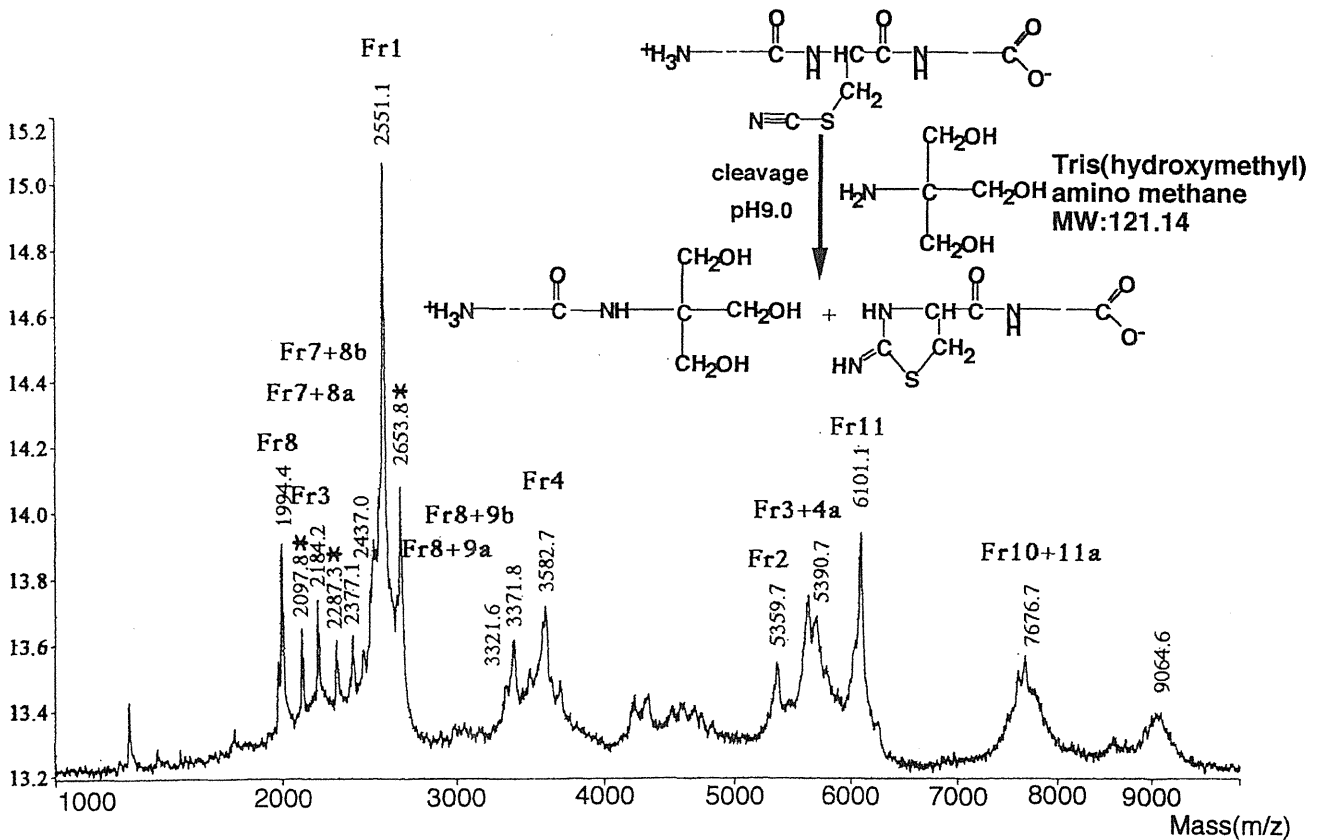


Fig.7 MALDI-TOF-MS spectrum of NTCB-cleaved peptides of spermidine synthase (pH9 adjusted with tris)

これはトリスの質量と一致し, 切断の際に一部トリスをC端側に結合したペプチドが生成するものと結論した. これは, HPLCでペプチドを単離する場合に, 同じペプチドが2種類に分かれることを意味しており, 望ましくない. そこで, トリスを用いずにリン酸緩衝液中で反応後, 水酸化ナトリウムでpH9にしたところ, +103のピークは消滅した (Fig. 8) .

