

耐熱性プロテアーゼ アクアライシンⅠの
基質特異性の解析と改変

田中照通

①

耐熱性プロテアーゼ アクアライシン I の基質特異性の解析と改変
Analysis and Engineering of Substrate Specificity of Aqualysin I,
a Heat-Stable Serine Protease Produced by *Thermus aquaticus* YT-1

応用生命工学専攻

平成2年度博士課程進学 田中照通

指導教官 太田隆久



目次

略語表

序部

第I章 (本研究の背景と本論文の目的)

Aqualysin I (成熟体酵素の概略)

Aqualysin I を標的とした研究の歴史

Aqualysin I における未解決の問題

Subtilisin 型酵素の立体構造

Subtilisin 型酵素の基質特異性

SSI の概略

Aqualysin I の安定性

Aqualysin I の基質特異性

本論文の目的

第1部…野生型酵素 aqualysin I の基質特異性の解析

第II章 (合成ペプチド基質による基質特異性の解析)

目的

材料と方法

基質

酵素

測定方法

結果と考察

P 1 特異性

P 2 特異性

P 3 特異性

テトラペプチドの反応性

有機溶媒 (DMSO) が基質特異性に及ぼす影響

まとめ

第III章 (P1変異型タンパク性プロテアーゼ・インヒビター-SSIを用いたP1特異性の解析)

目的

材料と方法

酵素

基質

P 1 変異型 SSI

阻害定数の測定原理

阻害定数の測定方法

結果と考察

反応形式の検証

野生型 SSI の阻害定数

P 1 特異性の比較

まとめ

第1部のまとめ

文献

第2部 基質特異性の改変

第IV章 (P3特異性の改変)

目的

S3 部位の検索とモデリング

材料と方法

変異型酵素

1. 変異の導入と発現ベクターの調製
2. 変異型酵素の生産・発現
3. 変異型酵素の精製

反応速度定数の測定

1. P 3 特異性の測定 (1)
2. P 3 特異性の測定 (2)
3. テトラペプチド基質に対する反応速度定数の測定
4. S S I の阻害定数の測定
5. P 2 特異性の測定

結果と考察

P 3 特異性

テトラペプチド基質に対する反応性

SSI の阻害定数

P 2 特異性

まとめ

第V章 (P 2 特異性の改変)

S 2 部位の検索とモデリング

材料と方法

変異型酵素

1. 変異の導入と発現ベクターの調製
2. 変異型酵素の生産・発現
3. 変異型酵素の精製

反応速度定数の測定

1. P 2 特異性の測定 (1)
2. P 2 特異性の測定 (2)
3. テトラペプチド基質の測定
4. S S I の阻害定数の測定
5. P 3 特異性の測定

結果と考察

変異型酵素 AQN (N68V)

1. テトラペプチド基質と S S I に対する反応性
2. P 2 特異性
3. P 3 特異性

まとめ

変異型酵素 AQN (G101A, G101L, G101V, S102H)

1. テトラペプチド基質の反応性
2. P 2 特異性 (1)
3. P 2 特異性 (2)

まとめ

第2部のまとめ

文献

第3部 タンパク質工学——新たな試みへの序章

第VI章 (メタル・スイッチの導入)

目的

モデリング

材料と方法

変異型酵素の調製

テトラペプチド基質の反応性

「メタル・スイッチ」の測定

1. 2価金属イオンによる阻害の測定
2. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (1)
3. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (2)

2価金属の阻害活性の測定

1. 阻害様式の検証
2. 阻害定数の測定

P3特異性の測定

結果と考察

テトラペプチド基質の反応性

「メタル・スイッチ」の測定

1. 2価金属イオンによる阻害の測定
2. 金属イオン/EDTAによる活性制御 (1)
3. 金属イオン/EDTAによる活性制御 (2)

2価金属の阻害活性の測定

1. 阻害様式の検証
2. 阻害定数の測定

P3特異性

まとめ

第VII章 (SS結合の欠失と aqualysin I の活性型自己分解産物 AQN^{*})

背景

変異型酵素の調製

活性型自己分解産物 AQN^{*} の検出

活性型自己分解産物 AQN^{*} の性質

第VIII章 (活性中心の更新)

目的

モデリング

材料と方法

結果と考察

文献

謝辞

付録

Abbreviations :

A_{410}	Absorbance at 410 nm
Amp ^r	Ampicillin resistant
AQN, AQLN	aqualysin I (protease)
ATP	Adenocin tri-phosphate
Boc-	<i>t</i> -Butoxycarbonyl-
BPN	subtilisin BPN' (protease)
BSA	Bovine serum albumin
CAR, CARL	subtilisin Carlsberg (protease)
cDNA	Complementary DNA
Cm ^r	Chloramphenicol resistant
cmc	critical micelle concentration
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimede
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ϵ_{410}	Molecular extinction coefficient at 410 nm [M ⁻¹ cm ⁻¹]
[E]	Concentration of free enzyme
[E ₀]	Concentration of total enzyme
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EI	Enzyme-Inhibitor complex
EPPS	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-3-propanesulfonic acid (Good's buffer)
ES	Enzyme-substrate complex
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GnHCl	Guanidine hydrochloride
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Good's buffer)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole hydrate
HOSu	N-Hydroxysuccinimide
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
[I]	Concentration of free inhibitor
[I ₀]	Concentration of total inhibitor
IPA	Isopropanol
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
k_{cat}	Catalytic rate constant
K_i	Inhibition constant
K_d	Dissociation constant of the enzyme-inhibitor complex
$K_{d(app)}$	Apparent K_d

$K_{d(int)}$	Intrinsic K_d
K_M	Michaelis constant
K_S	Dissociation constant of the enzyme-substrate complex
KPB	Potassium phosphate buffer
MD	Molecular Dynamics
MM	Molecular Mechanics
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (Good's buffer)
M.W.	Molecular weight
NaPB	Sodium phosphate buffer
Nle	Norleucine
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank (Brookheaven)
PEG	Polyethyleneglycol
P_i, P_i'	Peptide residue, according to the subsite : S_i, S_i'
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
-pNA	- <i>p</i> -nitroanilide
PRT, PRTK	proteinase K (protease)
[S]	Concentration of free substrate
[S_0]	Concentration of total substrate
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-Page	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
S_i, S_i'	Subsite of substrate binding site of the enzyme
ssDNA	Single stranded DNA
SSI	<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor
Suc-	3-Carboxypropionyl- (Succinyl-)
TAE	Tris-acetate EDTA buffer
TBE	Tris-borate EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofurane
TLCK	Tosyl-Lysyl-chloromethylketone
TPCK	Tosyl-Phenylalanyl-chloromethylketone
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Good's buffer)
U-DNA	Uracil-containing DNA
v	Reaction velocity
V_{max}	Maximum velocity ($= [E_0]k_{cat}$)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside
Z-	Benzoyloxycarbonyl- (= Cbz-)

