

*Rarobacter faecitabidus* の

酵母溶解プロテアーゼに関する研究

下 飯 仁

①

*Rarobacter faecitabidus* の  
酵母溶解プロテアーゼに関する研究

下飯 仁

## 目次

### 第1章 序論

	ページ
1 酵母溶解酵素について	1
(1) 酵母細胞壁の構造	
(2) 酵母溶解酵素	
(3) 酵母溶解酵素に関する現在までの知見	
(4) 本研究のねらい	
2 新規な酵母溶解菌 <i>Rarobacter faecitabidus</i> について の現在までの知見	5
(1) 廃水の酵母処理における酵母溶解菌の発見	
(2) YLM-1型酵母溶解菌の単独培養	
(3) YLM-1型酵母溶解菌の分類学的研究	
(4) <i>Rarobacter faecitabidus</i> の酵母凝集活性及び溶解活性	
3 本研究の概要	8
4 文献	9

## 第2章 *Rarobacter faecitabidus* の酵母溶解酵素の精製

ページ

1 諸言	11
2 実験方法	11
3 結果	14
(1) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる分画	
(2) プロテアーゼの精製	
(3) $\beta$ -1,3-glucanaseの精製	
(4) 酵母溶解活性に対するプロテアーゼと $\beta$ -1,3-glucanase の協奏作用	
(5) 精製酵素の分子量	
(6) 酵素活性に対するpHの影響	
(7) 酵素の熱安定性	
(8) プロテアーゼに対する阻害剤の効果	
(9) 精製酵母溶解酵素で処理した酵母の走査電子顕微鏡による 観察	
4 考察	27
5 要約	31
6 文献	32



### 第3章 *Rarobacter faecitabidus* の酵母溶解プロテアーゼの性質

ページ

1 諸言	33
2 実験方法	33
3 結果	36
(1) N末端アミノ酸配列	
(2) アミノ酸エステルに対する特異性	
(3) RPIのエラスターゼ活性	
(4) 酸化インスリンB鎖の加水分解パターン	
(5) RPIの酵母細胞に対する吸着	
(6) RPIのmannose-agaroseに対するアフィニティー	
(7) 単糖によるRPIの酵母溶解活性の阻害	
4 考察	45
5 要約	48
6 文献	49

## 第4章 RPIの一次構造と機能

	ページ
1 諸言	51
2 実験方法	51
3 結果	56
(1) RPI遺伝子のクローニング	
(2) RPI遺伝子の塩基配列	
(3) RPI前駆体のアミノ酸配列	
(4) 他のタンパク質とのアミノ酸配列のホモロジー	
(5) 大腸菌でのRPI遺伝子の発現	
(6) 大腸菌で発現したRPIの解析	
(7) C末端ドメインの機能の解析	
4 考察	72
5 要約	77
6 文献	78

	ページ
論文の要旨	81
発表論文	87
謝辞	88

## 第1章 序論

### 1 酵母溶解酵素について

#### (1) 酵母細胞壁の構造

酵母細胞は、通常、細胞壁と呼ばれる機械的に強固な構造物によってその形態を保っている<sup>1)</sup>。細胞壁は細胞内外の浸透圧に耐え細胞内の環境を保護しているだけでなく、その中に種々の機能的タンパク質を含んでおり、細胞外の情報を内部に伝えるインターフェースや化学反応のコンパートメンテーションの場を提供している。分類学的に酵母は子囊菌系酵母と担子菌系酵母に分けることができる<sup>2)</sup>。両者は形態的には類似していても、まったく異なる系統に属しているものと考えられており、細胞壁構造も大きく異なっている。子囊菌系酵母のなかで最もよく知られている *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類及びパンの製造に広く使われている産業上重要な酵母であるほか、分子遺伝学的な取扱いが容易なことから真核生物のモデルとして研究が進められている。

*S. cerevisiae* の細胞壁<sup>1)</sup>は主としてグルカン、マンナンタンパク質、キチンからなっている。グルカンは $\beta$ -1、6-結合の側鎖を持った $\beta$ -1, 3-グルカンから構成されており、細胞壁に剛性を与えている。マンナンタンパク質はN結合糖鎖及びO結合糖鎖を持った糖タンパクであり、酵母の最外層を構成している。N結合糖鎖はアスパラギン残基に結合したハイマンノース型のコア糖鎖に、他の高等真核生物には見られない外鎖と呼ばれるマンノース残基の繰り返し配列が繋がった構造をしている。その結果、N結合糖鎖のマンノース残基数は数百に及んでいる。O結合糖鎖はスレオニン、セリンに1~4個のオリゴマンノースが結合したものである。マンナンタンパクのタンパク部分については、まだ、不明な点が多い。キチンは主として出芽痕にリング状に存在してい

るが、その生理的意義についてはいろいろの議論がある。

## (2) 酵母溶解酵素の利用

*S. cerevisiae*の細胞壁を溶解する酵素は、酵母から細胞壁を取り除いたプロトプラストを調製するための手段として古くから研究されてきた<sup>45)</sup>。現在では、プロトプラストの作製は細胞融合や形質転換などのバイオテクノロジーの分野で広く利用されている重要な技術である。また、強固な細胞壁を分解することは、酵母細胞内のタンパク質や核酸を温和な手段で分離調製する方法としても大変重要である。酵母溶解酵素は種々の生物から分離されている。歴史的には、かたつむりの消化管の抽出液が古くから用いられてきたが、その後、微生物、特に細菌由来の酵素が多数報告されており、市販されているものも多い。酵母溶解酵素は通常多くの加水分解酵素の混合物であるが、多くの場合、 $\beta$ -1, 3-グルカナーゼとプロテアーゼが溶菌に関与していることが知られている。ある種の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼは単独で酵母を溶解することが知られているが<sup>36)</sup>、他の多くの $\beta$ -1, 3-グルカナーゼは単独では酵母を溶解せず、チオール化合物やプロテアーゼによる前処理が必要である。試薬としてよく用いられる酵母溶解酵素であるザイモリエースは $\beta$ -1, 3-グルカナーゼとプロテアーゼの混合物であり、それぞれ単独では溶解活性を示さず、両者を併用してはじめて酵母溶解活性を示す。一方、単独または $\beta$ -1, 3-グルカナーゼとの併用で酵母を溶解するプロテアーゼが分離されており、特に、*Oerskovia xanthinolytica*由来のプロテアーゼについて詳細な研究が行われている。

## (3) 酵母溶解酵素に関する現在までの知見

酵母溶解酵素に関してはこれまでに多くの研究があるが、その構造と作用機作に関する研究はそれほど多くない。Obataら<sup>89)</sup>は*Oerskovia* sp.の



生産する酵母溶解酵素について検討し、酵母溶解には1種類のプロテアーゼと2種類の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼが関与していることを明らかにした。このプロテアーゼは単独で酵母溶解活性を示した。また、セファデックスゲルには吸着するがバイオゲルPには吸着しないことから糖へのアフィニティーを持っていることがわかった。本酵素は自己消化によってプロテアーゼ活性は変化しないが、酵母溶解活性を失う。自己消化タンパク質はセファデックスへの吸着性を失っていることから、糖類への吸着性が酵母溶解活性の発現に関与していることを考察した。これは、プロテアーゼが酵母溶解に直接関与していることが示された最初の例であり、他のプロテアーゼが酵母溶解活性を持たないことを考え合わせると、酵母溶解プロテアーゼの特異性に興味を持たれることとなった。2種類の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼはいずれも単独では酵母溶解活性を持たず、プロテアーゼと併用することで相乗的な酵母溶解活性を示した。これらの結果から、グルカン層の外側をマンナンタンパク質がおおっており、マンナンタンパク質の一部はグルカン層に達していることが示唆された。

ザイモリエースは*Arthrobacter luteus*が生産する酵母溶解酵素で、当初、 $\beta$ -1, 3-グルカナーゼのみからなると考えられていた<sup>10</sup>。その後再同定の結果、本菌は*Oerskovia xanthineolytica*であることが明らかになった。Scottら<sup>11</sup>は溶菌酵素について再検討を加え、1種類のプロテアーゼと1種類の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼが溶菌に関与していることを示した。プロテアーゼはセファデックス吸着性があり、そのプロテアーゼ活性は酵母マンナンによって阻害された。その後、市販ザイモリエース中の酵母溶解酵素についても、Kitamura<sup>12,13</sup>が検討し、同様に、プロテアーゼと $\beta$ -1, 3-グルカナーゼが関与していることを示した。現在では、Obataらの研究した菌と、Scottら、Kitamuraが研究した菌はきわめて近縁の菌であると考えられている。



単独で酵母を溶解する $\beta$ -1, 3-グルカナーゼとして*Flavobacterium domitator*由来のものがよく研究されている<sup>14)</sup>。本菌の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼには数種類あるが、そのうちの2種類に酵母溶解活性が認められている。2種類の酵素は、一方がグルコース、ラミナリビオース、ラミナリトリオースなどの低級オリゴ糖を生成し、一方はラミナリペンタオース以上の高級オリゴ糖を生成することから、別の構造の酵素であると考えられている。これらの酵素をプロテアーゼ処理すると、酵母溶解活性は失われるが、グルカナーゼ活性は維持される。プロテアーゼ処理酵素は基質である多糖類との吸着性に変化がみられたことから、多糖類への吸着に関与するドメインが酵母溶解活性にも重要な働きをしていることが示唆された。

最近、遺伝子組換技術の進歩によってタンパク質の一次構造をDNAから容易に決定できるようになってきた。多くの酵素の一次構造が決定され、遺伝子の塩基配列を改変しアミノ酸を変化させることによってタンパク質の機能部位についても検討することができるようになってきた。Shenら<sup>15)</sup>は、*O. xanthineolytica*の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列を報告している。C末端側に特有の反復配列が存在することから、その部分と溶菌活性との関係を検討した。このC末端部分を欠失または改変したタンパク質はグルカナーゼ活性は保持しているが、酵母溶解活性を失っていることがわかった。この結果は*F. domitator*の結果とも類似しており、C末端部分が酵母への吸着に必要であることを示唆している。酵母溶解プロテアーゼについてその一次構造が明らかになった例はまだない。

#### (4) 本研究のねらい

以上述べたように酵母溶解プロテアーゼは酵母細胞壁の溶解に重大な役割を果たしていると考えられる。また、酵母溶解プロテアーゼは今ま

で知られているプロテアーゼとはいろいろな点で異なっている特異なプロテアーゼであると考えられる。プロテアーゼの作用を論じる場合には、基質特異性と一次構造がまず問題となる。しかしながら、これまでの研究では、酵母溶解プロテアーゼがきわめて特異なプロテアーゼであることを示唆しながらも、具体的な基質特異性及び一次構造について論じた報告はいままでなかった。本研究では、われわれの研究室で分離された新規な酵母溶解酵素*Rarobacter faecitabidus*の酵母溶解酵素のうち特に、酵母溶解プロテアーゼの作用機作と構造について考察を加えた。

## 2 新規な酵母溶解菌*Rarobacter faecitabidus*についての現在までの知見

### (1) 廃水の酵母処理における酵母溶解菌の発見

吉沢<sup>16)</sup>は清酒製造場などから排出される高濃度の有機物を含む廃水を酵母によって一次処理した後、活性汚泥処理することで、高負荷に耐えるとともに、付加変動に強い廃水処理法を開発した。本処理法の一次処理で増殖した酵母が活性汚泥槽でどのように消長するのかを検討した結果、活性汚泥槽から酵母生菌体を含む軟寒天培地で溶菌班を形成する酵母溶解菌YLM-1が検出された<sup>17)</sup>。YLM-1は通常の栄養培地に増殖せず、酵母処理で使用されている*Hansenula anomala*生菌体と活性汚泥抽出液を含む液体培地では、酵母に付着してこれを凝集した後、溶菌して増殖した。その後、YLM-1と同様に通常の栄養培地に増殖せず、酵母菌体と凝集しこれを溶解するYLM-1型菌が多数分離されている<sup>18)</sup>。酵母処理と活性汚泥処理を組み合わせた廃水処理システムのメリットのひとつに、余剰汚泥が少ない点があげられている。この廃水処理システムではYLM-1が酵母を溶解し、YLM-1は活性汚泥中の原生動物等に補食される。酵母-酵母溶解菌-原生動物等の3段階の食物連鎖が組み合わされているため、通常の活性汚泥処理よりも余剰汚泥が少ないものと考えられた<sup>19)</sup>。

## (2) YLM-1型酵母溶解菌の単独培養

YLM-1型酵母溶解菌は通常の栄養培地では生育しないが、これに酵母生菌体の抽出液を添加すると生育を示した。酵母生菌体抽出液をオートクレーブ処理するとその活性は失われ、増殖促進活性は分子量10,000以上の画分に存在することから、YLM-1の増殖促進物質は酵母由来のタンパク質ではないかと推定された。種々の物質や酵素を栄養培地に添加して、増殖促進活性を示す物質を検索した結果、カタラーゼやペルオキシダーゼの添加で栄養培地に生育するようになることがわかった<sup>20)</sup>。YLM-1型酵母溶解菌は酵母生菌体を溶解して、酵母のカタラーゼ・ペルオキシダーゼを利用するとともに栄養源としても利用して生育するものと考えられた。

## (3) YLM-1型酵母溶解菌の分類学的研究

YLM-1型酵母溶解菌の分類学的諸性質を検討したところ、本菌はコリネ型細菌に属していることがわかったが、既報のいずれの属にも該当するものがなかった。染色体DNAのハイブリダイゼーション実験の結果から、既存の菌とは相同性を示さないが、お互い同士では高い相同性を示すグループの存在が明かとなり、これらの菌に新属新種の*Rarobacter faecitabidus*という学名が提唱された<sup>21)</sup>。*R. faecitabidus*はグラム陽性の桿菌で周鞭毛を持ち運動性があり、DNAのGC含量は65.7~66.1%である。細胞壁のジアミノ酸はL-オルニチンであり、アシルタイプはアセチルである。細胞の主要な脂肪酸はアンテイスC 15であり、主要なイソプレノイドキノンMK-9である。現在では、*Rarobacter*は土壤中に広く分布していることが知られている。

## (4) *Rarobacter faecitabidus*の酵母凝集活性及び溶解活性

*R. faecitabidus*は子囊菌系酵母である*Saccharomyces*、*Pichia*、

*Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida*等に属する酵母生菌体を含む液体培地で、酵母と凝集し、これを溶解して増殖した。一方、子囊菌系酵母のうち *Schizosaccharomyces*, *Candida tropicalis*は *Rarobacter*と凝集するが溶菌されず、担子菌系酵母である *Cryptococcus albidus*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula pallida*等の酵母は *Rarobacter*によって凝集も溶菌もされなかった<sup>17)</sup>。

*R. faecitabidus*と酵母との接着・凝集は可逆的で、両者の菌液を混合すると1分以内に接着が平行状態になり、これを希釈すると約1時間で分離が平衡状態になった。*R. faecitabidus*と酵母の接着・凝集反応は、D-マンノース、D-フラクトース、マンナン等によって阻害され、*R. faecitabidus*はこれらの糖に共通な水酸基の配位を認識しているものと推定された。また、*R. faecitabidus*の酵母との接着・凝集能は、*R. faecitabidus*菌体をバブインで処理すると失われることから、*R. faecitabidus*は菌体表面に酵母のマンナンを認識するレセプターの働きをする構造を持っているものと推定された。

*R. faecitabidus*は酵母軟寒天培地で溶菌斑を形成することから、酵母細胞壁を溶解する酵素を分泌していると考えられる。*R. faecitabidus*を生酵母を含む液体培地で培養した後の遠心上清を限外ろ過膜で濃縮したところ、わずかに溶菌活性が検出され、溶菌活性はdithiothreitolの添加で増強された。培養上清にはラミナリナーゼ活性とマンナナーゼ活性が検出されたが、*R. faecitabidus*の細胞壁画分にも両酵素活性が検出された。*R. faecitabidus*は酵母菌体と接着・凝集し最小限の溶菌酵素を分泌するか、または、菌体表面上の溶菌酵素で酵母を溶解しているのではないかと推定された<sup>22)</sup>。



### 3 本研究の概要

酵母生菌体を含む培地では精製するのに十分な量の酵母溶解酵素を得ることができなかったが、カタラーゼ添加培地では多量の溶菌酵素を培地中に分泌した。*R. faecitabidus*の生産する酵母溶解酵素を精製した結果、1種類の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼと2種類のプロテアーゼが溶菌に関連していることがわかった。プロテアーゼはどちらも単独で酵母を溶解したが、 $\beta$ -1, 3-グルカナーゼは単独では溶菌活性は無く、プロテアーゼを共存させることで酵母を完全に溶解した。

酵母溶解プロテアーゼの作用機作を解明するために、主要な酵母溶解プロテアーゼである*Rarobacter protease I* (RPI)の性質を調べた。その結果、本酵素はエラスターゼ類似の特異な基質特異性を持っており、さらに、レクチン様のマンノース結合活性を持っていた。プロテアーゼが酵母溶解活性を持つためにはこれらの性質が必要であると推定された。

RPIの構造と機能をさらに検討するために、構造遺伝子のクローニングを行い塩基配列を決定した。推定されるアミノ酸配列の解析から、本酵素は、プレプロ部分、トリプシン-キモトリプシン系に属するセリンプロテアーゼドメイン、C末端側にマンノース結合ドメインから成ることが推察された。RPI遺伝子を*E. coli*の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターの支配下で発現させ、その後部位指定突然変異によってC末端側を欠失した変異株を作成したところ、変異酵素は、プロテアーゼ活性は保持しているものの、マンノース結合能及び酵母溶解活性を失っていた。このことは、RPIのC末端側が実際にマンノース結合と酵母溶解活性に必要であることを示している。本研究によって、レクチン様の糖結合活性を持つ特異なプロテアーゼが酵母細胞壁の溶解に関与していることがわかった。RPIがプロテアーゼと糖結合タンパク質というまったく異なる物質にアフィニティーを持つタンパク質のキメラであることは、系統進化の観点から考えると興味深い。