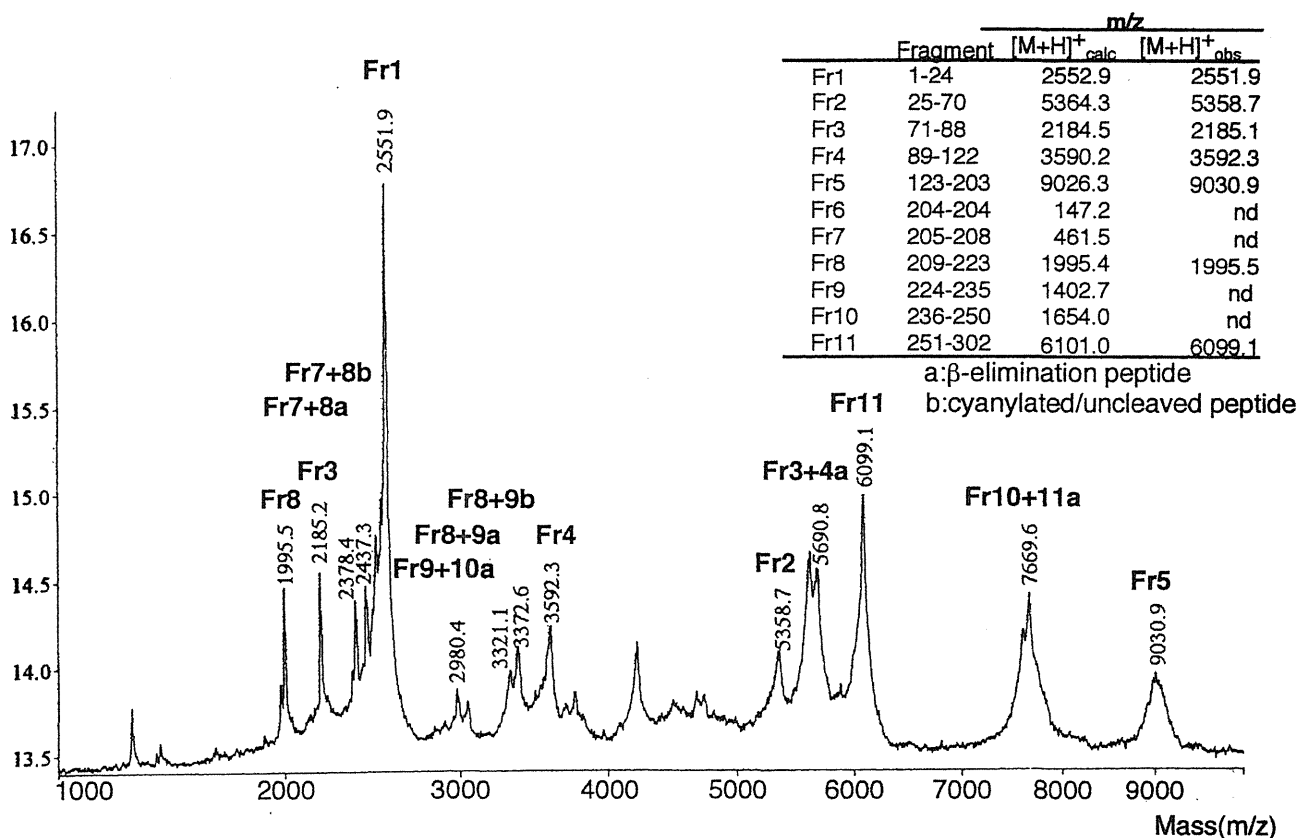
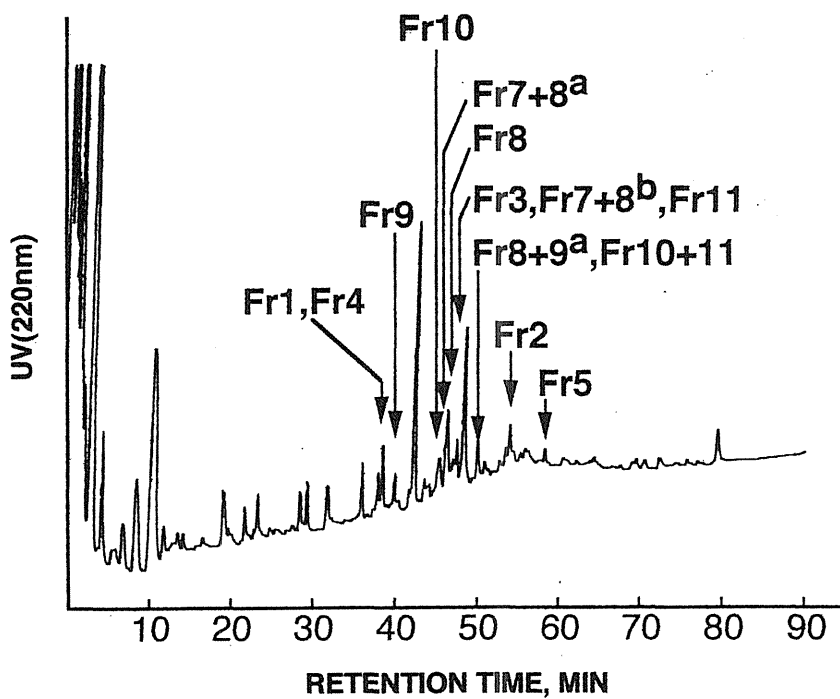


Fig.8 MALDI-TOF-MS spectrum and peak assignment of NTCB-cleaved peptides of spermidine synthase (pH9 ajusted with NaOH)

得られたマススペクトルの各質量ピークについて、マウスとヒトのDNAからの配列に基づき帰属した結果を図中の表にまとめた。ほとんどのピークが帰属でき、Fr1とFr11は特に興味があった。Fr1はN末端がアセチル化され、26番目のシステインで切断されたペプチドと考えられ、Fr11はC末端を含むペプチドと考えられた。

さらに確かめるために、HPLCで分離後、各ピークを分取し質量を測定した結果をFig. 9にまとめた。システインのみのFr6および低質量のFr7を除き、ほぼ全アミノ酸の配列を矛盾なく説明できた (Fig. 10)。