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

序部

第I章

本研究の背景と本論文の目的

Aqualysin I (成熟体酵素の概略)

Aqualysin Iは高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* YT-1 により生産される菌体外分泌のアルカリ性セリン・プロテアーゼである。成熟体酵素は281個のアミノ酸残基 (MW = 28,500) から成るモノマー酵素で、ペプチド・タンパク質分子を「エンド(endo)」的に加水分解する活性をもち、カゼインを基質とした場合は、80℃, pH 10 を活性の至適条件とする。安定性は、酵素の由来から期待される通りに高い耐熱性を示し、加えて、常温において、尿素、塩酸グアニジン、SDS等の変性剤に対しても高い安定性を示す。

Aqualysin Iの一次構造上の特徴は、活性中心残基 (Ser²²², His⁷⁰, Asp³⁹) の並び順が、subtilisin型酵素 (*Bacillus* 属由来の subtilisin BPN' や真菌 *Tritirachium album* Limber 由来の proteinase Kなどが有名) と同一であり、動物消化酵素に多い trypsin 型酵素とは異なる。触媒残基を含む基質結合部位周辺の一次構造において、本酵素はこれらの subtilisin 型酵素と非常に高い相同性を有している (一次構造全体としての相同性は、proteinase K で43%、subtilisinで37~39%、thermitaseで34%である。Fig-I-1 に aqualysin

```

      10          20          30          40          50
AQ :   ATQSPAPWGLDRIDQRLPLNSYTYTATGRGVNVVYIDTGIRTTTHREF G GRAR
PR :   -A-TN-----A-----SSTSPGT-TY-YDESA-Q-SC-----EAS-P-- E ---QM
TH :   YTPNDPYFS- RQY-PQK-Q   APQAW DI-E-S-AKIAIV--VQSN-PDLAGKVV-GWDF
AM :   - - - V-Y-ISQ-K   APALHSQGY--SN-K-A---S--DSS-PDL   NVR-G-SF
BP :   - - - V-Y-VSQ-K   APALHSQGY--SN-K-A---S--DSS-PDL   KVA-G-SM
CA :   - - T V-Y-VPL-K   ADKVQAQGFK-AN-K-A-L---QAS-PDL   NVV-G-SF
DY :   - - T V-Y-IPL-K   ADKVQAQGYK-AN-K-GI-----AAS-TDL   KVV-G-SF

      60          70          80          90          100          110
AQ :   VGYDALGGN GQDCNGHGTHVAGTIG   GVTYGVAKAVNLYAVRVLDGNSGSGTSGVIAG
PR :   -KTYYYSS R-G-----C---V-   S R-----KTQ-FG-K---D---QY-TI---
TH :   -DN-ST P -NG-----C-IAAAVTNNSI-I A-T-PKASIL-----NS---TWTA-AN
AM :   -PSET -PY--GSS-----AAL NNSI-- L--SPSAS---K---ST---QY-WI-N
BP :   -PSET -PF--N-S-----VAAL NNSI-- L--PSAS---K--GAD---QY-WI-N
CA :   -AGE-Y - T-G-----VAAL DNTT-- L---PS-S---K--NSS---Y--IVS-
DY :   -SGESY - T-G-----VAAL DNTT-- L---PN-S---IK--NSS---TY-AIVS-

      120          130          140          150          160
AQ :   VDWW T RNRHPPA VANMSLGGGV-STALDNÄVKNSIAAGVVVAVAAGNDNÄNACNYS P
PR :   -M-F-ASDK-N-NCPKGV--SL-----YS-SVNSA-A-RLQSS--MV-----N--D-R---
TH :   -ITY AAD QGAK -ISL-----T-GNSG-QQ--NYAWN-K-S-VVA-----AGNT-P--
AM :   -IE- AIS -NMD -I-----PTG---KTV-DKAVSS-I-V-A---EGSSGSTSTVGY-
BP :   -IE- AIA -NMD -I-----PSG-A--KA--DKAV-S---VVA---EGTSGSSTVGY-
CA :   -IE- A-T -GMD -I-----ASG---MKQ--D-AY-R---VVA---SGNSGSTNTIGY-
DY :   -IE- A-Q -GLD -I-----PSG---KQ--DKAY-S-I-VVA---SGSSGSQNTIGY-

      170          180          190          200          210          220          230
AQ :   ARVAEALTVGATSSDARASFSNYGSCVDLFAFGASIPSAWYTSDTATQTLNGTSMATPHVAGVA
PR :   -SEPSVC---SDRY-R-S-----VL-I-G--T-IL-T-IGG S -RSIS-----L-
TH :   -YYSN-IA-AS-DQN-NKS---T---V--VA---SWIY-TYP-- -YAS-S-----
AM :   -KYPSTIA---VN--NQ---SA--EL-VM---V-IQ-TLPGG -YGAY-----A-
BP :   -GKYPSTIA---VD--NQ---SV-PEL-VM---V-IQ-TLPGN K YGAY-----S---A-
CA :   -KYDSVIA---VD-NSN---SV-AELEV---GVY-TYPTN -YA-----S---A-
DY :   -KYDSVIA---VD-NKN---SV-AELEV---V-VY-TYPSN -YTS-----S---A-

      240          250          260          270          280
AQ :   ALYLEQNPSATPAS VASÄILNGATT GRLSGI GSGSPNRLLYSLLSSGSG
PR :   -YLMTLGKTTA --ACR Y-ADT-NK -D--N- PF-TV-L-A-NNYQA
TH :   G-LAS-GR- --NIRA--E-T-DKISG T-TYWAK-RV- A-KAVQY
AM :   --I-SKH-TW- NAQ-RDRLEST--YL-N -FYY -K-LI-VQA AAQ
BP :   --I-SKH-NW- NTQ-R-SLE-TT-KL-D -FYY -K-LI-VQA AAQ
CA :   --I-SKH-NLS --Q-RNRLSST--YL-S -FYY -K-LI-VEA AAQ
DY :   --I-SKY-TLS --Q-RNRLSST--NL-D -FYY -K-LI-VEA AAQ

```

Fig-1. Primary structures of serine proteases.