#### 4 文献

1. Ballou, C.E. (1982) in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression* (Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R., eds.) pp.335-360, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
2. Peberdy, J.F. (1990) in *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W. and Copping, L.G., eds.) pp.5-30, Springer-Verlag, Berlin
3. 中瀬 崇 (1989) *化学と生物* **27**, 332-339
4. Phaff, H.J. (1977) *Adv. Chem. Ser.* **160**, 244-282
5. Farkas, V. (1990) *Acta Biotechnol.* **10**, 225-238
6. Nagasaki, S., Nishioka, Y., Mori, H., and Yamamoto, S. (1976) *Agric. Biol. Chem.* **40**, 1059-1067
7. Nagasaki, S., Mori, H., and Yamamoto, S. (1981) *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2689-2694
8. Obata, T., Fujioka, K., Hara, S., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 671-677
9. Obata, T., Iwata, H., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2387-2394.
10. Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y. (1974) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**, 323-344
11. Scott, J.H., and Schekman, R. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 414-423
12. Kitamura, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 963-969
13. Kitamura, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2093-2099
14. 永田信治 (1990) *醱酵工学* **68**, 512
15. Shen, S.H., Chretien, P., Bastien L., and Slilaty S.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1058-1063
16. 吉沢淑 (1981) *農化* **55**, 705-711



17. 蓮尾徹夫、山本奈美、齋藤和夫、蓼沼誠 (1984) *醸協* **79**, 510-516
18. 山本奈美、蓮尾徹夫、寺内敬博、齋藤和夫、蓼沼誠 (1984) *醸協* **79**, 828-833
19. 蓮尾徹夫、伊藤雅代、山本奈美、齋藤和夫、蓼沼誠、吉沢淑 (1984) *醸協* **79**, 904-905
20. Yamamoto, N., Hasuo, T., Saito, K., and Tadenuma, M. (1987) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1541-1545
21. Yamamoto, N., Sato, S., Saito, K., Hasuo, T., Tadenuma, M., Suzuki, K., Tamaoka, J., and Komagata, K. (1988) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 7-11
22. Saito, K., Hasuo, T., Yamamoto, N., and Tadenuma, M. (1988) *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1849-1850

## 第2章 *Rarobacter faecitabidus* の酵母溶解酵素の精製

### 1 諸言

*R. faecitabidus* は、生酵母を炭素源とする培地では酵素精製に十分な量の酵母溶解酵素を生産しなかったが<sup>1)</sup>、カタラーゼ<sup>2)</sup>を添加した栄養培地で培養することで、多量の酵母溶解酵素を培地中に生産するようになった。*R. faecitabidus* の酵母溶解作用を解明するために、まず、酵母溶解酵素の精製を試みた。酵母の溶解には多くの場合、プロテアーゼと $\beta$ -1,3-glucanaseが関与していることが知られている。また、予備的な実験によって、PMSFなどのセリンプロテアーゼ阻害剤が酵母溶解活性を阻害することがわかったので、プロテアーゼと $\beta$ -1,3-glucanaseに重点をおいて酵母溶解酵素を検索した。

### 2 実験方法

#### (1) 使用した微生物と培養条件

酵母溶解酵素の生産には*Rarobacter faecitabidus* YLM-50を使用した。菌体の培養及び保存にはTYMC培地(培地1リットルあたり、trypticase peptone (BBL) 5 g, yeast extract (Difco) 3 g, malt extract (Difco) 3 g,  $K_2HPO_4$  5.8 g,  $NH_4H_2PO_4$  1.15 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.264 g, catalase (Sigma) 0.12 g)を使用した。寒天培地の場合には、2%の寒天を添加した。酵母溶解活性の測定のための基質としては、*Saccharomyces cerevisiae* IFO2043を使用した。酵母の培養は、YPD培地(1% yeast extract, 2% Difco peptone, 2% glucose)に1白金耳の酵母を接種し、30℃、24時間静置培養した。菌体は遠心して集菌した後、蒸留水で3回洗浄し、0.05%  $NaN_3$ に懸濁した。

## (2) 粗酵素液の調製

TYMC培地 (500 ml 3角フラスコに250 ml入れる) に2.5 mlの2日培養のYLM-50培養液を添加し、30℃、100 rpmで30時間振盪培養した。培養液を4℃、10,000 g、10 minの遠心で集菌し、上清に終濃度0.1%のpolyethylenimineを添加し、不溶物を4℃、10,000 g、10 minの遠心で除いた。上清を60%飽和の硫酸で塩析し、析出したタンパク質を4℃、10,000 g、10 minの遠心で集めた。沈澱は50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 10% glycerol に溶解し、同じ緩衝液に対して透析した。

## (3) 酵母溶解活性の測定

1 mlの反応液は50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, 0.6 M sorbitol、酵素液及び酵母(660 nmの吸光度が2.1) を含む。30℃で1時間反応させた後に、蒸留水2 mlを加えて浸透圧感受性の酵母を破壊し、660 nmの吸光度を測定した。1単位の酵母溶解活性は、1時間に1吸光度減少させる酵素量と定義した。

## (4) プロテアーゼ活性の測定

0.5 mlの反応液は250 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, azocasein (Sigma) 10 mg, 0.05% NaN<sub>3</sub> と酵素液を含む。30℃で6時間反応させた後に、氷冷した10% trichloroacetic acid 0.5mlを加えて反応を停止した。生じた沈澱を15,000回転5分の遠心で除き、上清の吸光度を400 nmで測定した。1単位のプロテアーゼ活性は、1時間に吸光度を1増加させる酵素量と定義した。

## (5) $\beta$ -1,3-glucanase活性の測定

0.5 mlの反応液は50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, laminarin 2 mg (Sigma) と酵素液を含む。30℃で20分間反応させた後に、生じた還元糖

をSomogyi<sup>3)</sup>の方法で測定した。1単位の $\beta$ -1,3-glucanase活性は、1分間にブドウ糖として1 $\mu$ モルの還元糖を遊離させる酵素量と定義した。

#### (6) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

酵素の均一性は、未変性のポリアクリルアミドゲル電気泳動で検定した。プロテアーゼの電気泳動はReisfeld<sup>4)</sup>の方法で、 $\beta$ -1,3-glucanaseの電気泳動はDavis<sup>5)</sup>の方法で行った。

#### (7) 精製酵素の分子量の測定

精製酵素の分子量はLaemmli<sup>6)</sup>法のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって推定した。用いた分子量マーカーは、phosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100),  $\alpha$ -lactalbumin (14,400)である。

#### (8) タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は、bovine serum albuminを標準としてLowry法<sup>7)</sup>で行った。

#### (9) プロテアーゼと $\beta$ -1,3-glucanaseの酵母溶解に対する協奏効果

酵素処理後の酵母の総数は顕微鏡下で計数した。生細胞数はYPD寒天培地(YPD培地に2%寒天を添加)上で30℃2日間培養後のコロニー形成数で推定した。

#### (10) 走査電子顕微鏡写真

精製プロテアーゼまたは $\beta$ -1,3-glucanaseで酵母を処理した後、固定、脱水、金蒸着し、走査電子顕微鏡(日立製作所S2000)で観察した。

### 3 結果

#### (1) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる分画

実験方法のように調製した粗酵素液は、まず、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分画した (TSKgel SP-5PW 21.5 mm i.d. x 15 cm, Tosoh)。カラムは50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 10% glycerol (buffer A)で平衡化しておき、試料添加後同じバッファーで非吸着物質を洗浄した。Fig.1に示したように非吸着画分には $\beta$ -1,3-glucanaseが含まれていたが、単独ではほとんど酵母溶解活性を示さなかった。活性フラクションを集めて濃縮 (Immersible CX-10, Millipore) し、 $\beta$ -1,3-glucanaseの精製に使用した。吸着画分は、同じbufferで硫酸ナトリウムの濃度を0から0.5 Mまで直線的に変化させて溶出した。図に示したように酵母溶解活性はふたつのピークに分離し、そのどちらにもプロテアーゼ活性が重なっていた。高イオン強度で溶出する活性画分をprotease I、低イオン強度で溶出する画分をprotease IIとして合併し濃縮した。

#### (2) プロテアーゼの精製

プロテアーゼ活性を伴うふたつの酵母溶解活性画分は、それぞれ、ゲルろ過によって精製した。酵母溶解活性画分を0.1 M sodium phosphate, pH 7.0, 10% glycerol (buffer C)で平衡化したTSKgel G3000SW (21.5 mm i.d. X 60 cm, Tosoh)に添加し、同じbufferで溶出した。Fig.2Aに示したように、protease I画分はカラム担体に吸着性を示し、カラム容量の約2倍の溶出液ではじめて溶出された。ここでも、酵母溶解活性画分にはプロテアーゼ活性が伴っていた。この画分は単一のタンパク質を含んでいたの、濃縮し、精製protease Iとして凍結保存した。protease II画分についても同様にゲルろ過を行ったところ、Fig.2Bに示したようにプロテアーゼ活性はふたつのピークに分離し、遅れて溶出するピークに酵母溶解活性



があった。この画分も単一だったので、濃縮し、精製protease IIとして冷凍保存した。酵母溶解活性を伴わないプロテアーゼはprotease IIIとした。ふたつの酵母溶解プロテアーゼの精製結果の典型的な事例をTable Iにまとめた。酵母溶解活性は、protease Iにおいては収率0.52%で28.8倍に、protease IIIは0.27%の収率で34.1倍に精製された。精製protease I及びprotease IIはどちらも未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドを示した(Fig.4.A,B)。

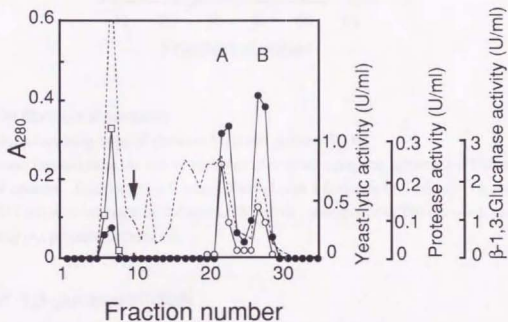


Fig. 1 Cation exchange chromatography of crude enzyme.

The crude enzyme after salting out was applied to a TSKgel SP-5PW column. Fractions (6 ml) were collected with a flow rate of 2 ml/min. A gradient elution was started at the point indicated by the arrow. A and B denote protease II and I fractions respectively. Symbols: absorbance at 280 nm (---), yeast-lytic activity (●), protease activity (○), β-1,3-glucanase activity (□).



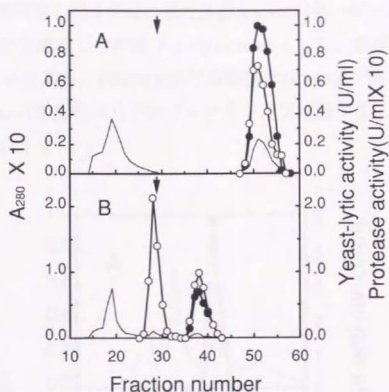


Fig. 2 Gel filtration of proteases.

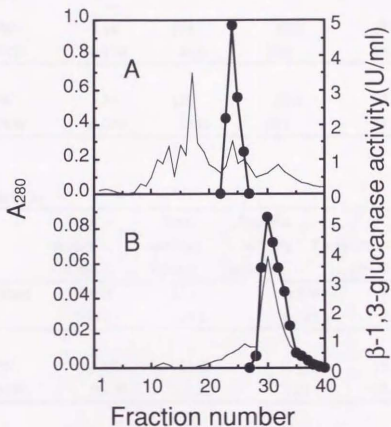
Gel filtration chromatography of protease I (A) and protease II (B).

Each protease fraction from the cation exchange chromatography was applied to a TSKgel G3000SW column. Fractions (8 ml) were collected with a flow rate of 2 ml/min. A column volume (217 ml) was indicated by the arrow. Symbols ; absorbance at 280 nm (—), yeast-lytic activity (●), protease activity (○).

### (3) $\beta$ -1,3-glucanaseの精製

陽イオン交換クロマトグラフィーでの非吸着部分は、20 mM Tris-HCl, pH 7.5 (buffer D)で透析した後、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム (SynChropak AX300, 4.1 mm i.d. X 25 cm, SynChrom, Inc.)に添加した。カラムはbuffer Dで洗浄した後、同緩衝液における0から0.5 Mの酢酸ナトリウムの直線グラジエントで溶出した。Fig.3Aに示したように、単一の $\beta$ -1,3-glucanaseピークが検出されたが、この画分には酵母溶解活性は認められなかった。活性画分を濃縮して、buffer Cで平衡化した TSKgel G3000SW (21.5 mm i.d. X 60 cm, Tosoh)に添加し、同じbufferで溶

出した。Fig.3Bに示したように、 $\beta$ -1,3-glucanaseの単一ピークがえられたのでこの画分を濃縮して精製 $\beta$ -1,3-glucanaseとした。精製の過程はTable IIにまとめてある。収率は10%で精製倍率は74.8倍であった。精製 $\beta$ -1,3-glucanaseは未変性ポリアクリルアミド電気泳動で単一のバンドを示した (Fig. 4 C)。



**Fig. 3 Purification of  $\beta$ -1,3-glucanase**

A. Anion exchange chromatography. The unadsorbed fraction from the cation exchange chromatography was applied to a SynChropak AX300 column equilibrated with buffer D. Fractions (4 ml) were collected with a flow rate of 2 ml/min. A gradient elution was started from fraction number one.

B. Gel filtration chromatography. Active fractions from the anion exchange chromatography were applied to a TSKgel G3000SW column. Fractions (4 ml) were collected with a flow rate of 2 ml/min.

Symbols ; absorbance at 280 nm (—),  $\beta$ -1,3-glucanase activity (●).

TABLE I Purification of yeast-lytic proteases

(A) Yeast-lytic activity

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	996.8	8520	8.5	1	100
Salting out	100.9	4920	48.8	5.7	57.7
Protease I					
TSKgel SP-5PW	3.18	194	61.0	7.1	2.28
TSKgel G3000SW	0.179	44.0	246	28.8	0.52
Protease II					
TSKgel SP-5PW	5.36	128	23.9	2.8	1.50
TSKgel G3000SW	0.079	23.0	291	34.1	0.27

(B) Protease activity

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	996.8	273	0.274	1	100
Salting out	100.9	75.2	0.745	2.7	27.6
Protease I					
TSKgel SP-5PW	3.18	13.3	4.19	15.3	4.89
TSKgel G3000SW	0.179	1.65	9.21	33.6	0.61
Protease II					
TSKgel SP-5PW	5.36	17.7	3.30	12.0	6.50
TSKgel G3000SW	0.079	1.56	19.7	71.9	0.57

TABLE II Purification of  $\beta$ -1,3-glucanase

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	996.8	756	0.76	1	100
Salting out	100.9	745	7.39	9.7	98.5
TSKgel SP-5PW	58.5	456	7.79	10.3	60.3
SynChropak AX300	3.06	128	42.0	55.4	17.0
TSKgel G3000SW	1.36	77.3	56.8	74.8	10.2

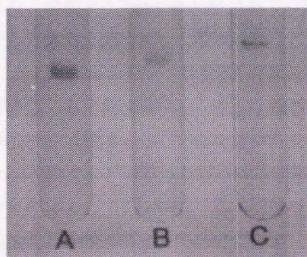


Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzymes.  
 A, protease I (13  $\mu$ g). B, protease II (10  $\mu$ g). C, b-1,3-glucanase (11  $\mu$ g)

TABLE III Synergistic effects of protease and  $\beta$ -1,3-glucanase

Protease I	Enzyme added ( $\mu$ g)		Relative amount of yeast cells (%)		
	Protease II	$\beta$ -1,3-glucanase	A660 <sup>a</sup>	Total cell. <sup>b</sup>	Viable cell. <sup>c</sup>
0	0	0	100	100	100
0	0	5	98	100	100
5	0	0	52	100	2
5	0	5	9	1	0
0	5	0	40	93	0
0	5	5	10	2	0

a: turbidity of yeast suspension after enzyme treatment, b: apparent cell number under a microscopic observation, c: viable cell number as colony-forming unit

#### (4) 酵母溶解活性に対するプロテアーゼと $\beta$ -1,3-glucanaseの協奏作用

精製プロテアーゼは単独で酵母溶解活性を示すが、酵母の溶解は完全ではなかった。また、精製 $\beta$ -1,3-glucanaseは単独では酵母溶解活性を示さなかった。しかし、両者を併用すると酵母は完全に溶解された。Table IIIに示すように、 $\beta$ -1,3-glucanase単独では吸光度は減少せず、顕微鏡でみた細胞数や生細胞数にも変化はない。一方、2種類のプロテアーゼは、どちらも、単独で酵母懸濁液の吸光度を減少させることができるが、その度合いは40-50%であり、酵母は完全には溶解されない。しかし、プロテアーゼ処理によって、顕微鏡でみた酵母数には変化はないが、生酵母数は激減し、細胞が死滅することがわかった。このことは、プロテアーゼが細胞壁のタンパク質部分を分解することによって、酵母細胞は致命的な損傷を受けることを示している。 $\beta$ -1,3-glucanaseとプロテアーゼを併用すると、酵母細胞は完全に溶解され、もはや、顕微鏡下でも細胞は認められなくなった。



### (5) 精製酵素の分子量

プロテアーゼはゲルろ過にかけると溶出が異常に遅れるため、この方法では分子量を測定できない。精製酵素の分子量は、Fig.5に示すように SDSポリアクリルアミド電気泳動で測定した。protease IIは単一のバンドを示し、その分子量は35,000と計算された。同様に、protease Iも単一のバンドを示しその分子量は33,000であった。 $\beta$ -1,3-glucanaseの分子量は82,000であった。

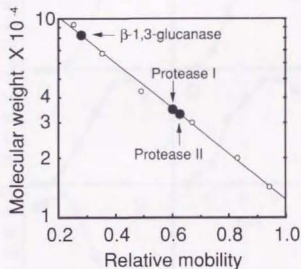


Fig. 5 Estimation of molecular weight by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Molecular weight of purified enzyme was estimated as follows by the method of Laemmli: protease I (35,000), protease II (33,000),  $\beta$ -1,3-glucanase (82,000). Molecular weight standards (o) were phosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), and  $\alpha$ -lactalbumin (14,400).