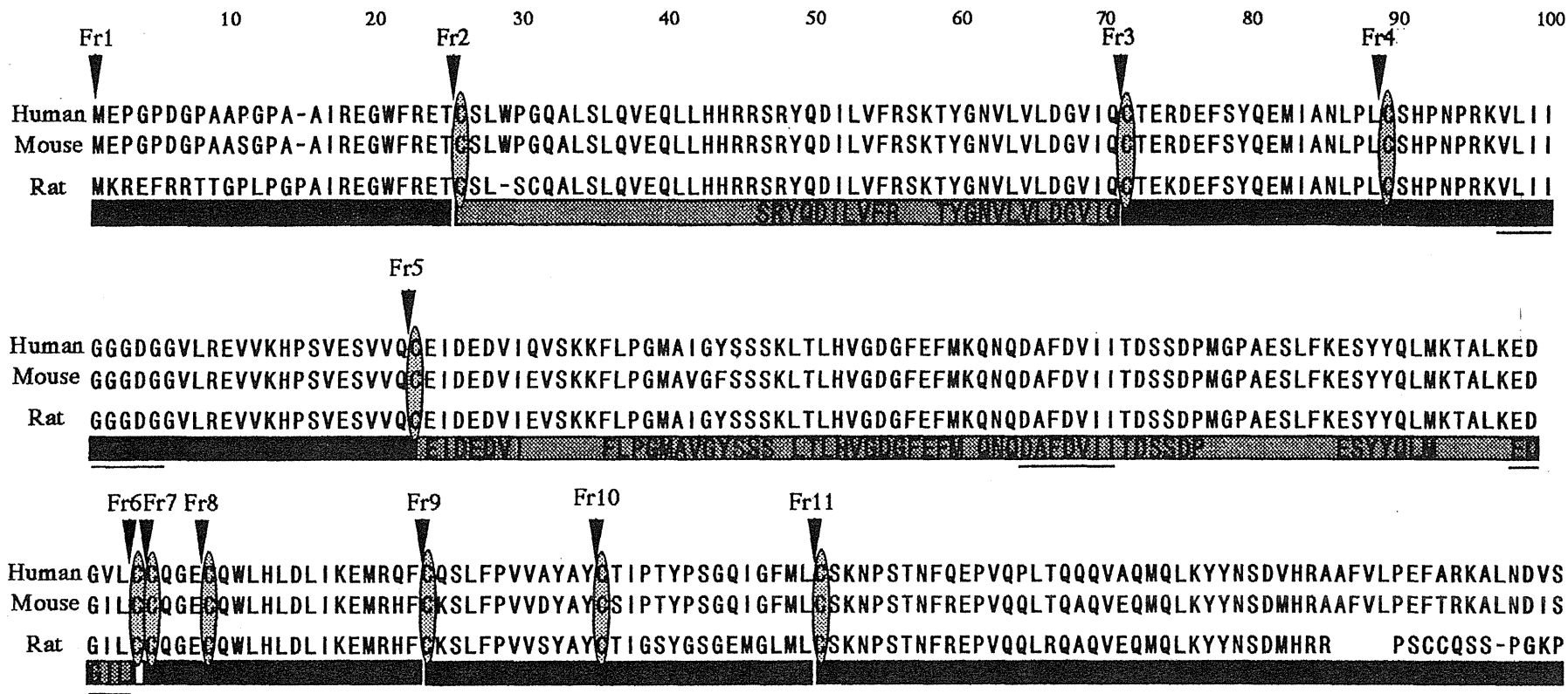


Column: Vydac C18 2.1mmx250mm
 Detector: UV 220nm

Fragment	m/z	m/z	
		[M+H] ⁺ _{calc}	[M+H] ⁺ _{obs}
Fr1	1-24	2552.9	2552.4
Fr2	25-70	5364.3	5357.6
Fr3	71-88	2184.5	2184.9
Fr4	89-122	3590.2	3588.8
Fr5	123-203	9026.3	9030.3
Fr6	204-204	147.2	nd
Fr7	205-208	461.5	nd
Fr8	209-223	1995.4	1994.6
Fr9	224-235	1402.7	1402.5
Fr10	236-250	1654.0	1652.8
Fr11	251-302	6101.0	6101.2

a: β-elimination peptide
 b: cyanylated/uncleaved peptide

Fig.9
 HPLC separation and mass analysis of NTCB-cleaved peptides of spermidine synthase



Sequence matched with calculated mw(2amu) from mouse sequence ████████,
 matched with calculated mw(5amu) from mouse sequence ████████, undetected .

