

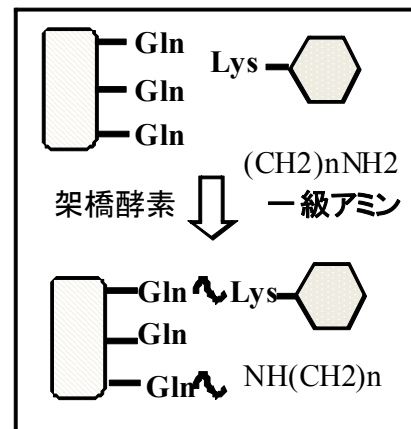
タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼの 高反応性基質配列の解明と活用

名古屋大学・大学院生命農学研究科 人見清隆



我々の体内を含め、生物界には特定のタンパク質どうしを架橋し接着するという現象が存在する。例えば、血液凝固反応の最終段階、皮膚表皮の形成過程では、種々のタンパク質群が不可逆的に架橋され、不溶性や硬度を保てるように変化する。このような架橋反応は、トランスグルタミナーゼと呼ばれる酵素によって行われ、高等動物から植物、微生物まで幅広く存在する。高等動物では上に述べた役割の他にも、細胞死や遺伝子発現の調節にまで多彩な役目を果たしている。また、微生物（放線菌）由来のトランスグルタミナーゼは、食品物性を修飾するため産業利用されており、有用な酵素として注目されている。

トランスグルタミナーゼの反応様式は右図のようである。タンパク質中の特定のグルタミン残基を介して、同種または異種タンパク質のリジン残基との架橋形成を触媒する。また、グルタミン残基への一級アミンの付加や脱アミド化（グルタミン酸へ変換）により、基質タンパク質の電荷を調節することもできる。高等動物ではトランスグルタミナーゼは、8つのアイソザイムが存在し、それぞれが独自の生理機能と組織分布を有する。



ただし、トランスグルタミナーゼは、タンパク質中のグルタミン残基、リジン残基ならどれでも等しく架橋形成を行うのではない。基質として認識されるタンパク質中のグルタミン残基（やリジン残基）の周辺には、酵素が好んで認識する配列や構造の傾向があるとされ、このことが基質としての反応のされやすさを決定づける要素になる。このような情報を得ることは、「どのようなタンパク質がどのアイソザイムにより架橋を受けやすいか」を知るために必須である。しかし本酵素の発見以来50年、そうした知見は明らかではなかった。

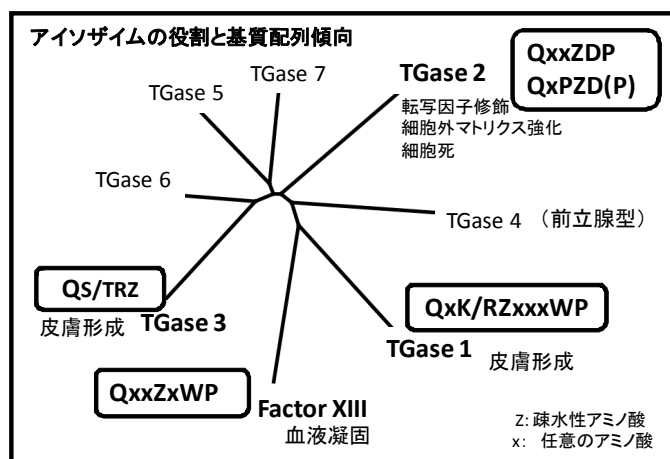
私たちは、基質として好まれる配列（構造）についての情報を一気呵成に得ようと考え、ファージ提示型ランダムペプチドライブラリを用いた基質配列スクリーニング方法を確立し、探索した。その結果、主要なヒトのアイソザイムについて、反応されやすいグルタミン残基の周辺配列の傾向を明らかにした。さらには配列の中から、各々のアイソザイムと特異的に反応できる12残基の高反応性基質配列を同定した。これらはペプチドとしても「最小で至適な基質」であることが示され、天然に存在する基質よりも高い反応性とアイソザイム特異性を有していた。そのためさらに次のような様々な応用展開も行なった。

まず、有用な機能を持つタンパク質（抗体、酵素）に、この配列を遺伝子工学的に融合して発現させた。本来は基質にならないタンパク質でも、「最小基質配列」を融合すれば基質として反応した。これを、一級アミンを有したゲルと酵素反応させると、付加した配列を介してタンパク質が固定化された。これにより、一級アミンさえ有ればどのような固相にも、方向を制御しながら、特定のタ

ンパク質の活性を損なうことなく固定化できる可能性が示された。

また、蛍光標識したペプチドを用い、アイソザイム特異的に組織切片中の活性の存在を可視化することに成功した。皮膚表皮などの組織から凍結切片を作製し、蛍光標識ペプチドを添加して反応させると、活性の存在する部位に高感度に特異的なシグナルを観察できた。さらに、化学標識ペプチドを用いて、従来法よりも簡便・高感度でアイソザイム特異的な酵素活性測定系も確立している。

今後さらに、機能未知なアイソザイムについても基質配列の特徴を探ると共に、これらの「高反応性最小基質配列」の多面的な活用を展開していきたい。



(参考文献)

1. 人見清隆 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 *生化学* 8月号 708 (2009)
2. Hitomi, K. *et al.* A Specific Colorimetric assay for measuring of transglutaminase 1 and factor XIII activities. *Anal. Biochem.* 394, 281 (2009)
3. Hitomi, K. *et al.* Preferred substrate sequences for transglutaminase 2: screening using a phage-displayed peptide library. *Amino Acids* 36, 619 (2009)
4. Alea, M. *et al.*, Development of an isozyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking assay. *Anal. Biochem.* 389, 150 (2009)
5. Hosono M. *et al.*, Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1: development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *FEBS J.* 275, 5667 (2008)
6. Sugimura *et al.*, Identification of the preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 379 (2008)
7. Sugimura Y. *et al.*, Novel site-specific immobilization of functional protein using a preferred substrate sequence for transglutaminase 2. *J. Biotechnol.* 131, 121 (2007)
8. Sugimura Y. *et al.*, Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: Identification of peptide substrates for TGase 2 and Factor XIIIa. *J. Biol. Chem.* 281, 17699 (2006)