### (6) 酵素活性に対するpHの影響

精製酵素の活性に対するpHの影響をFig.6に示した。protease I、protease IIは、どちらも、酵母溶解活性とプロテアーゼ活性の至適pHは似ており、pH 9というアルカリ側で最も活性が高かった。 $\beta$ -1,3-glucanaseの至適pHはラミナリンを基質としたとき5付近であった。これは、プロテアーゼと共同で酵母を溶解する他の $\beta$ -1,3-glucanaseと類似している。

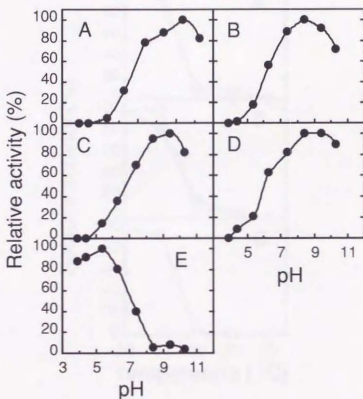


Fig. 6 Effects of pH on enzymatic activities.

A. protease I as yeast-lytic activity, B. protease I as protease activity, C. protease II as yeast-lytic activity, D. protease II as protease activity, E.  $\beta$ -1,3-glucanase. Each activity was measured by the standard assay method described in the text. The buffer system used was a mixture of 0.1 M phosphoric acid, 0.1 M acetic acid, and 0.1 M boric acid whose pH was adjusted with NaOH.

### (7) 酵素の熱安定性

精製酵素は、Fig. 7に示すように熱に対して不安定であった。protease I及びprotease IIは50℃15分間の熱処理で、プロテアーゼ活性、酵母溶解活性が共に80%以上減少し、70℃、15分間の処理で完全に失活した。 $\beta$ -1,3-glucanaseの熱安定性も同様であり、60℃、15分間の熱処理で完全に失活した。

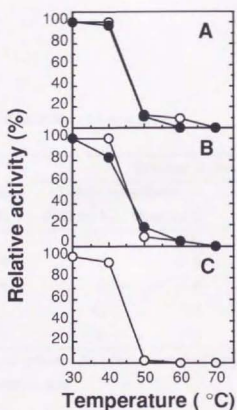


Fig. 7 Thermal stability of enzymes.

Each enzyme was incubated at the indicated temperature for 15 min. Remaining activity was measured by the standard assay method.

- A. protease I; yeast-lytic activity(o), protease activity(●)
- B. protease II; yeast-lytic activity(o), protease activity(●)
- C.  $\beta$ -1,3-glucanase(o)

#### (8) プロテアーゼに対する阻害剤の効果

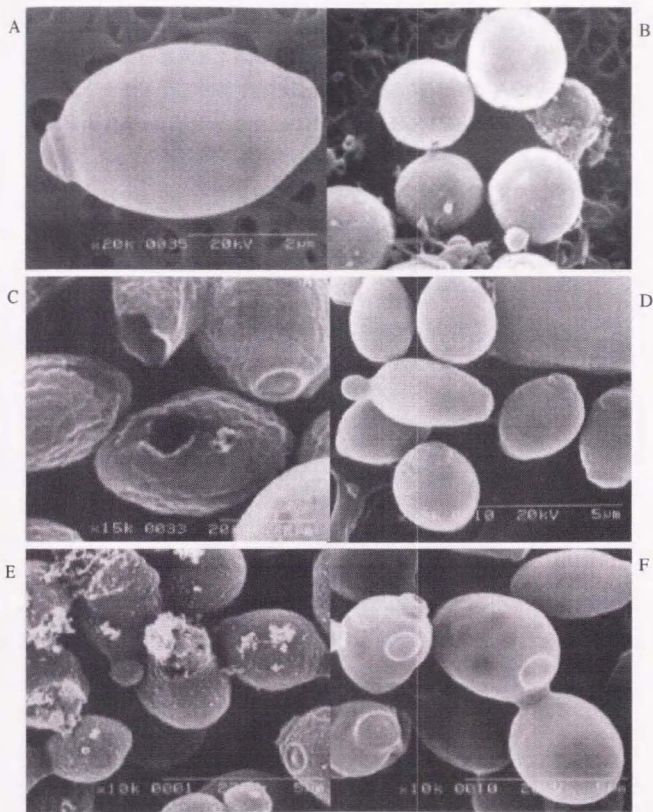
プロテアーゼのタイプを決めるために、各種の阻害剤を用いて protease I 及び protease II の酵母溶解活性及びプロテアーゼ活性に対する阻害効果を調べた。Table IV に示したように、5 mM の diisopropylfluorophosphate

(DFP) 及び phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) はプロテアーゼ活性と酵母溶解活性の両方を完全に阻害した。このことは、精製 protease I 及び protease II の酵母溶解活性が実際にプロテアーゼによるものであることを示すと共に、これらのプロテアーゼがセリンプロテアーゼであることも示している。

TABLE IV Effects of inhibitors on protease

Inhibitor	Concn. (mM)	Residual activity (%)			
		Yeast-lytic activity		Protease activity	
		Protease I	Protease II	Protease I	Protease II
None		100	100	100	100
DFP <sup>a</sup>	5	0	0	0	0
PMSF <sup>b</sup>	5	0	0	0	0
IAA <sup>c</sup>	5	98	97	94	94
EDTA <sup>d</sup>	5	100	100	100	98

a : diisopropylfluoro phosphate, b : phenylmethylsulfonyl fluoride, c : iodoacetamide, d : ethylenediaminetetraacetic acid



**Fig. 8 Scanning electron microscopy of enzyme-treated yeast cells.**

A, untreated yeast cell, B, protease I and  $\beta$ -1,3-glucanase for 18 h,

C, protease I for 80 min, D,  $\beta$ -1,3-glucanase for 80min,

E, protease for 18 h, F,  $\beta$ -1,3-glucanase for 18 h

(9) 精製酵母溶解酵素で処理した酵母の走査電子顕微鏡による観察

精製酵母溶解酵素による酵母の溶解の過程を調べるため、酵素処理した酵母を走査電子顕微鏡で観察した。未処理の酵母は、Fig.8 Aの様に表面が平滑であり、出芽痕が突出して見られる。精製protease Iで処理した酵母は、Fig.8 C, Eに示すように表面が荒くでこぼした形状をしている。これは、プロテアーゼによって酵母表層のタンパク質が分解されたためであると考えられる。一方、 $\beta$ -1,3-glucanaseで処理した酵母は、Fig.8 D, Fの様にほとんど外見上の変化が認められない。これは、Table IIIの結果とも一致しており、 $\beta$ -1,3-glucanaseだけでは酵母は溶解されないことを示している。 $\beta$ -1,3-glucanaseとprotease Iを併用した場合は、酵母の細胞壁は完全に分解され、浸透圧保護剤の存在下ではFig.8 Bの様な球状のプロトプラストとなった。



#### 4 考察

*R. faecitabidus*の酵母溶解酵素を精製し、2種類のプロテアーゼと1種類の $\beta$ -1,3-glucanaseが協奏的に酵母の溶解に関与していることを明らかにした。2種類のプロテアーゼが酵母の溶解に関与していることは、以下の事実から結論づけられた。(1)種々のクロマトグラフィーにおいて、酵母溶解活性の溶出位置及びピークの形状がプロテアーゼ活性のそれと一致した。(2)電気泳動的に単一なまでに精製された酵母溶解活性画分はプロテアーゼ活性を含んでいた。(3)酵母溶解活性とプロテアーゼ活性のpHプロファイルはほとんど同じであった。(4)酵母溶解活性の熱安定性はプロテアーゼのそれと同じであった。(5)酵母溶解活性及びプロテアーゼ活性はセリンプロテアーゼの阻害剤であるDFP及びPMSFで完全に阻害された。

精製プロテアーゼが $\beta$ -1,3-glucanaseと共同して酵母を溶解する現象は、Obata<sup>8)</sup>らによってはじめて報告されている。それ以後、多数の酵母溶解活性を持つプロテアーゼが様々な種類の微生物から精製されている<sup>9-12)</sup>。しかし、これらの研究では多くの場合、酵母懸濁液の吸光度の減少を酵母溶解活性の指標として使用しているため、酵母溶解の詳しい作用機作については不明な点が多い。本研究では、酵母細胞を酵素処理した後に、吸光度の減少ばかりでなく、顕微鏡下での細胞数の計数及びコロニー形成能を尺度とした生細胞数の測定を行った。その結果Table IIIにまとめてあるように、2種の精製プロテアーゼは、どちらも、細胞の見かけの数は変化させないものの、酵母細胞のviabilityに影響を与え、細胞死を引き起こすことがわかった。見かけの酵母数に変化がないのになぜ酵母懸濁液の吸光度が減少するのかわからない。しかし、Fig.8に示した走査電子顕微鏡を用いた観察によって、酵母の細胞表層が分解されて粗面になっていることがわかった。これは、酵母の細胞表層の電子

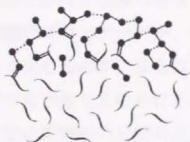
密度の高い層がザイモリエースのプロテアーゼで分解されるという透過電子顕微鏡での観察結果と一致している<sup>13)</sup>。従って、酵母細胞壁のタンパク質層が分解されることによって、光の散乱が減少し、そのため酵母懸濁液の濁度が減少したということも考えられる。この場合、細胞壁に剛性を与えていると考えられているグルカン層は分解されないため、見かけの酵母数は減少しないものと考えられる。一方、 $\beta$ -1,3-glucanaseは単独では酵母懸濁液の吸光度を減少もさせないし、酵母のviabilityを損なうこともなかった。しかしながら、 $\beta$ -1,3-glucanaseは2種のプロテアーゼのうちのどちらかを併用することによって、酵母細胞を完全に溶解することができた。したがって、*R. faecitabidus*においてはプロテアーゼが酵母の溶解にきわめて重要な役割を担っているものと考えられる。

*Arthrobacter luteus*から調製された市販の酵母溶解酵素であるザイモリエースから精製されたプロテアーゼは、 $\beta$ -1,3-glucanaseと混合すると酵母を完全に溶解するものの、単独では酵母をほとんど溶解しない<sup>11)</sup>。Zlotnikら<sup>13)</sup>も、また、ザイモリエースから精製したプロテアーゼは酵母のviabilityにほとんど影響を与えないと述べている。Zlotnikらはこれらの結果から、Fig. 9 Aに示すような、グルカン層の外部をマンナンタンパク質がおおっている酵母細胞壁のモデルを提唱している。

これと対比的に、*R. faecitabidus*の酵母溶解プロテアーゼは、 $\beta$ -1,3-glucanaseの添加無しに酵母懸濁液の吸光度を減少させることができる。これは、*R. faecitabidus*の酵母溶解プロテアーゼの特異な性質ということができる。この性質はObataらが報告している*Oerskovia*のプロテアーゼと同様であり、Fig. 9 Bに示した彼らの酵母細胞壁のモデルともよく一致している<sup>14)</sup>。そのモデルでは、細胞壁内のグルカン網の間にまばらにマンナンタンパク質がうめこまれている。酵母溶解プロテアーゼは、これらのタンパク質を分解することによって、グルカン網を分断し、酵母細胞の死滅を引き起こすのであろう。

A

WALL OUTER SURFACE



WALL INNER SURFACE

- Mannoprotein
- S-S or thioester bond
- ~ Glucan
- Hydrophobic interaction
- ▬ Covalent bond

B

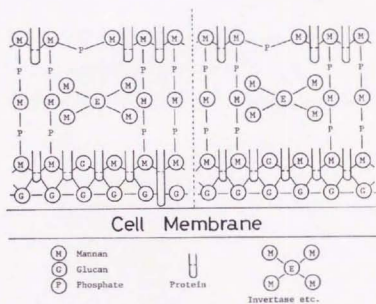


Fig. 9 Models for yeast cell wall structure.

A : a model presented by Zlotnik *et. al.* (13)

B : a model presented by Obata *et. al.* (14)

他の多くの微生物は1種類の酵母溶解プロテアーゼを分泌することが知られているが、*R. faecitabidus*は2種類の酵母溶解プロテアーゼを分泌している。見かけ上2種類のプロテアーゼが、同じ遺伝子産物のプロテアーゼによる分解によって生じるのか、または、実際に異なる遺伝子が存在して2種のプロテアーゼが生じるのかは不明である。プロテアーゼによって引き起こされる酵母細胞壁の分解の反応機構についても、このプロテアーゼの実際の基質がなんであるのか、そしてどのようにして細胞壁を分解するのかの詳細は不明である。これらのプロテアーゼの基質特異性と一次構造を検討することによって、酵母溶解プロテアーゼの作用機作について新たな視点が開かれることとなるであろう。

## 5 要約

*R. faecitabidus* は酵母を用いた廃水処理システムから分離された酵母を溶解するコリネフォルムの細菌である。酵母溶解の作用機作を解明するために、まず、酵母溶解酵素の精製を行った結果、2種類のプロテアーゼと1種類の $\beta$ -1,3-glucanaseを精製した。SDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量はそれぞれ、35,000、33,000、82,000であった。プロテアーゼは2種類ともセリンプロテアーゼであり、DFPやPMSFで阻害され、アルカリ側のpHで最も活性が高かった。どちらのプロテアーゼも単独で酵母懸濁液の吸光度を減少させることができた。この処理によって、見かけの酵母数には変化がないが、酵母表層に損傷が認められ、コロニー形成能は失われた。 $\beta$ -1,3-glucanaseはpH5で最も活性が高かったが、この酵素単独では酵母懸濁液の吸光度は減少せず、コロニー形成能への影響へも見られなかった。しかし、 $\beta$ -1,3-glucanaseと2種類のプロテアーゼのうちのどちらかを併用すると、酵母細胞は完全に溶解された。



## 6 文献

1. Saito, K., Hasuo, T., Yamamoto, N., and Tadenuma, M. (1988) *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1849-1850
2. Yamamoto, N., Hasuo, T., Saito, K., and Tadenuma, M. (1987) *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1541-1545
3. Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* **195**, 19
4. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., and Williams, D. E. (1962) *Nature* **195**, 281
5. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404
6. Laemli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265
8. Obata, T., Fujioka, K., Hara, S., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 671-677
9. Funatsu, M., Oh, H., Aizono, Y., and Shimoda, T. (1978) *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1975-1977
10. Scott, J.H., and Schekman, R. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 414-423
11. Kitamura, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 963-969
12. Usui, T., and Oguchi, M. (1986) *Agric. Biol. Chem.* **50**, 535-537
13. Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., and Cabib, E. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 1018-1026
14. Obata, T., Iwata, H., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2387-2394

### 第3章 *Rarobacter faecitabidus* の酵母溶解 プロテアーゼの性質

#### 1 諸言

前章では、*R. faecitabidus*の酵母溶解酵素が2種類のプロテアーゼと1種類の $\beta$ -1,3-glucanaseからなっており、そのうちでもプロテアーゼが酵母細胞壁の溶解に重要な役割をはたしていることを示した。プロテアーゼは酵母表層のタンパク質を分解していると考えられるが、今までの研究から、市販されており実験によく用いられているプロテアーゼには酵母溶解活性がないことが知られている<sup>1,2)</sup>。従って、酵母溶解プロテアーゼの基質特異性はきわめて特異なものであることが考えられるが、今までにこのことについての報告は見あたらない。本章では、*R. faecitabidus*の酵母溶解プロテアーゼのうち量的に主要な酵素である protease I (以下RPIとする) について、N末端アミノ酸配列、基質特異性、糖結合性などについて検討した。その結果、本酵素は、構造的にはトリプシン・キモトリプシン族のプロテアーゼであること、基質特異性はエラスターゼに類似していること、マンノースに対するアフィニティーを持っていることなどから、きわめて珍しい性質のプロテアーゼであることが判明した。

#### 2 実験方法

##### (1) 実験材料

RPI及び $\beta$ -1,3-glucanaseは*R. faecitabidus* YLM-50の培溶液から前章に示した方法で精製し、均一性についてポリアクリルアミド電気泳動で検定したものを実験に用いた。酵母としては*Saccharomyces cerevisiae* IFO2043

を使用した。

### (2) N末端アミノ酸配列

前記のRPIを逆相クロマトグラフィーで脱塩した。すなわち、試料をTSKgel Phenyl-5PW (Tosoh) に注入し、0.05% trifluoroacetic acid存在下でacetonitrileの濃度を0から60%まで直線的に増加させて溶出した。RPIを含む画分を集め、凍結乾燥し、少量の0.1% trifluoroacetic acidに溶解した。N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー (Applied Biosystems 477A) を用いて決定した。

### (3) 酵素活性の測定

酵母溶解活性は生酵母を基質として、前章に記載の方法で測定した。プロテアーゼのエステラーゼ活性は終濃度1 mM benzyloxycarbonyl amino acid p-nitrophenyl ester (Sigma) を基質として用いた。反応混液1 mlは0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, 25% acetonitrile, 5  $\mu$ gの酵素及び基質を含む。石英セル内で反応を開始し、30°Cで400 nmの吸光度の増加をモニターした。アミダーゼ活性は、succinyl peptideまたはamino acid p-nitroanilide (Peptide Institute) を基質として用いた。反応混液protease 1 mlは、特にことわらない限り、0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1% N-methyl-1-pyrrolidone, 2 mMの基質及び酵素を含む。反応は石英セル内で30°Cで行い、410 nmの吸光度をモニターした。RPI及びpancreatic elastaseのプロテアーゼ活性はSuc-Ala-Pro-Ala-pNAを基質として用いたアミダーゼ活性を測定して定量した。

### (4) 酸化インスリンB鎖の分解位置の決定

酸化インスリンB鎖のRPIによる分解は、基質対酵素の重量比100:1で、50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0中で30°Cで行った。反応は終濃度0.1%