Fig.10 NTCB-cleaved peptides of spermidine synthase placed on known mammalian sequence

(3) アルギニルエンドペプチダーゼ処理

以上の結果から、ラット由来酵素はマウス由来酵素とほとんど同じ一次構造を有し、ただ一つ違うのが11番目のセリン（マウス）がプロリン（ヒト）になったと考えられた。これを確かめることも含めてアルギニンのC端で切断して得られるペプチドを同様に分析し、得られた結果をFig. 11にまとめた。

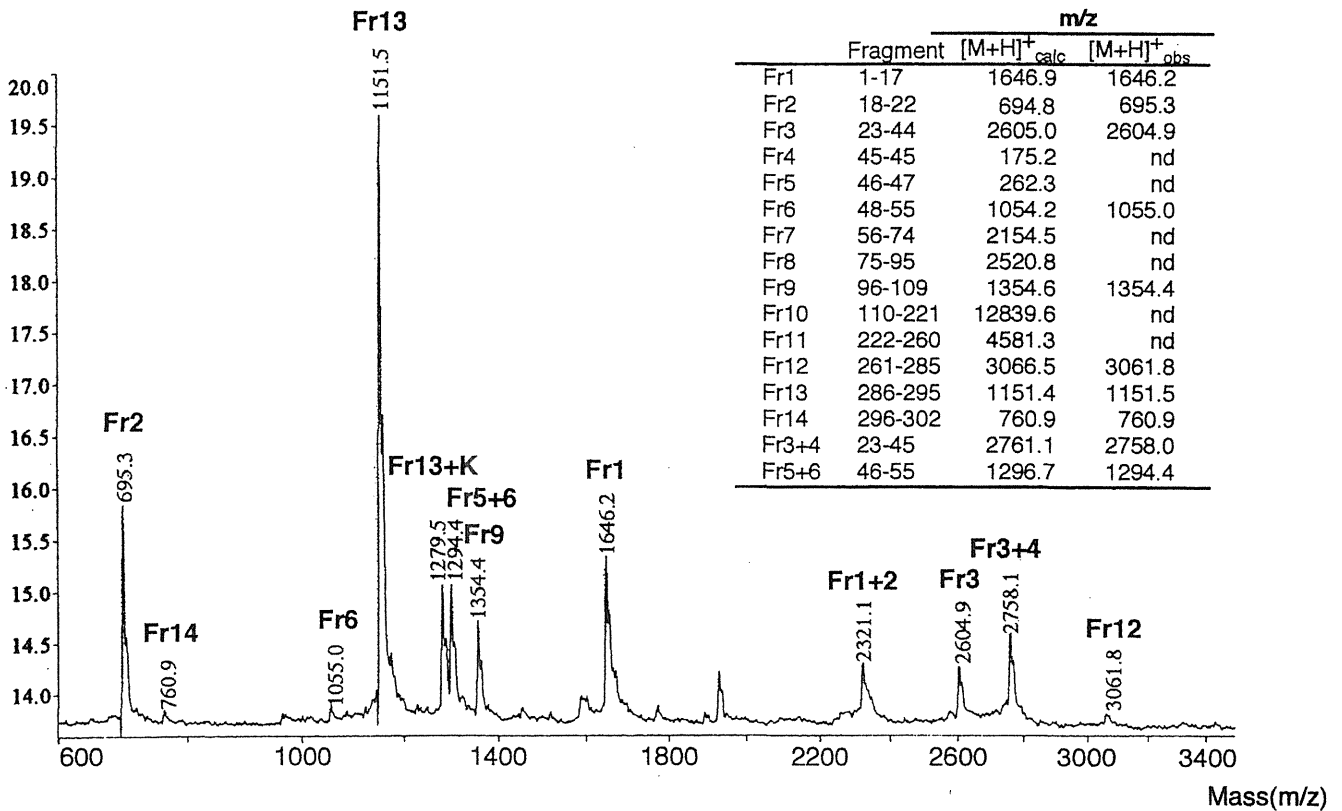


Fig.11 MALDI-TOF-MS spectrum and peak assignment of arginylendopeptidase digests of spermidine synthase

質量1646.2は11番目のアミノ酸をプロリンとして、N末端アセチル化されたペプチドの質量（1646.9, Fr1）と一致した。また、質量760.9は296～302番目のC末端ペプチド（760.9, Fr14）と一致した。

以上，ラットスベルミジン合成酵素のN末端はアセチル化されており，11番目のアミノ酸はマウスのDNA配列からのセリンではなくヒトのDNA配列からのプロリンであり，その他はマウスのアミノ酸配列と一致していると結論できる。

現在，微量タンパクを用いて，セミマイクロHPLC（内径1mmのカラム，流速0.05 mL/min）により分離したペプチドをMALDI-TOF-MSで解析するための方法論を確立すべくさらに検討を続けている。この方法論は，化学修飾されたペプチドの解析に有用であり，微量タンパクの三次元構造を調べるためにも欠かせないと考えている。

2. 活性部位に位置すると思われる遊離SH基の検索

2-1 蛍光性SH標識試薬による酵素の標識

スベルミジン合成酵素は、ジチオスレイトール (DTT) のような還元剤が存在しないと容易に失活したり、市販のいろいろなSH試薬により失活することなどから、SH酵素として知られてきた。このことは本酵素の活性部位に遊離のSH基の存在を想定させるが、それを証明するものではない。本実験ではそのようなSH基が存在するかどうかを調べた。