"-" represents for the same amino acid residue to aqualysin I; "↓" : the residues of catalytic triad.

AQ : aqualysin I (Kwon *et al.* 1988); PR : proteinase K (Gunkel *et al.* 1989);

TH : thermitase (Meloun *et al.* 1985); AM : subtilisin Amylosacchariticus (Stahl *et al.* 1984);

BP : subtilisin BPN' (Vanantha *et al.* 1984); CA : subtilisin Carlsberg (Smith *et al.* 1968);

DY : subtilisin DY (Nedkov *et al.* 1983)

The numbers above sequences represent for residue numbers of aqualysin I; the numbers below for subtilisin.

I と subtilisin 型酵素の一次構造を比較して示した)。Aqualysin I の構造上のもう 1 つの特徴は S-S 結合の存在である。Subtilisin 型酵素のうち subtilisin と thermitase は S-S 結合をもたない。表中に示した酵素のうち、S-S 結合を有するのは proteinase K と aqualysin I であり、それぞれ 2 対の S-S 結合を有する (proteinase K の S-S 結合は Cys³⁴·Cys¹²³, Cys¹⁷⁸·Cys²⁴⁹ 間に形成されている [Cys⁷³ は遊離SHである]。aqualysin I では Cys⁶⁷·Cys⁹⁹, Cys¹⁶³·Cys¹⁹⁴ 間に形成されており、2 種の酵素の S-S 結合はそれぞれ異なる位置にある)。subtilisin 型酵素の 1 つである *Saccharomyces cerevisiae* の proteinase B は 3 つの Cys 残基を有していて、1 残基は遊離型であり、aqualysin I の Cys¹⁶³, Cys¹⁹⁴ に対応する Cys¹⁸⁰, Cys²¹¹ の 2 残基は 1 対の S-S 結合を形成していると考えられる。

活性における aqualysin I の特徴は、低分子性のセリンプロテアーゼ・インヒビター DFP、PMSF、及び、タンパク性プロテアーゼ・インヒビター SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) により活性が阻害され、タンパク性基質カゼイン、インシュリン B 鎖、及び、ペプチド性のエラストラーゼ基質 (e.g. suc·Ala·Ala·Ala·pNA) を切断する (Fig-1-2 に aqualysin I によるインシュリン B 鎖の切断部位を、他の酵素のものと比較して示した。Table-I-1 にはモノペプチド基質の相対的な反応性をアミノ酸ごとに比較して示した)。すなわち、他の subtilisin 型酵素と同様に、aqualysin I は subtilisin 型のセリン・プロテアーゼとして振舞い、加えて、広い基質特異性を示す。

Table I-1. Esterase activity of aqualysin I toward benzyloxycarbonyl-amino *p*-nitrophenyl esters

Amino acid	Relative activity [%]
Ala	100
Gly	54
Trp	69
Phe	64
Tyr	50
Leu	14
Val	2
Ile	0
Pro	0

Matsuzawa *et al.* (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 441-447

Fig-I-2. Hydrolysis of oxidized insulin B-chain by various proteases.

1	5	10	15	20	25	30																									
F	V	N	Q	H	L	C	G	S	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G	F	F	Y	T	P	K	A		
		↑																													aqualysin I a)
		↑	↑																												proteainase K b)
		↑																													subtilisin BPN' c)
		↑																													subtilisin Carlsberg d)
		↑																													thermitase e)
		↑	↑	↑	↑																										Rt41A proteinase f)
																															neutral protease from
																															<i>Aspergillus sojae</i> g)
																															<i>Aspergillus oryzae</i> h)
																															<i>Bacillus subtilis</i> i)
																															thiol protease
																															papain j)
																															aspartic protease from
																															<i>Aspergillus sojae</i> k)
																															<i>Aspergillus saitoi</i> l)
																															<i>Pycnoporus coccineus</i> m)

c.f. C : CysO₃H

References

- a) Matsuzawa *et al.* (1988), b) Kraus *et al.* (1976), c) Johansen *et al.* (1968)
 d,h,i,j) Ichishima *et al.* (1983), e) Brömme *et al.* (1984), f) Peek *et al.* (1992)
 g) Sekine *et al.* (1973), k) Kimura *et al.* (1979), l) Tanaka *et al.* (1977)
 m) Kumagai *et al.* (1981)

Aqualysin I を標的とした研究の歴史

Aqualysin I を生産する菌体 *Thermus aquaticus* YT-1 は温泉より単離された桿状でグラム陰性の高度好熱性細菌である (Block and Freeze 1969)。この菌体の生育至適条件はおよそ 70℃、pH 7.5~7.8 である。

T. aquaticus YT-1 の生産するプロテアーゼには、培養溶液中に 2 種のものが発見され、それぞれ aqualysin I, II と命名された (Matsuzawa *et al.* 1983)。

2 種の酵素の特徴をまとめると、

	aqualysin I	aqualysin II
生産時期	培養開始後 1 日	培養 4 日以降
至適温度	70~80 ℃	95 ℃
至適 pH	アルカリ性	中性
阻害剤	DFP	DFP, EDTA

となる。このうち、aqualysin II は精製が困難な酵素とみられ、この段階で追求は断念された。しかしながら、aqualysin I は単一のタンパクになるまでの精製法が確立され、その性質が調べられている (Matsuzawa *et al.* 1988)。

Aqualysin I は好熱菌由来の酵素であり、熱に対する安定性はかなり高く、加えて、常温で種々の変性剤に対して安定である。しかしながら、80℃という高温条件下では、Ca²⁺イオンの非存在下において活性の低下がみられ、Ca²⁺イオンが高温での安定化因子として機能していることが示唆された。

その後、aqualysin I をコードする遺伝子のクローニングが行われ (Kwon *et al.* 1988)、遺伝子配列の側から、aqualysin I の前駆体の構造が明らかに

されるとともに、大腸菌 (*Escherichia coli* MV1184) や酵母 (Terada *et al.* 1990)、そして *Thermus* 属 (Touhara *et al.* 1991) での成熟体酵素の発現系が構築された。Aqualysin I はシグナル、N-プロ、成熟体酵素、C-プロから成る前駆体構造をとる。プロテアーゼの前駆体構造として、シグナル、N-プロだけでなく、C-プロ配列をもつのは aqualysin I と、最近明らかにされた *Achromobacter* protease I のみで、きわめて特殊な構造であり、酵素の成熟化におけるそれぞれの前駆体配列の意味と、宿主大腸菌での発現におけるタンパク質の局在化 (localization) の研究がなされている (Lee *et al.* 1991, 1992)。