のtrifluoroacetic acidを添加して停止し、生じたペプチドを逆相クロマトグラフィーで分析した。カラムには $\mu$  Bondasphere C18 100Å (Waters)を用い、試料注入後、0.1% trifluoroacetic acid 中でacetonitrileの濃度を5から50%に直線的に増加させて溶出した。溶出したペプチドは凍結乾燥した後、1% phenolを含む6 M塩酸で110°C、24時間、気相で加水分解した。分解物のアミノ酸組成はphenylisothiocyanate誘導体としてHPLCで分析した<sup>3)</sup>。求めたアミノ酸組成と酸化インスリンB鎖のアミノ酸配列を比較して、分解されたペプチド結合の位置を推定した。

#### (5) プロテアーゼの酵母細胞への吸着

5  $\mu$  gのRPIまたはpancreatic elastase (Sigma)を乾燥重量20 mgの酵母細胞またはelastin (Sigma)と1 mlの0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0中で25°C、5分間反応させた。速心して酵母細胞を除いた後、上清に残存するプロテアーゼ活性をSuc-Ala-Pro-Ala-pNAを基質として測定した。

#### (6) Mannose-agaroseカラムへのプロテアーゼの吸着

プロテアーゼを含む試料を1 mlのmannose-agarose (Sigma)を充填したカラムに添加し、カラムを50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0で洗浄した後、1 Mの各種の糖を含む同緩衝液で溶出した。それぞれの画分について、プロテアーゼ活性をSuc-Ala-Pro-Ala-pNAを基質として測定した。

#### (7) RPIの酵母溶解活性の各種の単糖による阻害

1 mlの反応混液には0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0、0.8 M 各種単糖類、乾燥重量2 mgの酵母菌体及び酵素が含まれる。30°C、1時間反応させた後、2 mlの水を加えて、浸透圧感受性の細胞を破壊し、懸濁液の660 nmの吸光度を測定し、溶菌の目安とした。

### 3 結果

#### (1) N末端アミノ酸配列

RPIがどのようなプロテアーゼであるのかを知るために、まず、そのN末端アミノ酸配列を決定し、他のセリンプロテアーゼと比較した。その結果、Fig.1に示したように、RPIは*Lysobacter enzymogenes*の $\alpha$ -lytic proteaseや<sup>4)</sup>*Streptomyces griseus*のprotease A及びB<sup>5)</sup>と特にHis27付近で相同性があることがわかった。*L. enzymogenes*の $\alpha$ -lytic proteaseや*St. griseus*のprotease A及びBは、セリンプロテアーゼの中でもトリプシン・キモトリプシン族のプロテアーゼの一員であることが知られている<sup>6)</sup>。RPIのN末端配列にはsubtilisin BPN<sup>7)</sup>及びCarlsberg<sup>7)</sup>と相同性のある部分はなかった。これらの結果は、RPIがトリプシン・キモトリプシン属のプロテアーゼであることを示している。

	1	5	10	15	20	25	*	30	35																											
RPI	R	D	Y	W	G	G	D	A	L	S	G	T	L	A	F	P	V	Y	G	G	F	L	T	A	G	H	A	V	E	G	K	G	H	I		
$\alpha$ -LP (10)	S	I	N	N	A	S	L	C	S	V	G	F	S	V	T	R	G	A	T	K	G	F	V	T	A	G	H	C	G	T	V	N	A	T	A	R
SGPA (7)	I	T	T	G	S	R	C	S	L	G	F	N	V	S	V	N	G	V	A	H	A	L	T	A	G	H	C	T	N	I	S	A	S	W	S	
SGPB (7)	I	Y	S	S	T	G	R	C	S	L	G	F	N	V	R	S	G	S	T	Y	Y	F	L	T	A	G	H	C	T	D	G	A	T	T	W	W

Fig. 1. N-terminal amino acid sequence of *Rarobacter* protease I (RPI) compared with *L. enzymogenes*  $\alpha$ -lytic protease ( $\alpha$ -LP) and *S. griseus* protease A (SGPA) and protease B (SGPB).

Identical amino acids are boxed. Amino acids of *Rarobacter* protease I are numbered above the sequences. Numbers in the parentheses before the sequences are the residue numbers of the most N-terminal sides of the other proteases shown in the figure. The asterisk denotes the active-site His residue. Blanks indicate unidentified amino acids in the sequence.

#### (2) アミノ酸エステルに対する特異性

RPIの基質特異性を見る手始めとして、まず、各種アミノ酸のパラニトロフェニルエステルに対する特異性を調べた。これはプロテアーゼの基質特異性としては、P1サイトの特異性を見ることになる。結果はTable



IIに示したように、RPIはアラニンのエステルを優先的に分解した。そのほか、ロイシン、バリンに対しても比較的高い活性を示した。フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンなどの芳香族アミノ酸のエステルはほとんど分解しなかった。こうしたP1基質特異性は細菌のプロテアーゼにはあまり見られないが、エラスターゼや  $\alpha$ -lytic proteaseが同様な基質特異性を持つことが知られている<sup>8,9)</sup>。

TABLE I Esterase activity of RPI with benzyloxycarbonyl amino acid p-nitrophenyl esters as substrates.

One milliliter of reaction mixture contained 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7), 25% acetonitrile, 0.1 mM substrate and 5  $\mu$ g of enzyme.

Amino acid	Relative activity (%)
Ala	100
Gly	3
Ile	0
Leu	43
Phe	4
Pro	0
Trp	2
Tyr	4
Val	10

### (3) RPIのエラスターゼ活性

エステラーゼ活性から見た基質特異性は、エラスターゼのそれと類似していたので、エラスターゼ特異的な基質である<sup>10)</sup>Succinyl Ala-Ala-Ala p-nitroanilide(Suc-Ala-Ala-Ala-pNA)及び<sup>8)</sup>Suc-Ala-Pro-Ala-pNAを用いてその活性を検討した。Table IIに示したように、RPIはSuc-Ala-Pro-Ala-pNAにきわめて特異的であり、この基質をKcat/Kmで $3.48 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ という高い値で分解した。この値は、*Bacillus* sp. alkaline elastase<sup>11)</sup>の $1.4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ よりも高かった。一方、Suc-Ala-Ala-Ala-pNAに対するKcat/Kmは $0.13 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ で

あり、*Bacillus* sp. alkaline elastaseの $2.5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ よりも低かった。RPIは Suc-Ala-Ala-pNA及びSuc-Ala-pNAを分解しなかったので、この酵素は少なくとも4つのサブサイトがあるものと考えられる。RPIは実際にエラスチンから紫外線吸収性の物質を可溶性画分に溶出してくる活性があった(data not shown)。

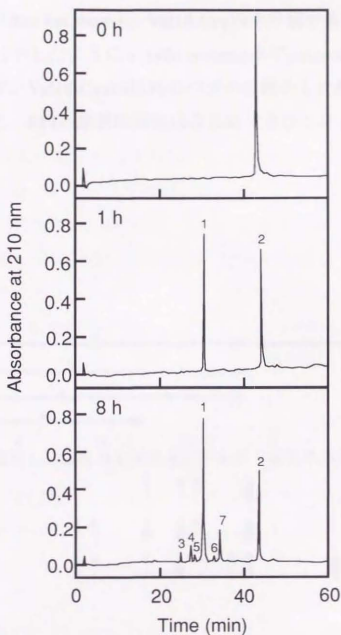
**TABLE II Kinetic parameters of RPI for succinyl peptide p-nitroanilide as substrates.**  
One milliliter reaction mixture contained 0.1 M Tris-HCl buffer (pH8), 10% dimethylsulfoxide, substrate and 1  $\mu\text{g}$  of enzyme.

Substrate	$K_m^a$ (mM)	$K_{cat}^a$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ )
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	20.2	2.7	0.13
Suc-Ala-Pro-Ala-pNA	5.7	19.8	3.48

<sup>a</sup>The correlation coefficient of the linear regression to calculate enzymatic parameters was more than 0.99.

#### (4) 酸化インスリンB鎖の加水分解パターン

より大きなペプチドに対する特異性を調べるため、酸化インスリンB鎖のRPIによる分解を検討した。分解産物を経時的に採取して、そのアミノ酸組成を分析し、酸化インスリンB鎖のアミノ酸配列と比較して、どの部分のペプチド結合が分解されているのかを推定した。Fig.2に示したように、反応1時間後には2個のペプチドが生じ、アミノ酸分析の結果からFig.3に示した1,2のペプチドと同定された。RPIは反応の初期では、ほとんどVal18-cysteic acid19(cya19)のペプチド結合のみを分解し、Phe1-Val18及びCya19-Ala30のペプチドを生じることがわかった。引き続き反応を続けることによって他のVal12-Glu13、Ala14-Leu15、Leu15-Tyr16も分解され始めるが、それらのペプチド結合の分解は8時間後でも完全ではなかった。Cya19-Ala30のペプチドは8時間後でも全く分解されなかった。酸化インスリンA鎖は同じ条件ではRPIによって全く分解



**Fig. 2. Elution profiles of hydrolysate of oxidized insulin B-chain on reverse phase chromatography.**

RPI and oxidized insulin B-chain (1:100, by weight) were incubated at 30 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). After 0, 1 and 8 h, the reaction was stopped, and the hydrolysate was fractionated by HPLC. Numbered peaks in the figure were collected and analyzed as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES.

されなかった (data not shown)。Val18-Cya19を分解するプロテアーゼとしては、Fig.3に示したように $\alpha$ -lytic protease及びpancreatic elastase<sup>12,13)</sup>が知られているが、Val18-Cya19以外のペプチド結合も比較的よく分解することを考えると、RPIの基質特異性はきわめてきびしいといえる。

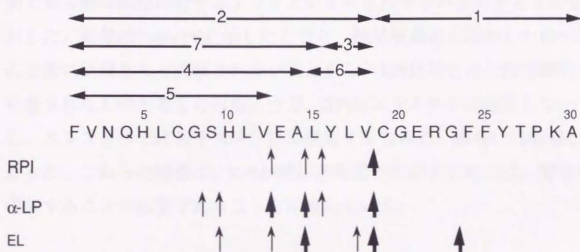


Fig. 3 Cleavage sites in oxidized insulin B-chain by RPI compared with *L. enzymogenes*  $\alpha$ -lytic protease ( $\alpha$ -LP) and pancreatic elastase (EL). Larger arrows indicate major cleavage sites, and smaller arrows minor ones. Numbers of peptide fragments within the arrows correspond to the numbers in Fig. 2. C indicates cysteine acid.

### (5) RPIの酵母細胞に対する吸着

RPIの基質特異性はエラスターゼのそれと合成基質、酸化インスリンB鎖の両方で類似していることから、エラスターゼが酵母を溶解することができるかどうかを検討した。Table IIIに示したようにエラスターゼは、 $\beta$ -1,3-glucanaseの添加の有無に関わらず、酵母を溶解することができなかった。このことは酵母溶解酵素にはサブサイトの特異性以外の基質との相互作用があることを示唆している。エラスターゼによるエラスチンの分解に際しては、酵素が不溶性の基質であるエラスチンに吸着することが必要であるとされている<sup>14)</sup>。そこでRPIも同じように不溶性の基質である酵母細胞に対するアフィニティーを持っているのかどうかを検討した。結果はTable IVに示したとおり、酵母懸濁液に添加したRPIは遠心上清にはほとんど回収されないことから、RPIはほとんど酵母細胞に吸着されたものと考えられる。一方、RPIはエラスチンに吸着しないし、エラスターゼはエラスチンには吸着するものの、酵母には吸着しなかった。これらの結果は、RPIが酵母溶解活性を示すためには、酵母に吸着することが必要であることを示唆している。

TABLE III Effect of elastase on lysis of yeast.

The yeast-lytic activity of RPI and pancreatic elastase with or without  $\beta$ -1,3-glucanase was measured by the standard assay method. The lytic activity is represented by the decrease in turbidity of the reaction mixture at 660 nm.

Protease	( $\mu$ g)	$\beta$ -1,3-glucanase ( $\mu$ g)	Lytic activity (%)
RPI	0	0	0
	0	5	3
	5	0	48
	5	5	87
Elastase	5	0	3
	5	5	7



TABLE IV Adsorption of *Rarobacter* protease I (RPI) to yeast cells or elastin.

Enzyme was incubated with yeast cells or elastin at 25 °C for 3 min.

After centrifugation, protease activity of the supernatant was assayed with Suc-Ala-Pro-Ala-pNA as substrate.

Enzyme	Addition	Residual activity (%)
RPI	None	100
	Yeast	1
	Elastin	45
Elastase	None	100
	Yeast	110
	Elastin	18

#### (6) RPIのmannose-agaroseに対するアフィニティー

酵母 *S. cerevisiae* の表層はマンナンタンパク質でおおわれていることを考えると<sup>15)</sup>、RPIがマンナンタンパク質にアフィニティーを持っているということは十分に考えられる。そこでまず、RPIにマンノース結合能がないかどうかをmannose-agaroseカラムを用いて検討した。結果はFig.4に示したように、RPIは完全にmannose-agaroseカラムに吸着し、素通り画分であるフラクション2には全くプロテアーゼ活性は検出されなかった。そして、吸着されたRPIは1 M  $\alpha$ -D-methylmannoside、D-mannose、D-glucoseによって溶出された。これらの糖はC-3、C-4の水酸基の立体配座が同じである。回収率は90%以上であった。一方、C-3、C-4の水酸基の立体配座が異なるD-fucose、D-galactose、L-rhamnoseによっては、プロテアーゼ活性は溶出されなかった。これらの実験は、RPIがレクチン様の糖特異的な方法でmannose-agaroseに結合していることを示している。D-glucoseによる溶出のパターンが $\alpha$ -D-methylmannoside及びD-mannoseに比べてブロードなことから、RPIはマンノース結合タンパク質であるといえる。Pancreatic elastaseはmannose-agaroseカラムには全く結合しなかった(data not shown)。

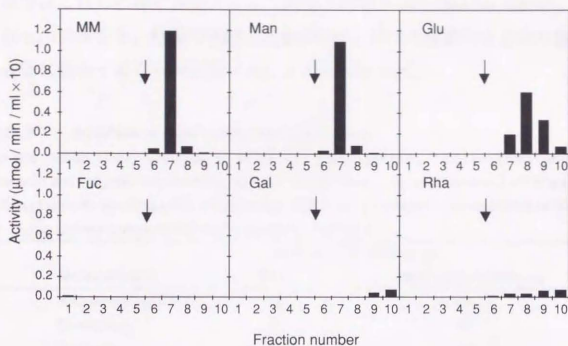


Fig. 4 Mannose-agarose chromatography of *Rarobacter protease I*.

*Rarobacter protease I* was loaded onto a column containing 1 ml of D-mannose-agarose. The column was washed four times with 1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer containing 1 M various monosaccharides after the fractions indicated by the arrows. MM,  $\alpha$ -methylmannoside, Man, D-mannose, Glu, D-glucose, Fuc, L-fucose, Gal, D-galactose, Rha, L-rhamnose

#### (7) 単糖によるRPIの酵母溶解活性の阻害

RPIのマンノースに対する結合が酵母溶解活性を示すために必要であるとすれば、酵母細胞とともにマンノースなどの単糖を反応液に加えた場合は、RPIの酵母溶解活性は阻害されるものと考えられる。Table Vに示した結果は、実際に、酵母溶解活性が $\alpha$ -D-methylmannoside、D-mannose、D-glucoseなどの添加によって阻害されることを示している。これらの糖はmannose-agaroseからRPIを溶出させることのできる糖である。一方、溶出力のない糖であるD-fucose、D-galactose、L-rhamnoseには

阻害効果は認められなかった。Suc-Ala-Pro-Ala-pNAを用いたプロテアーゼ活性はこれらの糖の存在によって阻害されなかった(data not shown)。これらの結果から、酵母の溶解にはRPIがマンノース特異的な方法で酵母表層に結合することが必要であることがわかった。

TABLE V Inhibition of yeast lysis by monosaccharide.

Reaction mixture (1 ml) containing 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.8 M monosaccharide, yeast cells and enzymes was incubated at 30 °C for one hour. After addition of 2 ml of water to disrupt osmotic sensitive cells, the turbidity of the yeast suspension was measured at 660 nm. Lytic activity is represented by the decrease in turbidity.