DTTが存在するとSH試薬が消費されるので、DTT非存在下で酵素をインキュベートしたところ、37°Cでは失活が速やかなため、0°CでSH試薬との反応を行った。SH試薬として、本酵素の競合的阻害剤である4-メチルシクロヘキシルアミンと構造が類似しているp-アミノフェニルメルクリ酢酸 (APMA) を選び、基質 (プトレシンまたはdeAdoMet) 存在下でAPMAによる失活がどのように影響されるかを調べた (Fig. 12)。

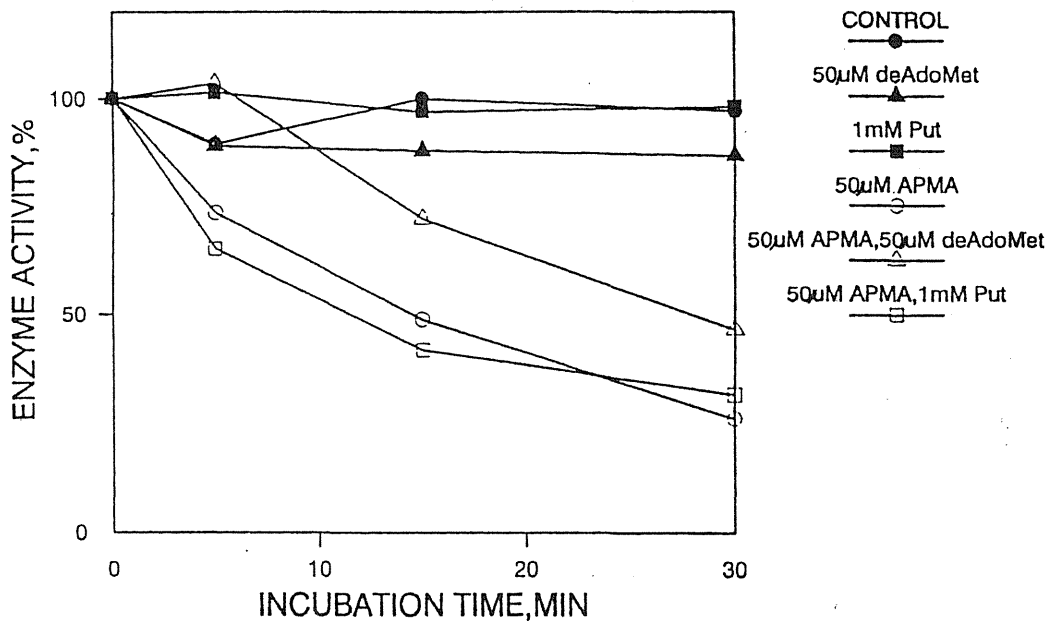


Fig.12 Inhibition of spermidine synthase activity with APMA

その結果、プロレシンが存在してもAPMAによる酵素の失活は抑制されなかったが、deAdoMetが存在すると酵素の失活は明らかに抑制された。これは、酵素の活性部位に存在するdeAdoMet結合部位近辺に、活性に必要なSH基が存在することを暗示した。このようなdeAdoMetの効果は、市販のSH基蛍光標識試薬N-(ヨードアセチルアミノエチル)-5-ナフチルアミン-1-スルホン酸 (IAEDANS) を用いても同様に見られ、deAdoMet非存在下では急速な失活 (Fig. 13) とともに酵素の顕著な蛍光標識化がSDS-PAGEで観察され (Fig. 14), IAEDANS 5~6モル分の分子量の増大がSDS-PAGEから予想された。