基質特異性 (野生型酵素の特異性、および、新たな特異性の構築) に関する研究は本論文の主題であり、第II章以降に記した。

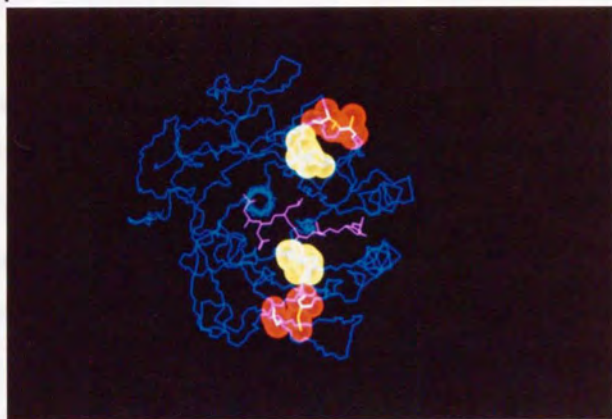
未解決の問題

(構造) Aqualysin I の構造で詳しく理解されているのは、その一次構造だけである。立体構造は現在のところ解き明かされていない。そのため、構造に関連する多くの問題は不明瞭のままである。とは言え、若干の例外も存在する。まず、活性中心の Ser²²² と His⁷⁰ の 2 残基。この 2 残基は、一次構造における類縁酵素との相同性から、aqualysin I の活性中心を構成していると推定されていた。類縁酵素の subtilisin では、X線構造解析・化学修飾・遺伝子操作技術等の手法によって対応する残基が既に活性中心であることが理解されている (Markland *et al.* 1968、Shaw *et al.* 1968、Polgar *et al.* 1967, 1969、Neet *et al.* 1968、Betzl *et al.* 1986)。Aqualysin I の Ser²²² 残基は遺伝子操作により、活性に必須であることが確認されている (Lee *et al.* 1991)。また、活性中心のみでなく、活性中心を含む基質結合部位の立体構造も、他の subtilisin 型酵素とかなり相同性が高いと期待できる。その理由は、本論文の第 II 章以降において明らかにされていくが、aqualysin I と他の類縁酵素との基質特異性・反応性が似ていることや (第 II, III 章)、aqualysin I 以外の subtilisin 型酵素の立体構造をもとに組み立てたモデル系がそのまま aqualysin I 上での基質特異性等に適応できることなどからも裏付けることができる (第 IV, V, VI 章)。しかしながら、基質結合部位以外の立体構造においては、subtilisin 型酵素間での相同性も低く、加えて、一次構造も異なっているため、未知の要素が多い。

(S-S結合) Aqualysin I は 2 対の S-S 結合を有する。同じく 2 対の S-S 結合を有する類縁酵素の proteinase K の立体構造をモデルにして考えると、

aqualysin I の S-S 結合は基質結合部位の近傍に位置していると推定される (Fig.1-3 参照。1 対は基質結合部位の S 1 部位の近傍、もう 1 対は S 2 部位の近傍に位置する)。従って、aqualysin I の S-S 結合には、構造の安定化要因としての寄与と、基質特異性・反応性への寄与の 2 つの寄与が考えられる。そこで、S-S 結合欠失型酵素の解析が試みられるが (第 VII 章)、SS 結合欠失型酵素の「自己分解」という新たな問題に直面し、この試みは中断された。

Front :



Side :

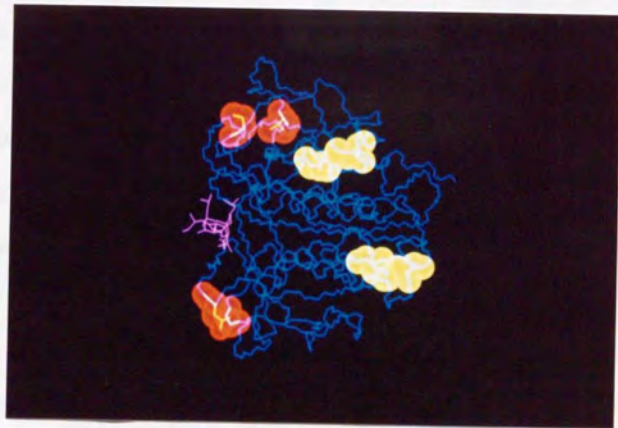


Fig-I-3. Structure of proteinase K, and the positions of disulfide bond.
Blue : main-chain of whole structure, Magenta : substrate (P2'-P5 site),
Yellow : S-S bond of proteinase K, Red : deduced position of S-S bonds of aqalysin I.

Subtilisin 型酵素の立体構造

Aqualysin I は subtilisin 型酵素である。基質結合部位周辺は、特に一次構造上での相同性が高く、立体構造上の相同性も高いことが期待できる。類縁の subtilisin 型酵素のうち、既に精製品が市販化されているものに、proteinase K (Merck 社)、subtilisin Carlsberg (Sigma 社)、subtilisin BPN' (長瀬産業) があり、aqualysin I との反応性・基質特異性の比較に使用できる。これらの酵素の立体構造は X線構造解析により高解像度で得られていて、基質特異性と構造との対応を考える上でのモデルになる (これらの酵素の立体構造は Brookhaven Protein Data Bankにおいて公開されている)。

proteinase K [PDB ID コード: 2PRK, 3PRK], subtilisin Carlsberg [2SEC, 1SBC, 1CSE], subtilisin BPN' [1SBT, 1S01, 1S02, 1SIC, 2ST1, 1ST2, 2SIC, 3SIC, 5SIC], subtilisin Novo [2SBT, 2SNI, 1SBN], thermitase [1TEC, 2TEC, 3TEC])。 (Wright *et al.* 1972、Robertus *et al.* 1972、Poulos *et al.* 1976、Bode *et al.* 1986, 1987、Betzel *et al.* 1986, 1988、Drenth *et al.* 1972、Alden *et al.* 1972、Heinz *et al.* 1991、McPhalen *et al.* 1988、Kossiakov *et al.* 1991、Gros *et al.* 1991)