Monosaccharide	Relative lytic activity (%)	
	RPI	RPI + $\beta$ -1,3-glucanase
$\alpha$ -D-methylmannoside	24	38
D-mannose	16	36
D-glucose	13	28
L-fucose	61	94
D-galactose	69	95
L-rhamnose	54	95

#### 4 考察

RPIが含まれているセリンプロテアーゼは、一次構造上の特徴からトリプシン・キモトリプシン族とサチライシン族に分類されている。このふたつの族の間には、アミノ酸配列上のホモロジーは全くないが、立体構造、特に活性中心付近の構造は類似していることが知られている<sup>16)</sup>。RPIのN末端アミノ酸配列を決定し、他のセリンプロテアーゼのそれと比較したところ、RPIはトリプシン・キモトリプシン族の一員であることがわかった。トリプシン・キモトリプシン族のプロテアーゼは細菌の菌体外酵素としては比較的めずらしい。

trypsin, chymotrypsin, pepsin, pronase E<sup>1)</sup>, subtilisin, V8 protease, proteinase K, thermolysin<sup>2)</sup>などのプロテアーゼにはいずれも酵母溶解活性がないことが報告されている。従って、酵母溶解プロテアーゼの基質特異性は他のプロテアーゼとかなり異なっていることが考えられる。Moriyamaによれば<sup>8)</sup>細菌のセリンプロテアーゼは、合成基質及び酸化インスリンB鎖に対する特異性から大きく4種類に分類することができる。塩基性アミノ酸に特異的なトリプシン型、芳香族または疎水性アミノ酸に特異的なアルカリプロテアーゼ、アラニンの様な小さな脂肪族アミノ酸に特異的な $\alpha$ -lytic protease、酸性アミノ酸特異的なStaphylococcal V8 proteaseである。これらはサブサイトのうち切断点のすぐN末端側のアミノ酸に対する特異性(P1特異性)に対応している。

RPIの基質特異性をまずアミノ酸のパラニトロフェニルエステルで検討した結果、脂肪族アミノ酸、特にアラニンのエステルをよく分解することがわかった。この基質特異性は $\alpha$ -lytic proteaseやエラスターゼに類似している<sup>8)</sup>。また、RPIはエラスターゼに特異的な基質であるSuc-Ala-Pro-Ala-pNA及びSuc-Ala-Ala-Ala-pNAをよく分解した。これらの合成基質に対する特異性は、酸化インスリンB鎖に対する基質特異性によく反



映されている。RPIは反応の初期段階でもつばらVal18-Cya19のペプチド結合を分解し、2個のペプチドを生じた。バリンはRPIが分解しやすいアミノ酸のひとつであり、また、バリンのN末端側にはさらに疎水性のアミノ酸が3個連続している。この部位を分解するプロテアーゼとしては、やはり、 $\alpha$ -lytic protease<sup>12)</sup>及びエラスターゼ<sup>13)</sup>が知られている。合成基質及び酸化インスリンB鎖を使用した実験から、RPIの基質特異性はエラスターゼに類似していることがわかった。

基質特異性がRPIと類似しているpancreatic elastaseには酵母溶解活性はなかった。このことは、pancreatic elastaseが酵母に結合しないことによって説明できる。一方、RPIは酵母に結合することが示された。酵母の表層はマンナンタンパク質でおおわれていることを考えると、RPIはマンナンタンパク質のマンナン部分に結合することが推定できる。他の酵母溶解プロテアーゼにおいて、セファデックスカラムにおける溶出の遅れり、あるいはマンナンによるプロテアーゼ活性の阻害<sup>17,18)</sup>から、これらのプロテアーゼが酵母マンナンにアフィニティーを持つことが示唆されている。本研究では、mannose-agaroseカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、RPIが実際に糖特異的なマンノース結合活性を持っていることを示した。このことは、RPIがプロテアーゼであるとともに、マンノース結合タンパク質、または広い意味でのレクチンとしての性質を持っていることを示している。糖結合タンパク質あるいはレクチンはその単糖に対する特異性によって、いくつかの種類に分類されている<sup>19)</sup>。mannose-agaroseカラムでの溶出実験は、RPIがD-mannose, D-glucoseのC-3、C-4の水酸基の立体配座に特異的であることを示している。RPIのこのような単糖に対する特異性はconcanavalin Aに類似している<sup>20)</sup>。concanavalin Aは酵母表層のマンナンタンパク質に結合することが知られているので<sup>21)</sup>、RPIも同様に酵母表層に結合することが考えられる。



以上をまとめると、RPIはエラスターゼ類似の基質特異性とマンノース結合能を持っていることがわかった。これらの性質は、プロテアーゼが酵母細胞壁を分解するために必要な性質に違いない。RPIはマンナンタンパク質の糖鎖部分に結合し、その近傍にあるペプチド結合を分解しているのであろう。このマンナンタンパク質の構造は不明であるが、タンパク質部分には、RPIに分解されやすいペプチド結合が存在しており、RPIの基質特異性は、その本来の基質の一次構造を反映しているものと考えられる。また、そのペプチド結合は、プロテアーゼによるアタックを受けるわけであるから、タンパク質の中に畳み込まれているのではなく、環境中に露出しているものと考えられる。一方、不溶性の基質に対する酵素のアフィニティーは、セルラーゼ<sup>22)</sup>、グルコアミラーゼ<sup>23)</sup>の様な糖質分解酵素でよく知られている。しかし、これらの酵素が基質である糖質に結合するのと比較して、RPIはプロテアーゼでありながら糖質に結合するという点できわめて特異な存在である。RPIの構造がどの様になっているのか、また、それがどの様な進化の過程の中から生じてきたものか興味もたれる。

## 5 要約

酵母溶解性のセリンプロテアーゼである *Rarobacter faecitabidus* プロテアーゼ I の性質を調べた。N 末端アミノ酸配列には、*Lysobacter enzymogenes* の  $\alpha$ -リティックプロテアーゼ並びに *Streptomyces griseus* プロテアーゼ A 及び B と活性中心のヒスチジン付近で相同であった。このことは、このプロテアーゼがトリプシン-キモトリプシン族のプロテアーゼであることを示している。アミノ酸パラニトロフェニルエステルを基質とした場合、*Rarobacter* プロテアーゼ I はアラニンのエステルをもっとも速く分解した。この基質特異性はエラスターゼのそれと類似している。エラスターゼ特異的な合成基質である Suc-Ala-Pro-Ala-pNA に対する  $K_m$  及び  $K_{cat}$  はそれぞれ、5.7 mM 及び  $19.8 \text{ s}^{-1}$  であった。*Rarobacter* プロテアーゼ I はまた、酸化インスリン B 鎖に対して特異的な分解パターンを示した。本酵素は反応の初期段階において、18 番目のバリンと 19 番目のシステイン酸間のペプチド結合のみを分解し、その結果 2 つのペプチドを生じた。*Rarobacter* プロテアーゼ I は酵母菌体に吸着するが、エラスターゼは吸着しない。このことは、エラスターゼが類似する基質特異性を持っているにも関わらず酵母を溶解しない原因と考えられる。

*Rarobacter* プロテアーゼ I はマンノースアガロースカラムに吸着し、D-マンノースや D-グルコースによって特異的に溶出された。さらに、本酵素の酵母溶解活性は、これらの糖類によって阻害された。これらの結果は、プロテアーゼ I がマンノース結合能を持ったプロテアーゼであることを示している。エラスターゼ類似の基質特異性とマンノース結合能は酵母溶解活性の発現にとっての必要条件であると考えられる。

## 6 文献

1. Obata, T., Iwata, H., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2387-2394
2. Zlotonik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., and Cabib, E. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 1018-1026
3. Cohen, S.A., and Strydom, D.J. (1988) *Anal. Biochem.* **174**, 1-16
4. Silen, J.L., McGrath, C.N., Smith, K.R., and Agard, D.A. (1988) *Gene* **69**, 237-244
5. Henderson, G., Krygsman, P., Liu, C.J., Davey, C.C., and Malek, L.T. (1987) *J. Bacteriol.* **169** 3778-3784
6. James, M.N.G., Delbaere, L.T.J., and Brayer, G.D., (1978) *Can. J. Biochem.* **56**, 396-402
7. Ottesen, M., and Svendsen, I. (1970) *Methods Enzymol.* **19**, 199-215
8. Morihara, K. (1974) *Advances Enzymol.* **41**, 179-243
9. Shotton, D.M. (1970) *Methods Enzymol.* **19**, 113-140
10. Bieth, J., Spiess, B., and Wermuth, C.G. (1974) *Biochem. Med.* **11**, 350-357
11. Tsai, Y.C., Yamasaki, M., and Tamura, G. (1984) *Biochem. Int.* **8**, 283-288
12. Naughton, M.A., and Sanger, F. (1961) *Biochem. J.* **78**, 156-163
13. Whitaker, D.R., Roy, C., Tsai, C.S., and Jurasek, L. (1965) *Can. J. Biochem.* **43**, 1961-1970
14. Stone, P.J., Franzblau, C., and Kagan, H.M. (1982) *Methods Enzymol.* **82**, 588-605
15. Ballou, C.E. (1982) in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces : Metabolism and Gene Expression* (Strathern, J.N., Jones, E.W., and Broach, J.R., eds.) pp.335-360, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

16. Polgar, L. (1987) in *Hydrolytic Enzymes* (Neuberger, A. , and Brocklehurst, K. eds.) pp.159-200, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
17. Scott, J.H. , and Schekman, R. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 414-423
18. Kitamura, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2093-2099
19. Mäkelä, O. , and Cantell, K. (1958) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **36**, 366-374
20. Sharon, N. , and Lis, H. (1972) *Science* **177**, 949-959
21. Tkacz, J.S., Cybulska, E.B., and Lampen, J.O. (1971) *J. Bacteriol.* **105**, 1-5
22. Gilkes, N.G., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Jr. , and Kilburn, D.G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10401-10407
23. Hayashida, S., Kuroda, K., Ohta, K., Kuhara, S. , Fukuda, K. , and Sakai, Y. (1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 923-929

## 第4章 RPIの一次構造と機能

### 1 諸言

前章までに、*R. faecitabidus*の酵母溶解には1種類の $\beta$ -1,3-glucanaseと2種類のプロテアーゼが必要であり、そのうちのプロテアーゼは単独でも酵母溶解作用を持つことを示した。 $\beta$ -1,3-glucanaseはプロテアーゼの作用がないと酵母を溶解できないことから、プロテアーゼは酵母の溶解に重要な働きをしているものと考えられる。*R. faecitabidus*の主要なプロテアーゼであるprotease I (RPI)の性質を検討した結果、基質特異性ではエラスターゼと類似しているものの、レクチン様のマンノース結合活性を持つきわめて特異なプロテアーゼであることがわかった。本章では、このユニークな性質を持ったプロテアーゼであるRPIの構造と機能についてさらに検討を加えるために、遺伝子をクローニングし、その塩基配列を解析した。また、マンノース結合ドメインの存在と酵母溶解活性との関係について、部位指定突然変異によって検討した。

### 2 実験方法

#### (1) 材料とDNAの取扱い

*R. faecitabidus* YLM-50のゲノムDNAは文献<sup>1)</sup>の方法で調製した。DNAの操作は特に断らない限り、文献<sup>2)</sup>及び<sup>3)</sup>にしたがって行った。クローニング及び塩基配列の決定、遺伝子の発現に使用したプラスミドは、それぞれ、pUC118及びpUC119<sup>4)</sup>、pTV118N<sup>5)</sup>であり、宝酒造から購入した。



## (2) 遺伝子のクローニング

RPIのN末端アミノ酸配列<sup>6)</sup>のうち、2番目から8番目のアミノ酸配列(DYWGGDA)に基づいて、5'-GCGTC(G/C)CC(G/C)CCCCAGTAGTC-3'という配列の混合プローブを作成した。*R. faecitabidus*のゲノムDNAのGC含量は66.1%と高いので、コドンの3番目の塩基はGまたはCに固定した。プローブは<sup>32</sup>Pで標識し、*R. faecitabidus*のゲノムDNAの制限酵素分解物とサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの条件は、6 x SSC, 5 x Denhardt's solution and 0.1 mg/ml sonicated salmon sperm DNA, 65°Cで行った。サザン解析で同定した断片をクローニングするために、ゲノムDNAを制限酵素分解し、1%アガロースゲルで分離した。サザン解析の結果に対応する部分を切りとり、電気泳動で溶出し、フェノール抽出・エタノール沈澱で精製し、pUC118につなぎこんだ。これを大腸菌HB101に形質転換した後、形質転換体をサザン解析に用いたのと同じプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした

## (3) 塩基配列の決定

クローニングしたpRP201の2.7 kbのEcoRI/HindIII断片をpUC119のEcoRI/HindIII部位にライゲーションし、pRP211とした。pRP201とpRP211はヘルパーファージを感染させた場合、反対の方向の1本鎖DNAを生成する。シーケンスのためのいろいろなサブクローンは、制限酵素による分解とそれに続くライゲーション、または、exonuclease IIIとmung bean nucleaseによる段階的デリベーション<sup>7)</sup>によって作成した。1本鎖DNAはM13KO7をヘルパーファージとして用いて取得した<sup>4)</sup>。塩基配列の決定は、基本的にはダイデオキシ法<sup>8)</sup>に基づき、蛍光ユニバーサルプライマーを用いてDNA自動シーケンサー (Applied Biosystems 370A) によって行った。

#### (4) 発現プラスミドの作成

pTV118Nの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーター及びリボソーム結合部位を用いて、RPI遺伝子を発現させた。ベクター側の開始コドンであるATGの直後にRPIの第2コドンがくるようにするために、primer repair法を用いた<sup>9)</sup>。合成オリゴヌクレオチド5'-AAGTGTAAAGAGCCCA GCGCG-3'をリン酸化した後、pRP211から調製した1本鎖DNAとアニールさせた。クレノウ酵素を用いてプライマーの伸長反応を行った後、mung bean nucleaseで1本鎖部分を分解した。生じた2本鎖DNAをNruIで処理して3'側に平滑末端を作り、NcoI及びクレノウ酵素で処理して平滑末端を作成したpTV118Nにライゲーションした。生成物で大腸菌JM109を形質転換し、得られた形質転換体は、合成オリゴヌクレオチド5'-AAA CAGACCATGAAGTGTAAAGAAGC-3'をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。ポジティブクローンについては、合成オリゴヌクレオチド5'TGTGGAATTGTGAGCGG-3'をプライマーとして塩基配列を決定して、ベクター側のATGとインサート側のAAGが正しく結合されているかどうかを確認した。

#### (5) 部位指定突然変異によるC末端領域欠失変異株の作成

Ecksteinら<sup>10)</sup>の方法で発現プラスミドpTV-RPIにTyr404を停止コドンに変える変異(TAGからTAA)を導入した。pTV-RPIから調製した1本鎖DNAと変異を含むオリゴヌクレオチド5'-ACGACCTCCTAAGTTCAGGG C-3'をアニールさせた後、Amershamの試薬キットに添付のプロトコルに従って反応を行った。大腸菌JM109を反応産物で形質転換した後、ミニプレップしたプラスミドの制限酵素断片を調べることによって、変異株の候補を選んだ。候補株については、変異が導入されている部分の塩基

配列を合成オリゴヌクレオチド5'-AACTACGGCAACGGCCACA-3'をプライマーとして塩基配列を決定し、変異が導入されていることを確認した。

#### (6) 大腸菌で発現したRPIの精製

発現プラスミドpTV-RPIを持つ大腸菌JM109の一夜培養の前培養液を100 µg/ml ampicillin及び1 mM isopropylthiogalactosideを含む3% nutrient broth (Nissui)に3%接種し、30℃で24時間培養した。プロテアーゼは菌体の溶菌を伴いながら、培地中に分泌された。培地中の酵母溶解プロテアーゼは基本的に第2章で述べた方法によって精製した。簡単にその概要を述べると、培養液の遠心上清を80%飽和の硫酸で塩析し、生じた沈澱を集めた後、20 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 10% glycerolに溶解し、同じ緩衝液で透析した。生じた沈澱を速心で除いた後、TSKgel SP-5PW陽イオン交換カラムで分離した。吸着したタンパク質は、0から0.5 Mの塩化ナトリウムの直線的グラジエントで溶出した。活性のある画分(0.1から0.2 Mの塩化ナトリウム濃度)については、濃縮してから、TSKgel G3000SWのゲルろ過カラムにかけ、0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, 10% glycerolで溶出した。この分離条件でRPIは200から300 mlの溶離液で溶出される。精製された活性画分は、濃縮した後、使用するまで-20℃で保存した。精製酵素のN末端配列は、自動エドマン分解によるプロテインシーケンサー (Shimadzu PSQ-2) を用いて決定した。

#### (7) 酵素活性の測定

RPIの示すプロテアーゼ活性は、RPIに特異的な基質であるSuc-Ala-Pro-Ala-pNAを用いて、第3章に示した方法で測定した。酵母溶解活性は、*Saccharomyces cerevisiae* IFO2043を基質として、第2章に示した方法で測定した。酸化インスリンB鎖の分解パターン解析及びmannose-

agaroseクロマトグラフィーは、第3章に示した方法で行った。

#### (8) RPI及び変異RPIのイムノブロット解析

抗RPI抗体の作成は以下の様にして行った。*R. faecitabidus* YLM-50の培養液から精製した200 µgのRPIをFreund's complete adjuvant と混合してウサギに注射した。その後、4回にわたって100 µgのRPIをFreund's incomplete adjuvantと混合したものをboosterとして注射した。抗RPI抗体の力価を確認した後、血清を常法通りに採取し、非特異的な結合を除くために、pTV118Nを持った大腸菌JM109の抽出液で吸収操作<sup>11)</sup>を行った。イムノブロットに供するタンパク質はLaemli<sup>12)</sup>の方法でSDS-PAGEを行ってから、25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.05% SDSを含む緩衝液を用いてニトロセルロース膜へ電気泳動的にブロッティングを行った<sup>13)</sup>。プロットは、1%牛血清アルブミンをふくむTBS (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl) で30分間ブロッキングを行った後、TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) で200倍に希釈した抗RPI血清で30分間インキュベートした。プロット中のRPIの検出はアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体 (ProtoBlot, Promega) を用いて行った。



### 3 結果

#### (1) RPI遺伝子のクローニング

すでに決定されているRPIタンパク質のN末端アミノ酸配列から<sup>6)</sup>、RPI遺伝子のアンチセンス鎖と一致するオリゴヌクレオチドプローブを実験方法に示した様に作成した。このプローブを使用して*R. faecitabidus* YLM-50ゲノムDNAのサザン解析を行ったところ、プローブは1.9 kbの*Bam*HI断片及び1.7 kbの*Pst*I断片と強くハイブリダイズした。そこでまず、この1.9 kbの*Bam*HI断片をアガロースゲルから抽出してプラスミドベクターpUC118につなぎこみ、大腸菌を形質転換した後、同じプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングを行った。その結果、1種類のポジティブクローンpRP111を得た(Fig.1)。このpRP111の挿入断片の塩基配列を部分的に解析した結果、RPIのN末端アミノ酸配列に対応する配列が存在していたので、正しいクローンが取得されていることが確認された。しかし、この断片にはRPIのC末端部分が欠けていることもわかったので、pRP111の0.8 kb *Pst*I/*Bam*HI断片をプローブとして、*R. faecitabidus*ゲノムの1.7 kb *Pst*I断片をpUC118にクローニングし、pRP121とした(Fig.1)。予想されるように、pRP121の挿入断片は前記のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、また、pRP111ともハイブリダイズしたので、Fig.1に示したように、pRP111とpRP121は0.8 kb *Pst*I/*Bam*HI部分で重複していると考えられた。そこで、pRP121の1.7 kb *Pst*I断片と、pRP111を*Pst*Iで消化したものをライゲーションすることによって、完全長のRPI遺伝子を含むと考えられるプラスミドpRP201を作成した。pRP201を持つ大腸菌JM109は生酵母を含むLB寒天培地で長時間放置するとうすいハコを形成することから、RPI遺伝子は大腸菌の中でもわずかに発現しているものと考えられた。しかし、培地中にはプロテアーゼ活性自体は検出されなかった。



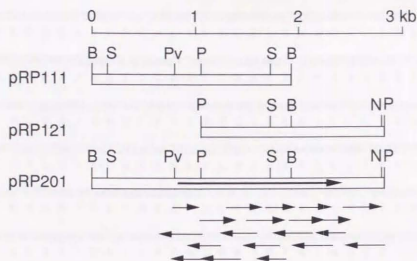


FIG. 1 Construction of plasmids and sequencing strategy.