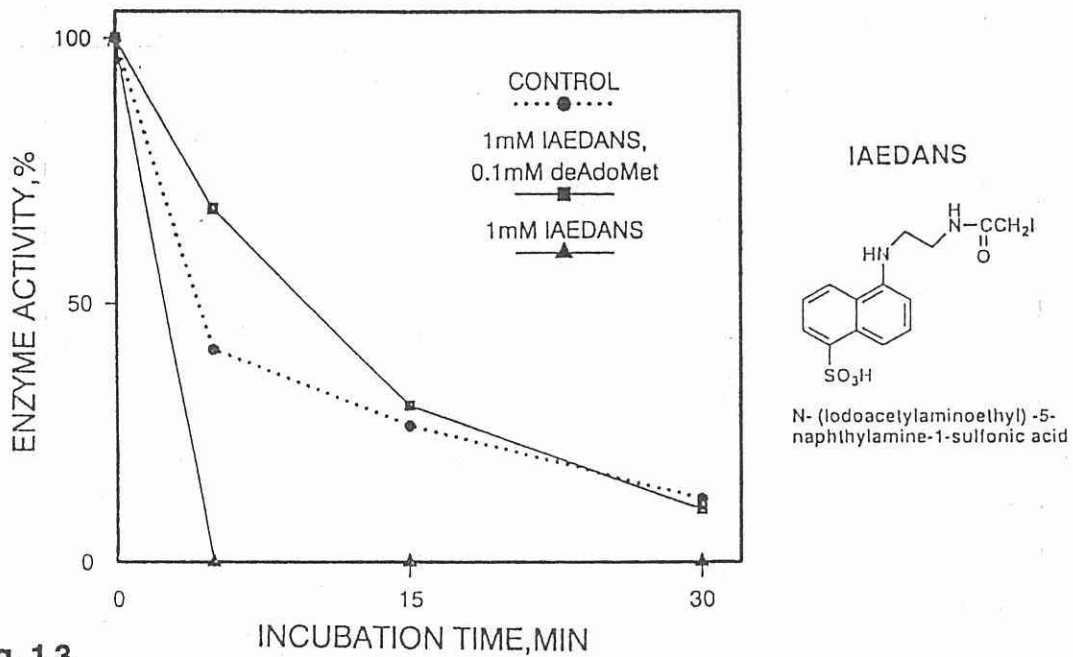


Fig.13

Inhibition of spermidine synthase activity with IAEDANS

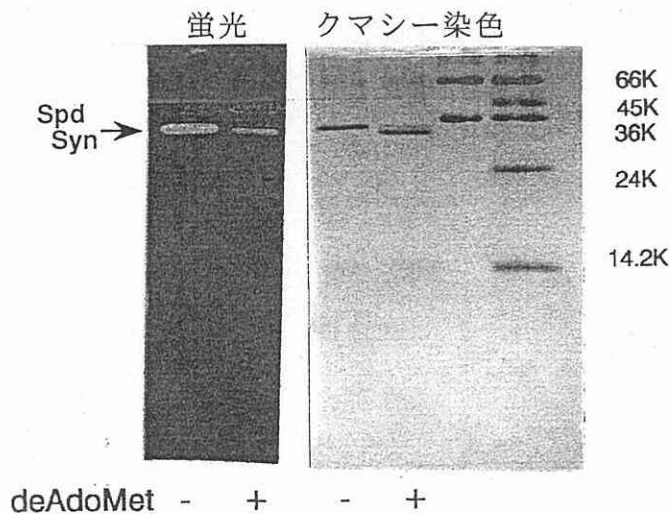
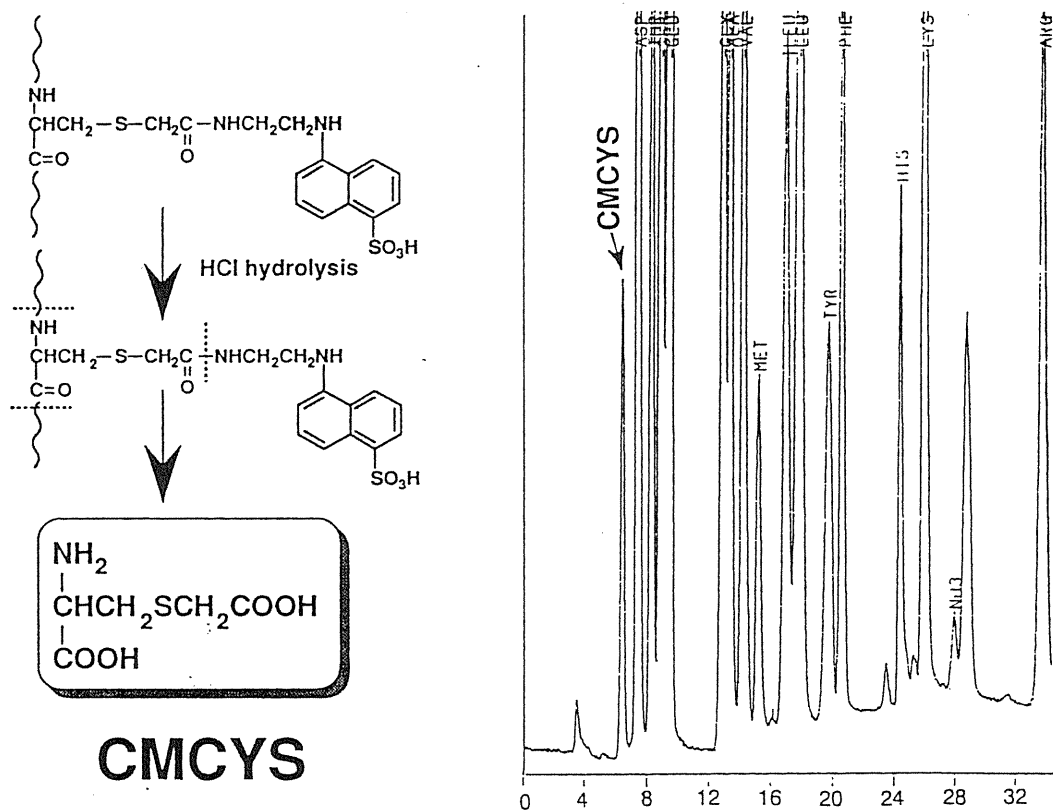


Fig.14 SDS-PAGE of IAEDANS-labeled spermidine synthase

なお、IAEDANSが酵素のSH基と反応したことは、加水分解後のアミノ酸分析により、
 相応する量のカルボキシメチルシステインの生成から確かめられた (Fig. 15)。
 これらの結果は、IAEDANSが本酵素の活性部位近辺に存在すると思われる遊離SH基
 と効率よく反応することを示唆している。