Subtilisin 型酵素分子は、数本の逆平行 β シートと α ヘリックスを酵素分子の骨格として、全体的に球状構造をしている。基質結合部位は酵素分子表面において「溝」を形成していて、基質主鎖に対して逆平行 β シートを形成して基質と結合する (Fig-I-4 に subtilisin Carlsberg と eglin c 複合体の主鎖の図を示した)。Fig-I-5 に proteinase K と subtilisin Carlsberg の基質

結合部位と活性中心を示した。図中央付近に見える活性中心 (Ser と His 残基は酵素分子骨格の上に乗っている) から伸びるように基質結合部位が存在している。基質分子はこの基質結合部位の2つのループと部分的な逆平行 β シートを形成する形で結合するが、基質分子の側鎖はいわゆる「 β シート」構造における側鎖とは異なった向きをとっている (Fig-I-6 に subtilisin Carlsberg と eglin c の P2'~P5 部位を示す。Fig-I-7 に P1~P3 部位と S1~S3 部位の模式図を示す)。すなわち、P1 側鎖と P2 側鎖は酵素表面に沿った「ポケット」に収まるように伸びており、P3 側鎖は溶媒側へ露出し、P4 側鎖は酵素分子の内側を向いている。これら subtilisin 型酵素間において、基質結合部位の2つのループと S2 部位周辺は、特に高い立体構造の相同性を有していて、回転・平行移動によりほぼ重ね合わせることができる (Siezen *et al.* 1991)。

一方、基質結合部位以外の部分、例えば、N末端やC末端では、立体構造上の相同性は低く、酵素ごとの違いが見えている。

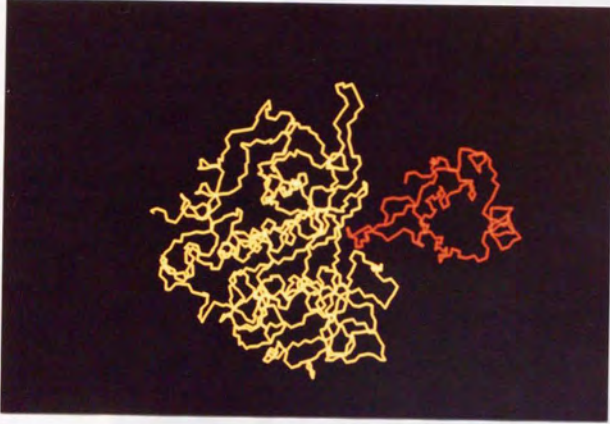
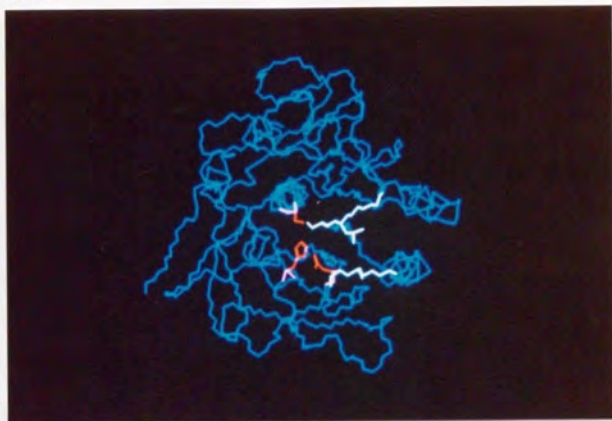


Fig-I-4. Main-chain structure of subtilisin Carlsberg and eglin-c complex.
Yellow : subtilisin Carlsberg, Red : eglin c

subtilisin Carlsberg :



proteinase K :

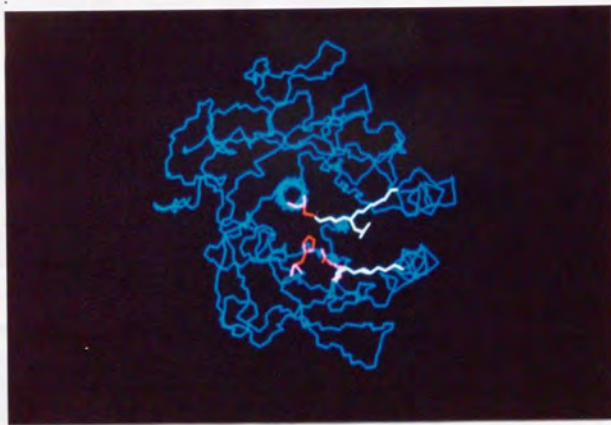


Fig-I-5. Catalytic triad and substrate binding site of subtilisin Carlsberg and proteinase K.

Blue : main-chain of whole structure, Red : catalytic triad (Ser²²¹, His⁶⁴, Asp³² for subtilisin Carlsberg, Ser²²⁴, His⁶⁹, Asp³⁹ for proteinase K), Cyan : substrate binding site (Ser¹²⁵-Leu¹²⁶-Gly¹²⁷-Gly¹²⁸, Gly¹⁰⁰-Ser¹⁰¹-Gly¹⁰² for subtilisin Carlsberg, Ser¹³²-Leu¹³³-Gly¹³⁴-Gly¹³⁵, Gly¹⁰¹-Ser¹⁰²-Gly¹⁰³ for proteinase K)

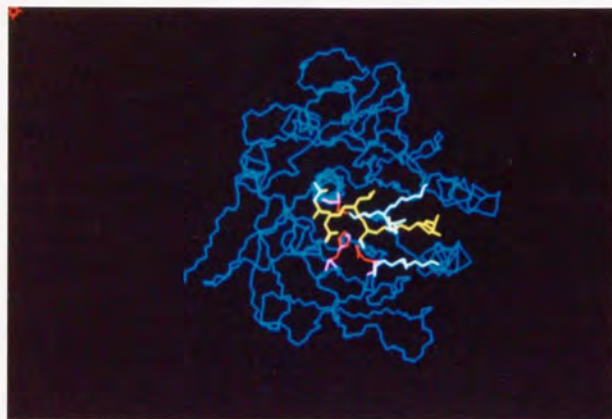


Fig-I-6. Substrate binding site of subtilisin Carlsberg, and P2'-P5 site of eglin c.
 Blue : main-chain of whole structure of subtilisin Carlsberg, Cyan : substrate binding site,
 Red : catalytic triad, Yellow : P2'-P5 site of eglin c.