The plasmids pRP111 and pRP121 contained 1.9 kb *Bam*HI and 1.7 kb *Pst*I fragment, respectively, of *R. faecitabidus* chromosomal DNA. The two plasmids were digested with *Pst*I and ligated, resulting in the pRP201, as described in the text. The large arrow represents the open reading frame of the RPI gene. The small arrows denote the extent and direction of the regions sequenced. The restriction enzymes used in these maps are *Bam*HI (B), *Sal*I (S), *Pvu*I (Pv), *Pst*I (P) and *Nru*I (N).

## (2) RPI遺伝子の塩基配列

pRP201の中でRPI遺伝子を含んでいる2 kbの*Pvu*I/*Pst*I部分についてダイデオキシ法により、Fig.1に示したストラテジーに従って、2本鎖の両方向について塩基配列を決定した。決定した塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列をFig.2に示した。この配列には525のアミノ酸からなる1575塩基のオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、その中央付近 (塩基番号634から732) にRPIのN末端のアミノ酸配列と完全に一致する配列が存在した (Fig.2枠線部分)。このORFではGTGが開始コドンとして使われており<sup>14)</sup>、この開始コドンの9塩基上流にはリボソーム結合部位と考えられる配列 (AAGG、塩基番号-12から-9)<sup>15)</sup>が存在した。ここで開始コドンとしたGTG以外にも5箇所のフレームの合うGTG

1 GTGAAGTGAAGAAGCCAGCGCGCTGTTCAAGTCGCGTCCGCTCGTCGGTCCCTCGTCCGCGCAAGCCTTCCGTCGGCCGACGGCC  
 1 M K C K K P S A L F S A L A L V G A L G A A S V L G A A S A  
 91 AACAGTGCCTCACCAGTGGCCGCGCTACAGTCAAGCATCAAGCGTTCCGCCAAGACATCCGTAGCTGCCACTCAAGTCCGACG  
 31 N S A S P V A A A T V O A S S G S A K T S V A A T S K S O D  
 181 GCGGATGTCTGGCGGAGATAGTGGAGATCTCAAGTCAAGAACACAGCGCAAGAAGCATCAAGCTCGAAGAAGCGCGCCAA  
 61 G D V L A A I V R D L K I T K T O A K K R I K L E E K A R O  
 271 GTCAACCGCGGCTCGAGAAGAACTCGGCAAGAAATTCGCGGCGCTGTGATCTCGAAGAAGCGCAAGAAGTGGTGTGGCGTGACC  
 91 L E P R L O K K L G K K F A G L W I S K N G K K I V V G T R  
 361 CGAAGAAGCCCGCAAGTGGTCAAGAAAGCGCGCGCAGCCCAAGATCGTCAAGTCAAGCTGACCAAGTGGTCAAGAAGCGCGCCAGC  
 121 T K K A A K V V K K A G A T P K I V K S N L T T L K K R A T  
 451 AAGATCTCGAAAAACACCCTCGGACATCAAGAATGTCAATTCTGGTGGGTGATCCCGCGACCAACAGGTGGTCAATCGAGCGCCAGC  
 161 K I S K N A P S D I K N V N S W W V D P A T N K V I E A R  
 541 TCGAAGAAGCCCGCAAGTGGTCAAGAAAGCGCGCGCAGCCCAAGATCGTCAAGTCAAGCTGACCAAGTGGTCAAGAAGCGCGCCAGC  
 191 S K K A A K A A A T A A G L T A G T Y E I T V S D D V I V P  
 631 GTCGCTGACTGTGGGCGGCGATGACTGTGGGATGACAGCTCGCGTCCCGGTCTACGCGGGTTCCTGACGCGCGGCGACTGCGCG  
 211 V R D Y W G G D A L S G C T L A F P V Y G G F L T A G H C A  
 721 GTTGAGGCAAGGGGACATCTGGAAGACGGAGATGACGCGCGCGCAGATCGAAGCGTCAAGCGCTCAAGCTCGACTGGCGACGCGCATTG  
 241 V E G K G H I L K T E M T G G O I G T V E A S O F G D G I D  
 811 GCGCGTGGCCCAAGCAACTACGGCATTGGAATGGACCGCGCGCTCAGCAGTGGAAAGTGGCGCGCGCTGCACATCAAGCGCTCG  
 271 A A W A K N Y G D W N G R G R V T H W N G G G G V D I K G S  
 901 AACGAGCGCGCTCGGGCGCATATGTGCAAGTCGGGACGCAAGCAAGTGGACTCGGTTACTCTGCGCAAGCGCTGAGCGT  
 301 N E A A V G A H M C K S G R T T K W T C G Y L L R K D V S V  
 991 AACTAAGGCAAGCGCACATCGTACGTTGAATGAGACCTCGGCTTGGCGGCTCGTGGCGGATCTGGGGCGCGTACGTGTGGAAGAT  
 331 N Y G N G H I V T L N E T S A C A L G G D S G G A Y V W N D  
 1081 CAGGCCAGGGCATCAAGTCCGATCCAACATGGACGCAACCAAGCTCCGCTCGTTCATCAAGCGGTGAACAGGTGCTGAAGAACTGG  
 361 O A O G I T S G S N M D T N N C R S F Y O P V N T V L N K W  
 1171 AAAGTGTGCTGTGACCTCGACCGTGAAGCAGCTCCTACGTTGAGGCGTACCAGAACTGATCGACGTGGCCACTCGGACTTC  
 391 K L S L V T S T D V T T S Y V O G Y Q N N C I D V P N S D F  
 1261 ACCGCAAGCAAGTGTGAGGCTGGAAGTGAAGCAAGCAAGCGCGCAAGGTTGCTTCCACCCGCGAGGACCTCGGCATCAAT  
 421 T D G K Q L O V W N C N G T N A O K V S F H P D G T L R I N  
 1351 GCGAAGTGCCTGATGCCGCTGGGCTGAGCGCAACGGGACCGAGGTCAGCTCATGAAGTCAAGCGCACATCGCCCAAGAGTTC  
 451 G K C L D A R W A W T H N G T E V O L M N C N G H I A O K F  
 1441 ACGCTTAAGTGGCGGGGATCTCGTCAAGTACAGCGCAACAGTGGTGTGAGTGAAGGACTGGGCGCGCAGGAGGCAACTACAA  
 481 T L N G A G D L V N V H A N K C V D V K D W G G O G G K L O  
 1531 CTGTGGAGTGCAGCGGAGGCAACCAAGAAATGGCGTAAAGTAAACCACTCCCTGACGGTGGGACTAGCGCGGACATCGACCA  
 511 L W E C S G G A N O K W W R R  
 1621 CCGGACCGGGTCTGATCGAACCTGTGCGGATCAGCAACCAGCGCTGCTGCTATGGCGTGGTGTGAGGGGCGGGCGGAGTTCG  
 1711 GCAGATCCAGGACCGCTGGGTGGATCGCGGACGGCAAGGACGATGGCTCACCTCGAAGGGCGCGCGCAATACCGGATGATG  
 1801 AAGTACATGGTCAATGGATCAATCGTGAAGGGCGTTGCCGCGGTTGATTCTTGGCGGATCGTGGTCAATTGTGGGACCGGAGC  
 1891 ACCTGACGTTGTCGCCCATCTGCTGATGGCATGGCGTGGTGTTCGACGCGCGCAACCGCGGCGTGCAGGAAACCGACTACACCG

**FIG. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the RPI gene.**

The nucleotide sequence of 2042 bp *PvuII/PstI* fragment is shown with the corresponding amino acid sequence. The sequences are numbered from the N-terminal of the preproenzyme. The boxed amino acids were identified by the N-terminal sequencing of the native RPI from *R. faecitabidus*. The arrows indicate a inverted repeat in the 3' flanking region.

が存在するが(塩基番号105, 202, 355, 379, 523)、これらのGTGには後述するようなシグナル配列が続いていないので、分泌タンパクであるRPIの開始コドンとしては適当でないと考えた。ORFの3'側には40塩基中30塩基がGまたはCという非常にGC含量の高い20塩基対のインヴェアティーッドリピートが停止コドンTAAの下流に存在しており(塩基番号1623から1671)、これがステムループ構造をとって転写停止にはたらいていることも考えられる<sup>16)</sup>。

ORFのGC含量は62.0%であり、この値は報告されている*R. faecitabidus*のゲノムのGC含量(65.7から66.1%)<sup>1)</sup>と類似している。ORF内の各コドンの中での塩基の位置によるGC含量を比較すると、第1塩基では54.9%、第2塩基では47.8%、第3塩基では83.4%となっていた。第1、第2塩基と比べて第3塩基のGC含量がきわめて高いが、これはMuto and Osawa<sup>17)</sup>によって指摘されているように、ゲノムのGC含量の高い細菌で一般的に認められている現象である。

### (3) RPI前駆体のアミノ酸配列

RPI遺伝子のORFは525アミノ酸からなっており、そのアミノ酸配列から計算した分子量は55,651であった。これは、SDS-PAGEで実測したRPIの分子量(35,000)に比べてかなり大きかった。アミノ酸配列のN末端部分には、分泌タンパク質に一般的に認められるシグナル配列と考えら

れる配列<sup>18)</sup>が存在した。すなわち、開始コドンの直後に正に荷電したアミノ酸が存在し (Lys2,4,5)、それに続いて疎水性のアミノ酸が連続していた (特にAla12からAla22)。成熟型RPIのN末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列はArg212からであるので、Met1からVal211までの211アミノ酸は、細菌のセリンプロテアーゼに一般的に見られる<sup>19)</sup>プレプロ配列であると考えられる。プレプロ配列としては、211アミノ酸というのはかなり長いほうである。成熟型RPIに相当するArg212からArg525までの314アミノ酸からなるタンパク質の分子量は33,855と計算され、実測値とはほぼ等しかった。このことからRPIには、ある種のセリンプロテアーゼに存在することが知られているC末端プロ配列<sup>20, 21)</sup>は存在しないことが示唆された。また、プロ配列の最後のアミノ酸はValであり、これはRPIが好むアミノ酸のひとつである<sup>6)</sup>ことを考えると、プロ配列と成熟型アミノ酸の間のプロセッシングは、他のセリンプロテアーゼで知られているように<sup>19)</sup>、RPI自身で行っていることも考えられる。

#### (4) 他のタンパク質とのアミノ酸配列のホモロジー

塩基配列から決定されたRPIのアミノ酸配列をNational Biological Research Foundation/Protein Identification Resource (NBRF/PIR)及びProtein/Peptide Sequence Data Base (PRF/SEQDB)に登録してあるアミノ酸配列データベースとホモロジーサーチを行った。その結果、RPIのN末端側と相同性のあるタンパク質、C末端側と相同性のあるタンパク質の両者が存在することがわかった。

まず、RPIのN末端側は、Fig.3に示したように、細菌のセリンプロテアーゼである、*Lysobacter enzymogenes*  $\alpha$ -lytic protease<sup>22)</sup>及び*Streptomyces griseus* protease A及びB<sup>23)</sup>とホモロジーがあった。Fig.3に示したように、プレプロRPIのArg212からSer397にわたる186アミノ酸のうち38.1%のアミノ酸が $\alpha$ -lytic proteaseと同一であった。とりわけ、 $\alpha$ -lytic proteaseの活



```

RPI (212) RDYWGGDALSGCTLAFFV—YGGFLTAGHCAVEGKGI LKTEM TGGI GTVE
          * * * * *
ALP (6) GIEYS I NNASLCSVGF SVTRGATKGFV TAGHC—GTVNA—TARI GGAVVGTFA

RPI      ASOFGDG I DAAWAKNYGDWNGRGRVTHWNGGGVD I KGSNEAAVGAHMCKSGRT
          * * * * *
ALP      ARVF—PGNDRAWVSLTSAQTL LPRVA—NGSSFVTVRGSTEAAVGAAVCRSGRT

RPI      TKWTCGYLLRKDVSVNYGNH I VTLNETSACALGGD SGGAYV—WNDQAQ I TSG
          * * * * *
ALP      TGYOCGT I TAKNVTANYAEGAVRGLTOGNACMGRGD SGGSW I TSAGQAQGVMSG

RPI      SNMDT—NNC———RSFYQPVNTVLNKWKL S LVT S (397)
          * * * * *
ALP      GNVQSNGNCG I PASQRSSLFERLQPI LSOYGLSLVTG (198)

```

FIG. 3. Sequence comparison of the mature enzymes of RPI with *Lysobacter enzymogenes*  $\alpha$ -lytic protease.

Asterisks between sequences indicate identical amino acids. The amino acid numbering relative to the N-terminal amino acid is presented in the parentheses. *Rarobacter*, protease I (RPI), *L. enzymogenes*  $\alpha$ -lytic protease (ALP). The putative catalytic amino acid residues (His, Asp and Ser) are shadowed.

性中心を構成しているアミノ酸残基 (His238, Asp270, Ser352、RPIのアミノ酸番号で表示) の付近及び、3箇所のジスルフィド結合を構成している6個のシステイン残基 (Cys223, 239, 310, 320, 346, 376) はよく保存されていた。これらのプロテアーゼは一次構造上からトリプシン族のセリンプロテアーゼであることがわかっている<sup>24)</sup>ので、RPIも一次構造的にはトリプシン型のセリンプロテアーゼであるということが出来る。 $\alpha$ -lytic proteaseはRPIと基質特異性が類似していることを考えると、この両者のホモロジーは興味深い。



```

GLC (422) GTGALRIGSTLCLDVPWADPTDTNOVOLATCSG-NAAQW-TRGTDGTVRALGK
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RPI (401) TTSYVOGYQNNCLDVPNSDFTDGKQLQVWNCNG-TNAQKV-SFHPDGLTRINGK
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RCB (313) IVRIVG-RNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLPCKSNTDANQLWTLKRDNTIRSNKG

GLC      CLDVARSGTADGTAVWIY-TQNGTGAOKWYDSATKALRNPSGKCLDAQGGAP
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RPI      CLDARAWATHNGTEVQLM-NCNGHIAQKFTLNGAG-DLVNVHANKCVDVKDWGG
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RCB      CLTT-YGYSP-GVYV-MIYDCNTAATDATRWOIWDNGTIINPRSSLVLAATS-G

GLC      LRDGQKVLWTQNOTEAQRWTL (548)
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RPI      -OGGKLOLWECSGGANOKWRR (525)
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RCB      NSGTTLTV-QTNIYAVSQGW (434)

```

FIG. 4. Sequence comparisons of the C-terminal region of RPI with *Oerskovia xanthineolytica*  $\beta$ -1,3-glucanase and ricin B-chain.

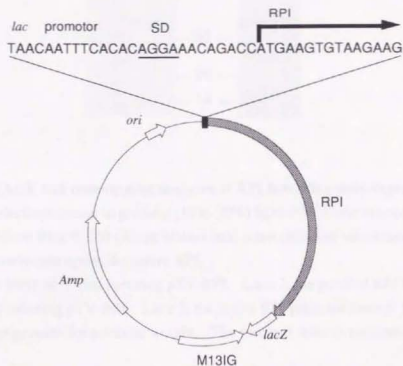
Asterisks between sequences indicate identical amino acids. The amino acid numbering relative to the N-terminal amino acid is presented in the parentheses. *O. xanthineolytica*  $\beta$ -1,3-glucanase (GLC) *Rarobacter* protease I (RPI), ricin B-chain (RCB). Conserved cysteine residues are shadowed.

つぎに、RPIのC末端側部分は、*Oerskovia xanthineolytica* の  $\beta$ -1,3-glucanase<sup>25)</sup> のC末端側部分及び、ヒマ種子の細胞毒性レクチンであるリシンB鎖<sup>26)</sup> のN末端側部分と相同性があった。Fig.4に示したように、 $\beta$ -1,3-glucanaseに対しては、プレプロRPIのCys412からArg525にわたる114アミノ酸の部分で41.2%のアミノ酸が一致していた。また、リシンB鎖に対しては、Cys412からAsn473の62アミノ酸の中で37.1%が一致していた。とりわけ、この領域に存在する6個のシステインの位置 (Cys412,

431, 453, 472, 496, 514) はよく保存されていた。これらのシステインのうち4個 (Cys412-431, 453-472) はリシンB鎖でジスルフィド結合を形成していることが知られているので<sup>27)</sup>、これらのシステインはRPIにおいてSS結合を形成していて、立体構造の構築に重要な役割を果たしている可能性がある。RPIにマンノース結合活性があることを考えると、RPIのC末端部分にレクチンとのホモロジーがあることは、この部分がマンノースとの結合に寄与していることを示唆するものである。

#### (5) 大腸菌でのRPI遺伝子の発現

クローニングした遺伝子を大腸菌内で発現させることは、タンパク質の構造と機能の関係を調べるためにきわめて有効な方法であるが、RPI遺伝子は、それ自身のプロモーターを使った場合には大腸菌でほとんど発現しなかった。そこで、大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼのプロモーター及びリボソーム結合部位を用いてRPIを発現させた。RPI遺伝子の第2コドンから*Nru*IサイトまでのDNA断片を実験方法に示した方法で作成し、発現ベクターpTV118Nの*Nco*Iサイトを平滑末端にしたものにつなぎ込んだ。これによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの開始コドンの直後にRPIの第2コドンがくるようになった (Fig.5)。作成した発現プラスミドpTV-RPIで大腸菌JM109を形質転換し、生じた形質転換体を、IPTGを加えた培地で培養すると、培地中にプロテアーゼ活性が誘導された。一方、IPTGを添加しない場合は、培地中にプロテアーゼ活性は全く検出されなかった。1夜培養の前培養液をIPTGを含む新鮮培地に5%添加し、30℃、24時間培養すると、培地中のプロテアーゼ活性は0.030 unit/mlに達した。この値は、精製RPIの比活性から計算するとRPI 2 mg/lに相当する。IPTGでRPIの発現を誘導した大腸菌の増殖は遅くなり、培養後期では溶菌する傾向があった。



**FIG. 5. Construction of the expression vector, pTV-RPI.** The RPI gene was expressed under the control of  $\beta$ -galactosidase promoter. The DNA fragment from the second codon to *Nru*I site of the RPI gene was synthesized by the primer repair method and ligated into the *Nco*I site in the expression vector pTV118N. RPI is translated from ATG using the promoter and ribosome-binding site of *lacZ*.