**Fig.15 Amino acid analysis of hydrolyzed
 IAEDANS-labeled spermidase**

2-2 スペルミジン合成酵素のIAEDANS標識システインの検索

IAEDANS標識酵素をリジルエンドペプチダーゼで限定加水分解し、得られた蛍光性ペプチドを逆相HPLCで分離精製した後、気相シーケンサーでアミノ酸配列を調べ、先に示した一次構造に当てはめることとした。Fig. 16には、消化ペプチド断片をカラムにかけて分離し、UVおよび蛍光で同時に検出して得られたクロマトグラムを示す。

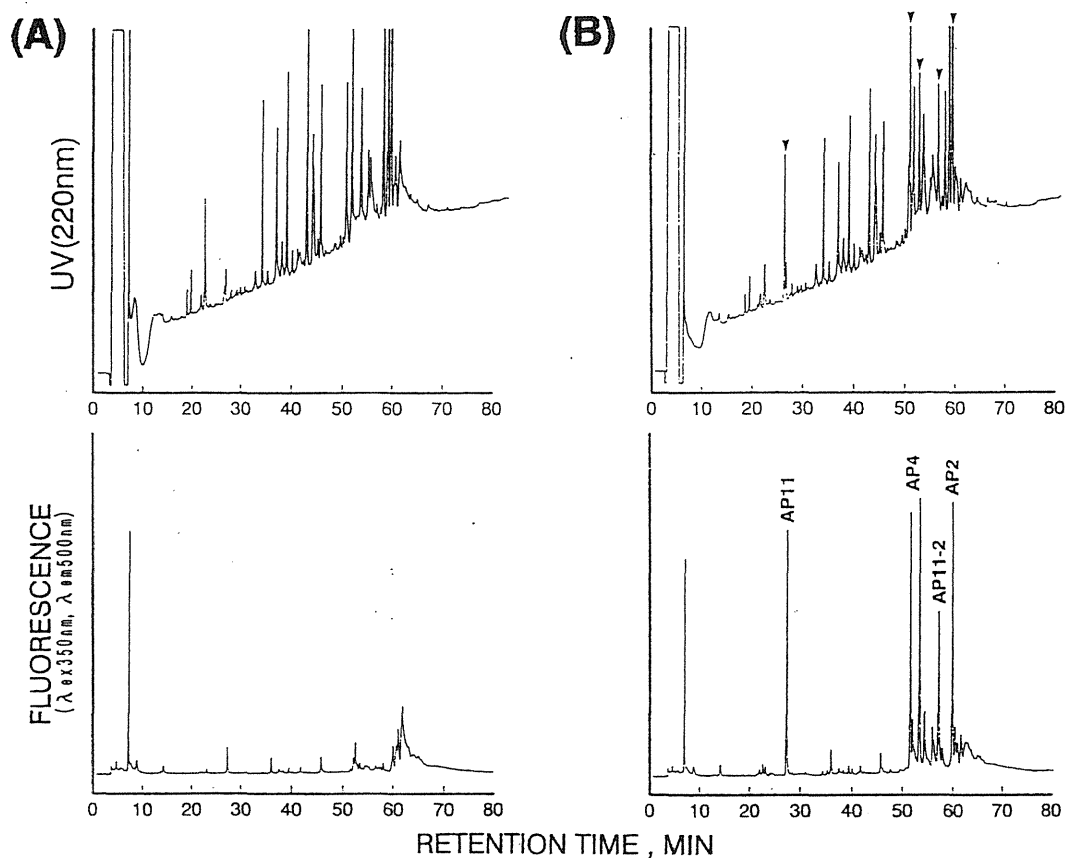


Fig.16

Reversed phase HPLC of lysylendopeptidase-digested peptides of spermidine synthase labeled with IAEDANS in the presence(A) or the absence(B) of deAdoMet

IAEDANS標識時に，deAdoMetが存在する場合(A)では蛍光標識ペプチドはわずかし
か認められず，deAdoMetが存在しない場合(B)との間に明瞭な差が認められた．(B)
で得られた蛍光標識ペプチドを分離精製し，IAEDANS標識システインを調べた結果
を，Fig. 2の中に(↑)で示した．なお，このアミノ酸配列中下線で示した部分は，
アデノシルメチオニンを利用する多くの酵素で見られる共通部分(ヌクレオチド結
合モチーフ)⁶⁾と考えられる．IAEDANS標識ペプチドは，AP2，AP4，AP11，
AP11-2の4断片であることがわかった．AP2とAP11-2の中にはシステイン残基が2個
含まれており，これらが全て標識されたとすれば6個のIAEDANSが結合すること
になる．これは先に述べたSDS-PAGEおよびアミノ酸分析の結果とも符合しており，
活性部位近辺には複数の遊離SH基が存在しているのではないかと思われる．確証を
得るには活性部位の立体構造が解明されなければならない．