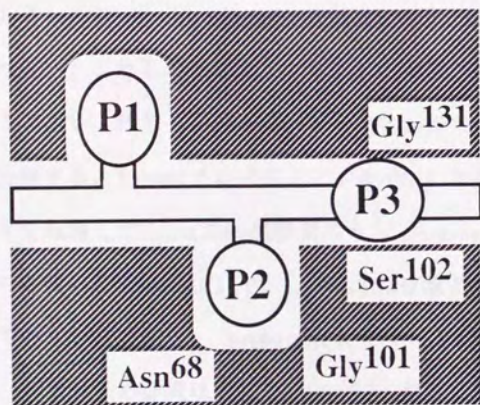


Fig-I-7. Deduced substrate binding site of aqualysin I and the substrate (P1-P3).

subtilisin 型酵素の基質特異性

subtilisin 型酵素の、subtilisin BPN'、subtilisin Carlsbergそして proteinase K の基質特異性の解析の研究が、ペプチド基質やペプチド性インヒビターを用いて、P1特異性、およびペプチド長による反応性に関して、既に行われている (Moriyama *et al.* 1970, 1973, 1974 & 1975、Vidales *et al.* 1979。データを Table-I-3,4,5,6,7 に転載した)。

3種いずれの酵素においても、基質のペプチド鎖が長くなるほどミカエリス定数 K_M は小さくなる傾向を示しているのに対し、 k_{cat} 値はペプチド部のアミノ酸残基が2もしくは3残基で極大値(最大値)をとっており、これらの subtilisin 型酵素の基質認識には、切断されるエステル結合よりN末端側においてある程度(2~3残基)のペプチド鎖長が必要とされていることがわかる。P1・P2特異性を比較すると、同じセリン・プロテアーゼである trypsin や chymotrypsin とは異なって、subtilisin 型酵素の基質特異性は低い。これらのセリン・プロテアーゼは、ペプチド結合だけでなく、アミノ酸を1残基しか含まないアミノアシル-tRNA のエステル結合をも加水分解する。Table-I-7 にアミノアシル-tRNA を基質とした加水分解能のデータを転載した (subtilisin型酵素のうち proteinase K が用いられている)。この基質のC末端側(P1', P2' ... 部位)は核酸であり、ペプチド結合は存在していないことから、proteinase K の P1', P2' ... 部位での基質認識はゆるく、基質分子の認識は主に P1, P2, P3 ... 部位に対して行われていると推定できる。Subtilisin や proteinase K における立体構造の研究から、酵素表面における基質結合部位は主に基質の P1~P4 部位に対して逆平行 β シートを形成して基質と結合すると考えられているが、ペプチド基質を用いて

subtilisin BPN' 等に対して行われた測定によっても、P 1 ~ P 4 部位が基質の認識において重要であることが示唆されている (Grøn *et al.* 1992)。

Table 1. Kinetic constants of subtilisin BPN' and subtilisin BPN' mutants. The values are the mean ± S.D. of three independent experiments. The substrate used was Bz-Arg-Arg-Phe-Val-Phe-Arg-NH₂.

Table 1. Kinetic constants of subtilisin BPN' and subtilisin BPN' mutants. The values are the mean ± S.D. of three independent experiments. The substrate used was Bz-Arg-Arg-Phe-Val-Phe-Arg-NH₂.

Enzyme	Subtilisin BPN'		Subtilisin BPN' mutant	
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)
Subtilisin BPN'	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2
Subtilisin BPN' P2A	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2
Subtilisin BPN' P3A	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2
Subtilisin BPN' P4A	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P2A	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P3A	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P4A	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2
Subtilisin BPN' P2A/P3A	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2
Subtilisin BPN' P2A/P4A	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Subtilisin BPN' P3A/P4A	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P2A/P3A	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P2A/P4A	0.05 ± 0.05	0.3 ± 0.2	0.05 ± 0.05	0.3 ± 0.2
Subtilisin BPN' P1A/P3A/P4A	0.02 ± 0.02	0.2 ± 0.2	0.02 ± 0.02	0.2 ± 0.2
Subtilisin BPN' P2A/P3A/P4A	0.01 ± 0.01	0.1 ± 0.2	0.01 ± 0.01	0.1 ± 0.2

Subtilisin BPN' and subtilisin BPN' mutants were purified from the culture supernatant of *Bacillus pasteurii* strain BPN' and its mutants.

Table-I-3. Inactivation of subtilisin BPN' and proteinase K of chloromethyl ketone derivatives ([E]=50 μ M, [I]=0.1 mM, 10% dioxane, pH 7.0, 40°C)

Inhibitor	subtilisin BPN' [k , sec ⁻¹] ^a	proteinase K [k , sec ⁻¹] ^b
Z-Phe-CH ₂ Cl	1.0 x 10 ⁻⁵	6.7 x 10 ⁻⁵
Z-Ala-Phe-CH ₂ Cl	7.9 x 10 ⁻⁵	3.6 x 10 ⁻⁴
Z-Ala-Gly-Phe-CH ₂ Cl	2.6 x 10 ⁻³	6.4 x 10 ⁻³

a) Morihara *et al.* (1970) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **138**, 526-531

b) Morihara *et al.* (1975) *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1489-1492

Table-I-4. Kinetic parameters for hydrolysis of ester substrates by subtilisin BPN', α -chymotrypsin, trypsin, and elastase. pH 7.5, 30°C, containing 0.1 M KCl

[A] Ac-(Ala)_m-Phe-OMe

Substrate	subtilisin BPN'		α -chymotrypsin	
	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Ac-Phe-OMe	28	2.6	0.57	55
Ac-Ala-Phe-OMe	1.1	230	0.05	330
Ac-(Ala) ₂ -Phe-OMe	0.32	930	0.03	2000

[B] Z-(Ala)_m-Lys-OMe

Substrate	subtilisin BPN'		trypsin	
	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Z-Lys-OMe	20	2.3	0.2	470
Z-Ala-Lys-OMe	0.58	440	0.04	1700
Z-(Ala) ₂ -Lys-OMe	0.16	2800	0.07	1400

[C] Ac-(Ala)_m-Ala-OMe

Substrate	subtilisin BPN'		elastase	
	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Ac-Ala-OMe	36	0.25	76	0.11
Ac-(Ala) ₂ -OMe	5.8	53	9.2	0.48
Ac-(Ala) ₃ -OMe	0.45	570	0.28	60

Data from Morihara *et al.* (1973) *FEBS Lett.* **33**, 54-56

Table I-5. Kinetic parameters for hydrolysis of ester substrates by subtilisin BPN', Carlsberg pH 7.5, 30°C, containing 0.1 M KCl