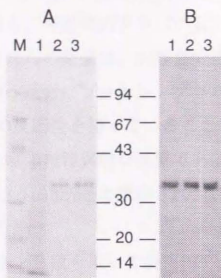


FIG. 6. SDS-PAGE and immunoblot analyses of RPI heterologously expressed in *E. coli*. Proteins were electrophoresed in gradient (10 to 20%) SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (A), or blotted onto nitrocellulose membrane and immunostained with a antiserum against the native RPI.

Lane 1, culture broth of *E. coli* harboring pTV-RPI. Lane 2, the purified RPI from culture broth of *E. coli* harboring pTV-RPI. Lane 3, the native RPI prepared from *R. faecitabidus*. Lane M, marker proteins for molecular weight. The numbers refer to molecular weight.

#### (6) 大腸菌で発現したRPIの解析

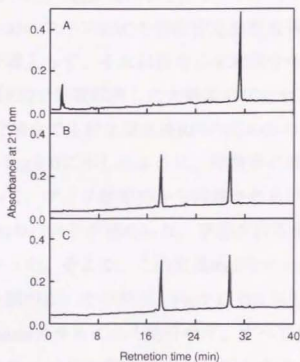
大腸菌で発現させた組換え型RPIを実験方法に示した方法で精製し、その性質を調べ、*R. faecitabidus* のRPI (以下native RPIとする) と比較した。まず、組換え型RPIのN末端アミノ酸配列を決定したところ、RDYWGGDALSGXTLAFPVYGGFLTであり、native RPIのN末端配列と全く同じであることがわかった。組換え大腸菌の培養液をSDS-PAGEにかけイムノプロットで解析すると、Fig.6に示したように、培養液中に抗RPI抗体と反応する分子量35,000のタンパク質が存在していた (B, lane 1)。大腸菌から精製した組換えRPIはnative RPIとほとんど同じ電気泳動移

動度を示し、どちらの分子量も35,000と計算された (A, lane 2, 3)。また、精製した組換RPIも、培養液のタンパク質と同様に抗RPI抗体と反応した (B, lane 2)。これらの結果は、大腸菌で生産された組換RPIのプロペロ体が成熟型のRPIへ正常にプロセシングされ、native RPIと同じN末端、分子量、抗体との反応性を持っていることを示している。組換RPIのプロテアーゼ活性は、RPI特異的な基質であるSuc-Ala-Pro-Ala-pNAを基質とした比活性で13.0 units/mgと測定され、17.0units/mgのnative RPIとそれほど差はなかった。

次に、酸化インスリンB鎖を用いて組換RPIとnative RPIの基質特異性の差異を検討した。基質である酸化インスリンB鎖を酵素で分解した後、生じたペプチドを逆相クロマトグラフィーの溶出パターンで比較した。Native RPIは反応の初期段階で、酸化インスリンB鎖のVal18-Cya19の結合を特異的に分解し、Fig.7 Bに示したように2個のピークを生じる。Fig.7 Cのように、組換RPIもnative RPIと全く同様の溶出パターンを示したので、組換RPIの基質特異性はnative RPIのそれと変わらないことがわかった。

さらに、RPIの大きな特徴であるマンノース結合活性についても、native RPIと組換RPIで差がないことが示された。Fig.9 A, Cに示したように、組換RPIはmannose-agaroseカラムに結合し、1 Mの $\alpha$ -methyl-mannosideで溶出された。各フラクションのイムノプロットの結果は、カラムに結合したタンパク質が確かにRPIであることを示している。また、組換RPIには後述するように実際に酵母溶解活性があった (Fig.10)。以上の結果は、大腸菌で発現させた組換RPIが、構造上も機能の点でもnative RPIとほとんど差がないことを示している。また、Native RPIとほとんど差のない組換RPIができたことは、N末端の疎水性配列が実際にシグナル配列として働いており、ここで示したORFの決定が正しかったことも示している。



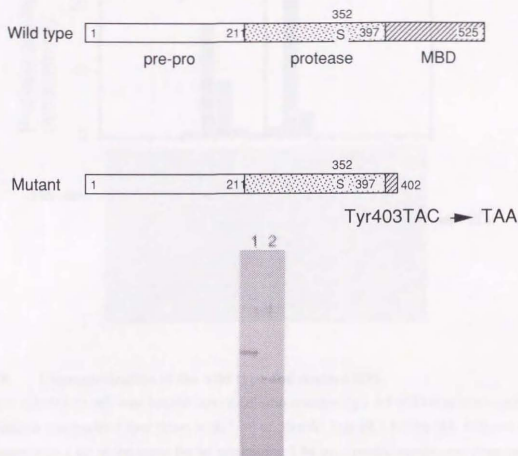


**FIG. 7** Elution profiles of hydrolysates of oxidized insulin B-chain with RPI on reverse phase chromatography.

Enzyme and oxidized insulin B-chain (1 : 500) were incubated at 30°C for one hour in 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0). The resultant hydrolysate was analyzed by HPLC equipped with a reverse phase column ( $\mu$ Bondasphere C18 100Å, Waters). Peptide were eluted with a linear gradient of 5 to 50% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at 1.0 ml/ml of flow rate. A, the control without enzyme; B, the hydrolysate with the native RPI; C, the hydrolysate with the heterologously expressed RPI in *E. coli*.

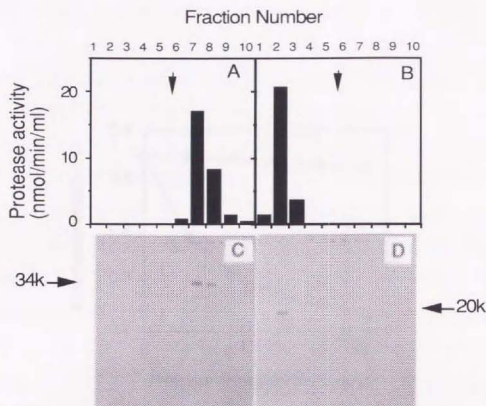
### (7) C末端ドメインの機能の解析

アミノ酸配列のホモロジー解析の結果から、C末端ドメインが酵母溶解活性に必要なマンノース結合部位として働いている可能性が示唆されたので、これを確かめるために、この部分を欠失した変異RPIを作成して、その性質を調べた。Fig.8 Aに示したように、プロテアーゼドメインの直後にあるTyr403のコードンTACを部位指定突然変異によってTAAに変えて停止コードンを導入して、それ以後のC末端部分のないプロテアーゼを作成した。変異RPIで形質転換した大腸菌のプロテアーゼ活性の生産はIPTGで誘導した場合でも野生型組換えRPIの約10分の1の100  $\mu\text{g/l}$ にとどまった。しかし、Fig.8 Bに示したように、培養液のSDS-PAGE後のイムノブロットによって、アミノ酸配列から計算される分子量20,225とほぼ等しい分子量22,00のバンドが認められ、予想される変異RPIが生成されていることがわかった。そこで、この変異RPIのマンノース結合活性及び酵母溶解活性を調べた。その結果、Fig.9 C, Dに示したように、変異RPIはmannose-agaroseカラムに全く結合せず、すべて素通り画分に溶出された。また、このバンドは抗RPI抗体と反応したことから、このプロテアーゼ活性が変異RPIによるものであることが確認された。変異RPIの酵母溶解活性を野生型組換えRPIと比較すると、Fig.10に示したように、プロテアーゼ活性として同じ量を添加した場合、野生型組換えRPIは生酵母を分解するが、変異RPIには全く酵母溶解活性がないことがわかった。これらの結果は、RPIのC末端ドメインが実際にマンノース結合活性に必要であり、またそれが酵母溶解活性に必要であることを示している。



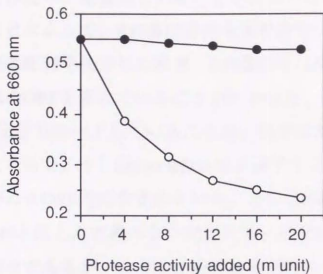
**FIG. 8 Structure of the wild type and mutant RPI.**

A, the domain structure of the wild type and mutant RPI are schematically illustrated. The wild type RPI consists of a pre-pro region (1 - 211), a protease domain (212 - 397) and a mannose-binding domain (MBD, 398 - 525). The catalytic amino acid is thought to be Ser352. The mutant RPI lose almost all of the putative mannose-binding domain by the introduction of a stop codon at the position of Tyr403 by the site-directed mutagenesis. B, a 20  $\mu$ l of aliquote of culture broth from the wild type (lane 1) and mutant RPI (lane 2) was loaded onto a 10% SDS-PAGE and immunodetected as in Fig. 6.



**FIG. 9. Characterization of the wild type and mutant RPI.**

Enzyme solution (1 ml) was loaded onto a column containing 1 ml of D-mannose-agarose . The column was washed four times with 1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted five times with 1 ml of the same buffer containing 1 M  $\alpha$ -D-methylmannoside after the fraction indicated by the arrow. A and B, Protease activity of each fraction was measured using Suc-Ala-Pro-Ala-pNA as a substrate. C and D, an aliquotes of each fraction was electrophresed on a 10% SDS-PAGE and immunodetected as in Fig. 6. A, C;the wild type RPI, B,D;the mutant RPI



**FIG. 10. Yeast lytic activity of the wild-type and mutant RPI.**

Yeast-lytic activities of the wild type and mutant RPI were assayed as described previously. The enzyme and viable yeast cells were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.6 M sorbitol at 30 °C for one hour. After the addition of water to disrupt osmotic sensitive cells, the absorbance at 660 nm was measured as an indicator of cell lysis. The amount of enzyme added was shown in the protease activity.

Symbols ; the wild type RPI(o), the mutant RPI (•).



#### 4 考察

RPIのN末端アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブを用いて、*Rarobacter faecitabidus*のライブラリーをスクリーニングすることによって、1.9 kb *Bam*HI断片及び1.7 kb *Pst*I断片をクローニングした。これらの断片は互いに重複していることがわかったので、これらをつなぎ合わせることによって、RPI遺伝子の全体を含むプラスミドpRP201を作成した。塩基配列を決定した結果、RPI遺伝子は525個のアミノ酸からなる1575塩基のORFを含んでいることがわかった。このORFが実際にRPIの構造遺伝子をコードしていることは、以下にあげたような実験事実から明かとなった。1) native RPIのN末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列がこのORF内に含まれていた。2) このORFを大腸菌で発現させると、RPIとほとんど差のないプロテアーゼが生産された。3) RPIは分泌タンパクであるが、このORF内には分泌のシグナル配列と考えられる配列が存在した。4) RPIはセリンプロテアーゼであるが、実際にセリンプロテアーゼのコンセンサス配列が存在した。

グラム陽性細菌から分泌されるセリンプロテアーゼの多くは、そのN末端にシグナル配列とプロ配列を持っている<sup>19)</sup>。シグナル配列は分泌タンパク質が細胞質膜を通過するのに重要な役割を果たしており、プロ配列はタンパク質が適正に折り畳まれることに関与していると考えられている。予想されるように、プレプロRPIのN末端にはシグナル配列と考えられる疎水性アミノ酸のかたまりがあり、それに続いて、成熟型酵素では分解されていて見いだすことのできないプロ配列が存在していた。プロプロテアーゼから成熟型プロテアーゼへのプロセッシングは、subtilisin<sup>28)</sup>や  $\alpha$ -lytic protease<sup>29)</sup>では、自己消化によって行われていることが知られている。RPIの場合も切断点の直前がバリジンであり、これはRPIが好むP1部位のアミノ酸の一つであることから、自己消化によってプロ

センシングが行われていることが考えられる。

RPI遺伝子自身のプロモーターを使用した場合、大腸菌では解析できるだけの量のプロテアーゼが分泌されなかったので、大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターを用いてRPI遺伝子の大腸菌内での発現を試みた。大腸菌では、多くの分泌タンパクがペリプラズムに保持されており、培地中には放出されないことが知られているが、IPTGで誘導して発現させたRPIは培地中に検出された。大腸菌における培地へのプロテアーゼの生産は、基質特異性の類似したプロテアーゼである $\alpha$ -lytic proteaseの発現の場合にも認められている<sup>29)</sup>。この場合、ペリプラズム内の他の酵素も遊離してくることから、このプロテアーゼは、膜の損傷などによって外膜を非特異的に通過してくるのであろうと考察されている。RPIの場合は、培養後期には培養の吸光度が減少してくることから考えて、RPIによって大腸菌の溶菌が生じ、それにとまってプロテアーゼが遊離してくるものと考えられる。大腸菌で生産した組換えRPIは、N末端アミノ酸配列、電気泳動移動度、抗体との反応性、酸化インスリンB鎖の分解パターン、mannose-agaroseカラムへの吸着、酵母溶解活性のいずれの点でもnative RPIと差は認められなかった。

塩基配列から決定されたアミノ酸配列をデータベースでホモロジー検索した結果、RPIはN末端側のセリンプロテアーゼドメインとC末端側のマンノース結合ドメインから構成されているという、非常にユニークな構造のプロテアーゼであることが明らかになった。まず、RPIのN末端側は、*Lysobacter enzymogenes*の $\alpha$ -lytic proteaseと相同であった。このプロテアーゼは、トリプシン・キモトリプシン族のセリンプロテアーゼであることが知られており、分子量が比較的小さく立体構造も明らかになっていることから、タンパク質工学のモデルタンパク質として詳しく研究されている<sup>30)</sup>。RPIのアミノ酸配列にこのグループのプロテアーゼに特有の活性中心付近のアミノ酸モチーフ (TAGHC及びGDSGG)<sup>24)</sup>が

H238及びS352で認められた。さらに  $\alpha$ -lytic proteaseで3個のジスルフィド結合を形成している6個のアミノ酸の位置もよく保存されていた。RPIと  $\alpha$ -lytic proteaseの基質特異性が類似していることを考えると、プロテアーゼとしての基質結合部位、触媒部位などの立体構造は両者の間で類似している可能性がある。RPIのN末端側は  $\alpha$ -lytic proteaseと類似の構造のプロテアーゼドメインを形成しているものと考えられる。

一方、RPIのC末端側はプロテアーゼとは系統的に考えて全く無関係のタンパク質とホモロジーがあった。一つは *Oerskovia Xanthineolytica*の酵母溶解酵素である  $\beta$ -1,3-glucanaseであり、もう一つは *Ricinus communis*のリシンB鎖である。これらのタンパク質には特徴的なアミノ酸モチーフは認められなかったが、*O. xanthineolytica*の  $\beta$ -1,3-glucanaseにおける6個のシステイン、リシンB鎖における4個のシステインの位置は保存されていた。Shenらは、<sup>25)</sup>*O. xanthineolytica*の  $\beta$ -1,3-glucanaseのC末端領域にヒマ種子のアグルチニンとホモロジーのある部分があり、それらがこの酵素の酵母溶解活性に必要であることを報告している。しかし、彼らは酵母溶解活性とレクチンとの関係については特に考察しておらず、グルカンへの吸着への関与を示唆している。一方、RPIはマンノース結合タンパクであることがわかっていたので、レクチンとのホモロジーは直接この領域が糖への結合に関与していることを示唆している。部位指定突然変異によってC末端ドメインを欠失させた変異RPIは、マンノース結合活性だけでなく酵母溶解活性も失った。以上の結果から、このC末端部分をマンノース結合ドメインと呼ぶことができるであろう。

以上述べてきたように、RPIはN末端側のセリンプロテアーゼドメインとC末端側のマンノース結合ドメインからなっていることがわかった。また、マンノース結合ドメインの存在は、マンノースへの結合のみならず酵母の溶解にも必要であった。このようなレクチン様の糖結合活性を持ったプロテアーゼについての報告はきわめて少なく、わづかにカ

プトガニの体液凝固因子factor C<sup>31)</sup>について報告されているのみである。このfactor Cはリポポリサッカライドに結合することによって活性化され、体液凝固にいたる一連のカスケード反応の最初の引き金となるプロテアーゼである。しかし、構造的には、RPIと全く異なり、C末端にプロテアーゼドメインを持つという血液凝固・線溶系プロテアーゼに特徴的な構造を持っている<sup>32)</sup>。また、レクチンドメインの一次構造はほ乳動物のレクチンの1種であるC型レクチンに類似している。従って、RPIは、N末端側にプロテアーゼドメインを持ち、植物レクチンに類似したレクチンドメインを持つ、ユニークなプロテアーゼであるといえる。

RPIに類似した活性を持つ*O. xanthineolytica*のプロテアーゼは、自己消化によって、プロテアーゼ活性には変化がないものの、セファデックスへの吸着性及び酵母溶解活性を失うことが知られている<sup>33,34)</sup>。RPIにはC末端側にマンノース結合ドメインがあることを考えると、*O.*

*xanthineolytica*のプロテアーゼにもプロテアーゼドメインとマンノース結合ドメインが存在し、この二つのドメイン間のスパーサー部分が自己消化によって分解されることが示唆される。その結果、プロテアーゼはマンノース結合ドメインを失い、従って酵母溶解活性も失うものと考えられる。RPIの場合は酵母溶解活性を失ったプロテアーゼは検出されないことから、両ドメイン間のスパーサー部分に自身で分解することのできるペプチド結合がないのであろう。