3. タンパク質における遊離SH基周辺アミノ酸配列の空間的位置関係を調べるための基礎検討

スベルミジン合成酵素のように、分子量が大きく不安定で少量しか得られないような酵素の活性部位の立体構造を研究するには、X線回折やNMRなどは適用できず、新しい方法論の導入が必要である。そこで、活性部位にSH基が存在するタンパク質について、そのSH基を目安にすれば周辺の立体構造に関する情報が得られるのではないかと考えた。すなわち、分子内にSH基と反応する官能基および光感受性の官能基の両者を同時に有する二機能性試薬を用いて、はじめにタンパク質中のSH基を標識した後、光を当てて近傍のアミノ酸残基とランダムに反応させる。ついで、プロテアーゼで標識タンパク質を消化し、この試薬を介して結合した2つのN末端を持つ架橋ペプチド断片を分析し、既知のアミノ酸配列と照合すれば、SH基と近傍関係にあるアミノ酸がわかるのではないかと考えた (Fig. 17)。

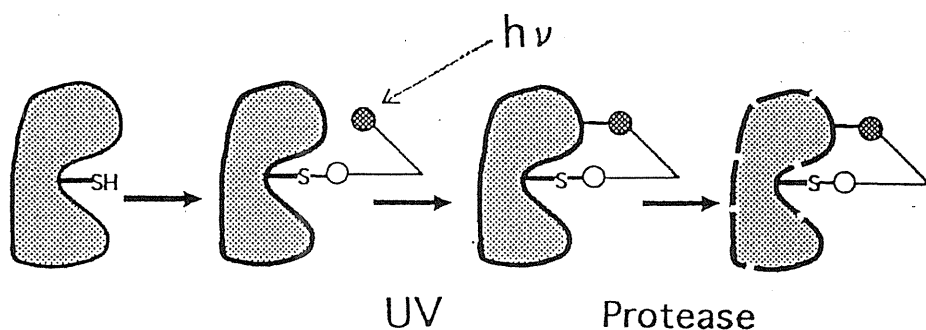


Fig.17

Schematic view for searching amino acid residues located near protein SH group with bifunctional (SH reactive and photoaffinity labeling) reagent

そのような二機能性試薬として、今回は4-アジドヨードアセタミドベンゼン (AIAB) を合成し (Fig. 18) , その性質について若干検討した.

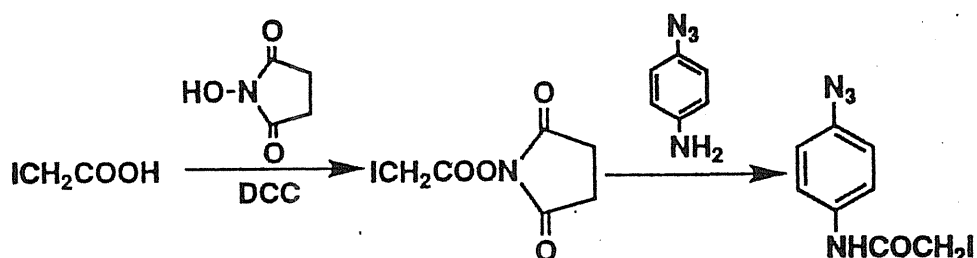


Fig.18 Synthesis of 4-azido-iodoacetamidebenzene(AIAB)

AIABがアジド基を保持したままN-アセチルシステインのSH基と反応することを確認した後、牛血清アルブミン (BSA) 中に存在する1個の遊離SH基とAIABが反応するかどうかを、別途合成した¹⁴C-AIABを用いて検討した。SH試薬 (PCMB) の有無および反応時間を変えて得られた結果をTable 1にまとめた。

Table 1 Labeling of BSA with ¹⁴C-AIAB

REACTION (h)	PCMB	INCORPORATED ¹⁴ C (dpm/mg)	RATIO (AIAB/BSA)
2	-	16,500	1.82
2	+	6,500	0.73
24	-	21,700	2.40
24	+	19,700	2.17

反応時間が長くなると、SH基以外のアミノ酸ともAIABが反応することがわかった。
2時間の反応時間でPCMB存在下で標識された分はSH基以外のアミノ酸との反応と考えられ、PCMB非存在下での標識分からそれを差し引くと、AIAB/BSAがほぼ1となった。これはBSAのSH基の標識分に対応すると考えられた。

文献

- 1) K. Samejima, Y. Nakazawa, and I. Matsunaga, Chem. Pharm. Bull., 26 1480(1978);
K. Samejima, Y. Takeda, M. Nakazawa, M. Okada, and Y. Kyogoku, Chem. Pharm. Bull., 32
3428(1984); M. Niitsu and K. Samejima, Chem. Pharm. Bull., 34 1032(1986)

- 2) K. Samejima and B. Yamanoha, Arch. Biochem. Biophys., 216 213(1982);
K. Samejima, A. Raina, B. Yamanoha, T. Eloranta, Methods in Enzymol., Vol 94,
pp270(1983)

- 3) A. Shirahata, T. Takeshima, and K. Samejima, J. Biochem. 104 717(1988)

- 4) A. Shirahata, T. Morohoshi, M. Fukai, S. Akatsu, and K. Samejima,
Biochem. Pharmacol., 41 205(1990).

- 5) A. E. Pegg, R. Poulin, J. K. Coward, Int. J. Biochem. Cell Biol., 27 425(1995)

- 6) R. M. Kagan and S. Clarke, Arch. Biochem. Biophys., 310 417(1994)