Substrate	subtilisin BPN'			subtilisin Carlsberg		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Ac-Ala-OMe	9.1	36.3	0.25	210	60	3.5
Ac-(Ala) ₂ -OMe	305	5.8	52.5	2300	13	177
Ac-(Ala) ₃ -OMe	255	0.45	566	1046	0.83	1260
Ac-(Ala) ₄ -OMe	175	0.18	995	885	0.28	3053
Ac-Phe-OMe	100	28	3.7	540	11.4	47.4
Ac-Ala-Phe-OMe	254	1.1	224	1643	0.87	1888
Ac-(Ala) ₂ -Phe-OMe	297	0.32	941	1179	0.31	3800
Z-Lys-OMe	47	20	2.3	102	12	8.5
Z-Ala-Lys-OMe	414	1.4	296	1000	0.8	1250
Z-(Ala) ₂ -Lys-OMe	454	0.16	2790	1100	0.16	6875
Z-Gly-Lys-OMe	414	10	41	1046	6.6	159
Z-Ala-Lys-OMe	414	1.4	296	1000	0.8	1250
Z-D-Ala-Lys-OMe	8.8	33	0.3	11.5	25	0.5
Z-Leu-Lys-OMe	230	1.2	190	658	0.8	823
Z-Phe-Lys-OMe	45.5	1.0	46	177	1.1	161

Data from Morihara *et al.* (1974) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **165**, 72-79

Table-I-6. Kinetic parameters for hydrolysis of ester substrates by proteinase K. pH 7.5, 30°C, containing 0.1 M KCl

Substrate	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Ac-Gly-OEt	670	0.003
Ac-Ala-OMe	45	1.5
Ac-Val-OMe	26	0.1
Ac-Leu-OMe	30	4.5
Ac-Phe-OEt	12	8.1
Ac-Tyr-OEt	8.8	10.7
Ac-Trp-OEt	5.6	33.4
Z-Lys-OMe	21	1.3
Bz-Arg-OEt	3.3	0.3

Z-Lys-OMe	21	1.3
Z-Ala-Lys-OMe	3	57.3
Z-(Ala) ₂ -Lys-OMe	0.9	689
Ac-(Ala) ₂ -Phe-OMe	0.8	425
Ac-(Ala) ₂ -Ala-OMe	1.0	290

Z-Gly-Lys-OMe	19	3.8
Z-Ala-Lys-OMe	3	57.3
Z-D-Ala-Lys-OMe	20	0.1
Z-Leu-Lys-OMe	9	12.9
Z-Phe-Lys-OMe	3	5.7

Data from Marihara *et al.* (1975) *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1489-1492

Table-I-7. Aminoacyl-tRNA hydrolase activity of several proteases (percent activity, 0°C)

enzyme	Ac-Phe -tRNA	Phe -tRNA	Ac-Leu -tRNA	Leu -tRNA	Ac-Leu -ACCAC(U)	Leu -ACCAC(U)
proteinase K	45	3	90	9	71	10
protease <i>S.griseus</i>	19	6	45	6	27	4
papain	9	11	32	46	32	11
elastase	0	1	3	2	13	7
trypsin	91	94	79	76	82	69
α -chymotrypsin	91	93	80	90	78	39
control	5	7	0	7	0	2

Data from Vidales *et al.* (1979) *Biochemistry*, **18**, 4155-4158

SSI の概略

SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) は放線菌 (*Streptomyces albogriseolus*) が生産するプロテアーゼ・インヒビターで (Sato *et al.* 1973)、細菌性のアルカリ性セリン・プロテアーゼを強く阻害する。SSI は安定なダイマーとして存在する。1つのサブユニットは113個のアミノ酸残基からなる一本鎖のタンパク質 (MW = 11,500) であり (Ikanaka *et al.* 1974)、分子内に2対のS-S結合を有する。SSI と subtilisin BPN' との複合体のX線結晶構造解析の研究結果から、SSI と subtilisin BPN' の結合様式が明らかにされている (Mitsui *et al.* 1979、Fig-I-8 参照)。それによると、SSI の P1~P4 部位 (Met⁷³Pro⁷²Cys⁷¹Met⁷⁰) は Asn⁹⁹Glu¹⁰⁰Cys¹⁰¹ のポリペプチド鎖と逆平行βシートを形成し、水素結合を有していると推定されている (Cys⁷¹ と Cys¹⁰¹ は S-S 結合を形成している)。SSI のその他の残基 Arg⁶⁶Val⁶⁹Val⁷⁴Tyr⁷⁶Ser⁹⁸Cys¹⁰¹ などが更に subtilisin BPN' と接触していて、酵素との結合において結合を強める働きをしていると考えられている (Fig-I-9 に subtilisin とプロテアーゼ・インヒビターの接触残基を比較して示した。SSI および eglin c はともにほぼ同じ部位で酵素と接触している)。

SSI をコードする遺伝子は、三浦らによりクローニングされて (Obata *et al.* 1989)、放線菌 (*Streptomyces lividans* 66) でのタンパク質の発現に成功し、部位指定変異によって反応部位の P 1 および P 4 部位のアミノ酸をさまざまに換えた変異型 S S I が得られている (Kojima *et al.* 1991)。



Fig-1-8. α -Carbon chain of the SSI-subtilisin complex as found in crystals. Two molecules of subtilisin (thin bonds, smaller characters) are bound to dimeric SSI inhibitor (bold bonds) which is in the center. The (crystallographic) diad relating the two subunits of SSI is tilted from the normal of the paper by 30° . Scissile peptide bonds between Met 73' and Val 74' are marked by arrowheads.