RPIにプロテアーゼ活性とマンノース結合活性の両者が存在することから、RPIの本来の基質となっているのは酵母細胞壁のマンナンタンパク質であることが推察される。酵母の細胞壁には多種類のマンナンタンパク質が含まれているが、それらは大きくSDS可溶性のものとグルカナール可溶性のものに分けることができる<sup>35)</sup>。RPIの本来の基質は現在のところ不明である。しかし、それが分解されることによって細胞が死滅してしまうことを考えると、細胞壁の構築に大きな役割を果たしているこ



とは明かである。RPIの本来の基質を探索することによって、今後、酵母細胞壁の構造と機能に関する新しい知見が得られるであろう。



## 5 要旨

*R. faecitabidus* protease Iは生酵母に対して溶解作用を示すセリンプロテアーゼである。RPIの基質特異性はエラスターゼに類似している。また、特徴的な性質として、RPIはマンノースに対してレクチン様のアフィニティーを持っている。RPIの構造と機能について検討を加えるために、その遺伝子をクローニングし、その解析を行った。塩基配列を決定したところ、525アミノ酸からなるオープンリーディングフレームが存在することがわかった。ホモロジー解析の結果、プレプロRPIは以下の3つのドメインからなることがわかった。1)成熟RPIには認められないN末端のプレプロドメイン、2)トリプシン族のセリンプロテアーゼと相同なプロテアーゼドメイン、3) *Oerskovia xanthinelytica*のグルカナラーゼのC末端部分及びヒマ種子のレクチンであるリシンB鎖と相同性のあるC末端ドメインである。RPI遺伝子はそのままでは大腸菌内でほとんど発現しなかったが、大腸菌のlacプロモーターの制御下でIPTGによって誘導され、活性のあるRPIが培地中から回収された。そこで、RPIのC末端部分の機能を調べる目的で、部位指定突然変異によってこの部分を欠失した変異RPIを作成したところ、変異酵素はプロテアーゼ活性は保持していたが、マンノース結合活性と酵母溶解活性の両方を失っていた。このことは、C末端ドメインが実際にマンノース結合活性に関与しており、マンノース結合活性が酵母溶解活性に必要であることを示している。

6 文献

1. Yamamoto, N., Sato, S., Saito, K., Hasuo, T., Tadenuma, M., Suzuki, K., Tamaoka, J., and Komagata, K. (1988) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 7-11
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
3. Berger, S.L., and Kimmel, A.R, eds. (1987) *Methods Enzymol.* **152**
4. Vieira, J., and Messing, J. (1987) *Methods Enzymol.* **153**, 3-11
5. Maki, M., Takano, E., Mori, H., Sato, A., Murachi, T., and Hatanaka, M. (1987) *FEBS Lett.* **223** 174-180
6. Shimoi, H., and Tadenuma, M. (1991) *J. Biochem.* **110**, 608-613
7. Henikoff, S. (1984) *Gene* **28** 351-359
8. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
9. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* pp. 18.3-18.10, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
10. Nakamaye, K., and Eckstein, F. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14** 9679-9698
11. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* pp. 12.25-12.26, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
12. Laemli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
13. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354
14. Kozak, M. (1983) *Microbiol. Rev.* **47**, 1-45
15. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B.S., and

- Stormo, G. (1981) *Ann. Rev. Microbiol.* **35**, 365-403
16. Holmes, W.M., Platt, T., and Rosenberg, M. (1983) *Cell* **32**, 1029-1032
17. Muto, A. and Osawa, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 166-169
18. von Heijne, G. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683-4690
19. Wandersman, C. (1989) *Molec. Microbiol.* **3**, 1825-1831
20. Ohara, T., Makino, K., Shinagawa, H., Nakata, A., Norioka, S., and Sakiyama, F. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20625-20631
21. Terada, I., Kwon, S.T., Miyata, Y., Matsuzawa, H. and Ohta, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6576-6581
22. Silen, J.L., McGrath, C.N, Smith, K.R. , and Agard, D.A. (1988) *Gene* **69**, 237-244
23. Henderson, G., Krygsman, P., Liu, C.J., Davey, C.C., and Malek, L.T. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 3778-3784
24. James, M.N.G., Delbaere, L.T.J., and Brayer, G.D., (1978) *Can. J. Biochem.* **56**, 396-402
25. Shen, S.H., Chrétien, P., Bastien L., and Slilaty S.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1058-1063
26. Lamb, F.I., Roberts L.M. , and Lord J.M. (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 265-270
27. Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N.H., Hamlin, R., and Robertus. J. D. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5398-5403
28. Power, S.D., Adams, R.M., and Wells, J.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3096-3100
29. Silen, J.L., Frank, D., Fujishige, A., Bone, R., and Agard, D.A. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 1320-1325
30. Bone, R., Silen, J.L., and Agard, D.A. (1989) *Nature* **339**, 191-195

31. Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y., and Iwanaga, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6554-6561
32. Furie, B., and Furie, B.C. (1988) *Cell* **53**, 505-518
33. Obata, T., Iwata, H., and Namba, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2387-239428.
34. Kitamura, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2093-2099
35. De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., and van den Ende, H., (1990) *Yeast* **6**, 491-499

## 論文の要旨

*Rarobacter faecitabidus*は酵母を用いた廃水処理システムから分離されたヘム化合物要求性のコリネ型細菌であり、酵母に吸着した後、細胞壁を溶解し、酵母菌体を栄養源として増殖する。本菌の分類学的地位については山本の詳細な研究があるが、酵母溶解の機構については不明であった。また、他の微生物の生産する酵母溶解酵素についても、主として $\beta$ -1,3-グルカナーゼとプロテアーゼが関与していることが知られているが、数種の $\beta$ -1,3-グルカナーゼがクローニングされているのみで、プロテアーゼの構造についての知見はほとんどない。本研究では、*R. faecitabidus*の生産する酵母溶解酵素のうちプロテアーゼI (RPI)の構造と機能について検討し、本酵素がN末端側にプロテアーゼドメイン、C末端側に糖結合ドメインを持つ特異な構造を持つプロテアーゼであることを明らかにした。

### 1 *R. faecitabidus*の酵母溶解酵素の精製

*R. faecitabidus*の培養ろ液から、2種類のセリンプロテアーゼ (RPI、RPII)と1種類の $\beta$ -1,3-グルカナーゼを精製した。それらのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量は、それぞれ、35,000、33,000、82,000であった。どちらのプロテアーゼも単独で酵母を溶解したが、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼは単独では酵母溶解活性を示さなかつ



た。しかし、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼと2種類のプロテアーゼのどちらかを併用すると、これらの酵素は相乗的に作用し、酵母細胞は完全に溶解された。

## 2 *R. faecitabidus* の酵母溶解プロテアーゼ I の性質

*R. faecitabidus* の主要な酵母溶解性プロテアーゼであるプロテアーゼ I (RPI) の酵素的性質を調べた。N末端アミノ酸配列は、*Lysobacter enzymogenes*  $\alpha$ -リティックプロテアーゼ並びに *Streptomyces griseus* プロテアーゼ A 及び B と活性中心のヒスチジン付近で相同であった。各種アミノ酸のパラニトロフェニルエステルを基質とした場合、アラニン、ロイシン、バリンなどの脂肪族アミノ酸のエステルをもっとも速く分解し、エラスターゼと類似していた。実際に、エラスターゼ特異的な合成基質である Suc-Ala-Pro-Ala-pNA をよく分解し、その  $K_m$  及び  $K_{cat}$  はそれぞれ、5.7 mM 及び  $19.8 \text{ s}^{-1}$  であった。酸化インスリン B 鎖を基質とした場合も、反応の初期段階において、18番目のバリンと19番目のシステイン酸間のペプチド結合のみを分解するという特異的な分解パターンを示した。

また、RPI は酵母菌体に吸着するのに対し、エラスターゼは吸着しなかった。酵母表層の主成分はマンナンタンパクであるので、RPI のマンノースに対するアフィニティーを検討したところ、RPI はマンノースアガロースカラムに吸着し、D-マンノースや D-グルコースに

よって特異的に溶出された。また、本酵素の酵母溶解活性は、これらの糖類によって阻害された。これらの結果は、RPIがレクチン様のマンノース結合能を持ったプロテアーゼであることを示している。

### 3 酵母溶解プロテアーゼI (RPI) の構造と機能

#### (1) RPI遺伝子のクローニング

RPIのN末端アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを合成し、コロニーハイブリダイゼーションによって1.9 kb *Bam*HI断片をクローニングした。部分シーケンスの結果、この断片はRPIのN末端部分を含んでいた。C末端部分を取得するため、この断片とハイブリダイズする1.7 kb *Pst*I断片をクローニングした。1.9 kb *Bam*HI断片と1.7 kb *Pst*I断片はオーバーラップしていたので、ライゲーションすることによって、RPI遺伝子の全長をカバーするプラスミドpRP201を作成した。

#### (2) RPIの一次構造

塩基配列の解析の結果、RPIをコードしていると考えられる1575塩基、525アミノ酸からなるORFが存在していた。開始コドンはGTGで、開始コドンのすぐ下流にはシグナル配列と考えられる疎水性アミノ酸が連続していた。成熟タンパクのN末端アミノ酸配列と一致する配列の位置から、211アミノ酸のプレプロ部分が存在することがわかった。プレプロ部分の切断点はバリンであり、RPIの分解しやすい

アミノ酸になっていた。成熟タンパクはアルギニンから始まる314アミノ酸からなっており、アミノ酸配列から推定される分子量は33,855で、SDS-PAGEによる測定値35,000とよく一致した。終始コドンの3'側には、ターミネーターと考えられる大きなインバーティド・リピートが存在した。

各種データベースとアミノ酸配列のホモロジー検索を行った結果、RPIのN末端側は*L. enzymogenes*の $\alpha$ -リティックプロテアーゼとホモロジーを示した。活性中心付近の配列は特にホモロジーが高く、RPIがトリプシン・キモトリプシン属のセリンプロテアーゼであることが確認された。RPIのN末端側186個のアミノ酸で $\alpha$ -リティックプロテアーゼに類似した構造のプロテアーゼドメインを形成していると考えられた。

一方、RPIのC末端側は、*Oerskovia xanthineolytica*の $\beta$ -1,3-グルカナーゼのC末端側及びリシンB鎖のN末端側とホモロジーを有していた。*O. xanthineolytica*の $\beta$ -1,3-グルカナーゼのC末端側は本酵素の酵母溶解活性の発現に必要であることが報告されているが、その生化学的機能は不明である。一方、リシンはヒマ(*Ricinus communis*)種子に存在する細胞毒性レクチンであり、B鎖は2個のラクトース結合ドメインが直列につながった構造をしている。RPIとのホモロジーはそれほど高くないが、ジスルフィド結合に関与する4個のシステインは保存されており、RPIがマンノース結合能をもっていることと考えあわせると、R

RP IのC末端側は糖結合ドメインを形成していることが考えられる。

### (3) RP I 遺伝子の大腸菌での発現とその性質

RP I 遺伝子の全長を含むプラスミド pRP 201 を持つ大腸菌の培養液からはプロテアーゼ活性を検出できなかった。そこで、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーター及びSD配列を利用してRP Iを発現させたところ、IPTGによる誘導によってプロテアーゼ活性が培地中に生産された。大腸菌で生産されたRP Iは、SDS-PAGE及びイムノブロットではRP Iと区別できず、酸化インスリンB鎖の分解パターンにも差が見られないことから、本来のものと構造及び機能の点で同等であると考えられた。

### (4) RP IのC末端側ドメインの機能

RP IのC末端側ドメインの機能を調べるために、部位指定突然変異によってRP Iの404番目のTy r (TAC) をストップコドン (TAA) に変異させて、C末端側ドメインが欠失した変異RP Iを作成し、その性質を調べた。未変異RP Iはマンノース・アガロースに吸着し、 $\alpha$ -メチルマンノシドで溶出されたが、変異RP Iは全くマンノース・アガロースに吸着しなかった。このプロテアーゼ活性が実際にRP Iに由来することは、抗RP I血清を用いたイムノブロッティングによって確認した。

プロテアーゼ活性として同じ量の酵素を添加してRP I及び変異RP Iの酵母溶解活性を比較すると、変異RP Iには全く酵母溶解活性が認

められなかった。以上の結果は、C末端領域が実際にマンノース結合ドメインとして機能しており、このドメインの存在が酵母溶解活性の発現に必須であることを示している。

#### 4 結論

酵母溶解プロテアーゼであるプロテアーゼ I (RPI) の性質を検討し、N末端アミノ酸配列から本酵素がトリプシン型のセリンプロテアーゼであること、エラスターゼ類似の基質特異性及びマンノース結合活性を持っていることを明かにした。さらに、RPI 遺伝子をクローニングし、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を解析した結果、N末端側にセリンプロテアーゼドメインが存在し、C末端側に糖結合ドメインが存在することが推定された。部位指定突然変異によってC末端ドメインを欠失させたRPIは、プロテアーゼ活性に変化はないが、マンノース結合活性および酵母溶解活性を失っていた。以上の結果から、RPIは、エラスターゼ類似の基質特異性を持つプロテアーゼドメインとマンノース結合ドメインから構成されていることが判明した。マンノース結合ドメインの存在が酵母溶解活性の発現に必須であることから、本酵素は基質であるマンナンタンパクの糖鎖部分に結合し、近傍にあるペプチド結合を分解するものと考えられる。今後、本酵素のマンナンタンパクに対するアフィニティーを利用することによって、酵母細胞壁のマンナンタンパクの構造が解明されることが期待される。



## 発表論文

1. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cells by *Rarobacter faecitabidus*  
Shimoi, H., Muranaka, Y., Sato, S., Saito, K., and Tadenuma, M.  
(1991) *Agric. Biol. Chem.* **55**, 371-378
2. Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I,  
A yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity  
Shimoi, H., and Tadenuma, M. (1991) *J. Biochem.* **110**, 608-613
3. Molecular structure of *Rarobacter faecitabidus* protease I,  
A yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity  
Shimoi, H., Iimura, Y., Obata, T., and Tadenuma, M.  
*J. Biol. Chem.* (投稿中)

## 謝辞

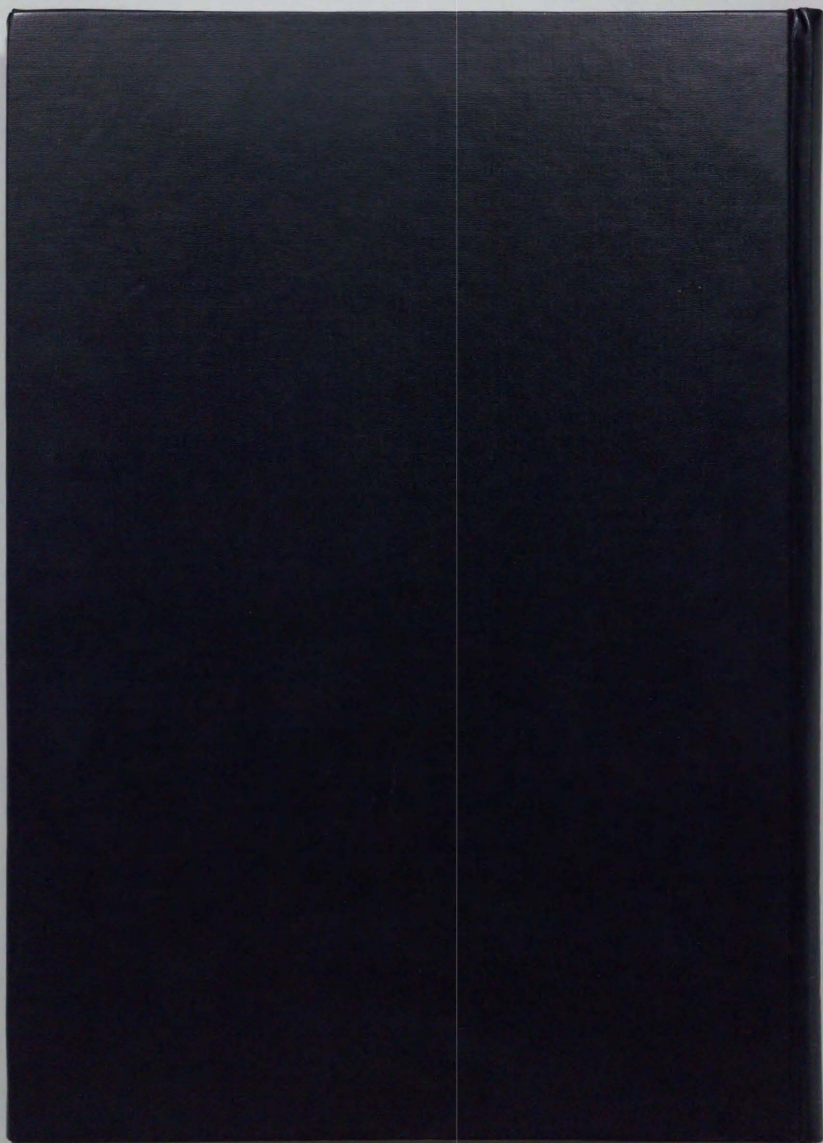
本研究を行うにあたり、終始、御指導、御鞭撻を賜りました東京大学農学部教授、山崎眞狩博士、国税庁醸造試験所第一研究室長、蓼沼誠博士（元第二研究室長）に深く感謝申し上げます。

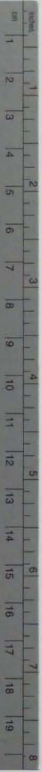
本研究は国税庁醸造試験所第二研究室において、多くの共同研究者と共に行われたものであります。特に、現研究室長、小幡孝之博士、前研究室長、佐伯宏氏、現主任研究員、飯村穰博士、前主任研究員、佐藤俊一博士、元主任研究員、斎藤和夫博士、研究員、家藤治幸氏、村中文人氏、山田修氏の各氏には貴重な御助言及び御援助を得ました。ここに深謝いたします。

また、東京大学名誉教授、田村学造博士には、本研究の遂行にあたり、種々励ましのお言葉をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

平成4年6月

著者





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