Fig-I-9. Intermolecular Contacts less than 0.4 nm in the protease-protease inhibitor complex

		P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'				
eglin c		Y35	L37	G40	S41	P42	V43	T44	L45	D46	L47	R48	R53
SSI		R66	E67	D68	V69	M70	C71	P72	M73	V74	Y75	S98	C101
protease													
No. CarlNovoBPN													
33	T S S	-	-	-	-	-	-	1/0/-	-	-	-	-	-
62	N N N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/5/-	-
63	G S S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1/-	-
64	H H H	-	-	-	-	-	9/11/-	1/1/-	5/2/2	-	2/0/-	-	-
96	L L L	-	-	-	-	-	1/1/-	-	-	-	-	-	-
99	S D D	3/2/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4/2
100	G G G	-	-	-	-/1	3/3/1	6/3/-	-	-	-	-	-	3/3/1
101	S S S	-	1/3/-	-	-/1	3/2/1	1/1/-	-	-	-	-	-	-
102	G G G	-	-	-	-	4/6/-	-	-	-	-	-	-	-
103	S Q Q	-	-	-/1	-/1	-	-	-	-	-	-	-	-
104	Y Y Y	-	-/4	3/0/1	-/3	1/6/3	-	-	-	-	-	-	-
107	I I I	-	-	-	-	2/2/2	-	-	-	-	-	-	-
125	S S S	-	-	-	-	-	1/1/1	1/1/1	-	-	-	-	-
126	L L L	-	-	-	-	-/1	3/3/1	-	3/3/-	-	-	-	-
127	G G G	-	-	-	-	3/4/1	6/6/1	-	2/2/2	-	-	-	-
128	G G G	-	-	2/0/-	1/0/-	-	-	-	0/0/-	-	-	-	-
129	A P P	-/2	-	4/0/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130	S S S	-	-/1	6/0/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	A A A	-	-	-	-	-	-	2/1/1	-	-	-	-	-
154	G G G	-	-	-	-	-	-	2/2/1	-	-	-	-	-
155	N N N	-	-	-	-	-	-	6/6/2	3/3/3	-/1	-/3	-	-
156	S E E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/1	-
189	F F F	-	-	-	-	-	-	-	-	3/1/-	-	-	-
209	Y L L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/0/-	-
217	L Y Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1/-	-
218	N N N	-	-	-	-	-	-	-	3/3/-	4/4/1	3/-	-	-
219	G G G	-	-	-	-	-	-	2/2/1	0/1/-	-/3	-	-	-
220	T T T	-	-	-	-	-	-	3/2/1	-	-	-	-	-
221	S S S	-	-	-	-	-	-	11/9/1	2/3/-	-	-	-	-
222	M M M	-	-	-	-	-	-	-	0/1/-	-	-	-	-

Contacts : Carlsberg-eglin c / Novo-eglin c / BPN'-SSI

References :

Carlsberg-eglin c : Bode *et al.*,(1987),Novo-eglin c : (1991) Gruetter *et al.*,
BPN-SSI : Mitsui *et al.*(1979)

Aqualysin I の安定性

Aqualysin I は高度好熱性細菌由来のプロテアーゼである。その由来から期待できるように、このタンパクは高い熱安定性・変性剤耐性を有している (Matsuzawa *et al.* 1988)。

Aqualysin I は subtilisin 型酵素である。Subtilisin 型酵素は球状構造をしたモノマータンパク質で、これらの酵素も高い安定性を有することが知られている (Hilz *et al.* 1975、Zaks *et al.* 1988、Russell *et al.* 1988)。そこで、aqualysin I の安定性を 2 つの subtilisin 型酵素 subtilisin Carlsberg、proteinase K との比較において検証した (田中 修士論文より転載)。

(熱安定性) カゼイン (1% Casein, EPPS 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8.5 室温にて調整) を基質とした、活性の温度依存性と 70℃ 処理での酵素の残存活性を Fig-I-10 に示した。活性の温度依存性からは、65℃ 以下においては温度上昇と共に活性の上昇が 3 種全ての酵素において見られたが、80℃ 以上においては他の 2 酵素の活性は低下し、aqualysin I の活性がきわだった。

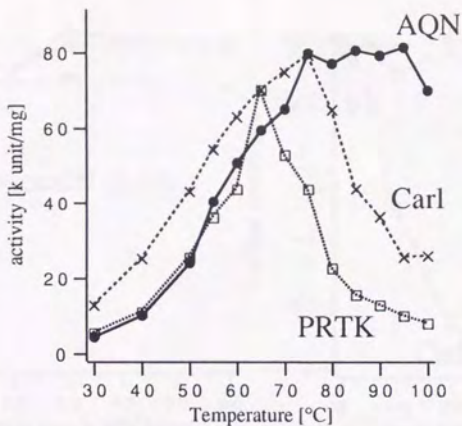
また、70℃ 処理における残存活性でも aqualysin I の活性が保持されており subtilisin 型酵素の中において aqualysin I の熱安定性が優れていることが理解できる。

(変性剤耐性) 30℃ にて 4 種の変性剤共存下で処理した酵素の残存活性を Fig-I-11 に示した。Tween20 [2.5%]、尿素 [4 M] に対してはいずれの酵素も安定であったが、塩酸グアニジン [4 M] に対する安定性には差が表れて

いた。Aqualysin I が 60 分間の処理に対してほぼ全活性を保持していたのに対して、proteinase K では 20% 程度活性が低下し subtilisin Carlsberg では完全に失活した (活性の消失は、最終的には酵素の自己分解によるものであった)。活性の温度依存性では、subtilisin のほうが proteinase K よりも高い熱安定性を有していたことと比べると、塩酸グアニジンに対する安定性には酵素分子内の S-S 結合が寄与していることも考えられる。SDS [1 %] 処理では、酵素の自己分解速度が速く、30 分以内に活性は消失した。

これらのことから、subtilisin 型酵素の安定性は全般的に高いことがわかったが、高温、変性剤 (塩酸グアニジン) 耐性において aqualysin I が他の subtilisin 型酵素よりも優れていることがわかった。

A)



B)

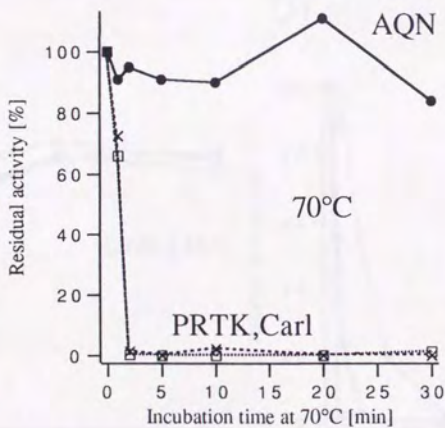


Fig-I-10. Thermostability of various proteases.

A) Temperature dependence of caseinolytic activity.

(Reaction : 5 minutes incubation at various temperature.

Substrate : 1% casein, EPPS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8.5 at 25°C)

B) Residual activity after heat treatment at 70°C. Caseinolytic assay was performed at 50°C.

(1 unit = $\Delta A_{280} / 0.002 / \text{minutes}$)

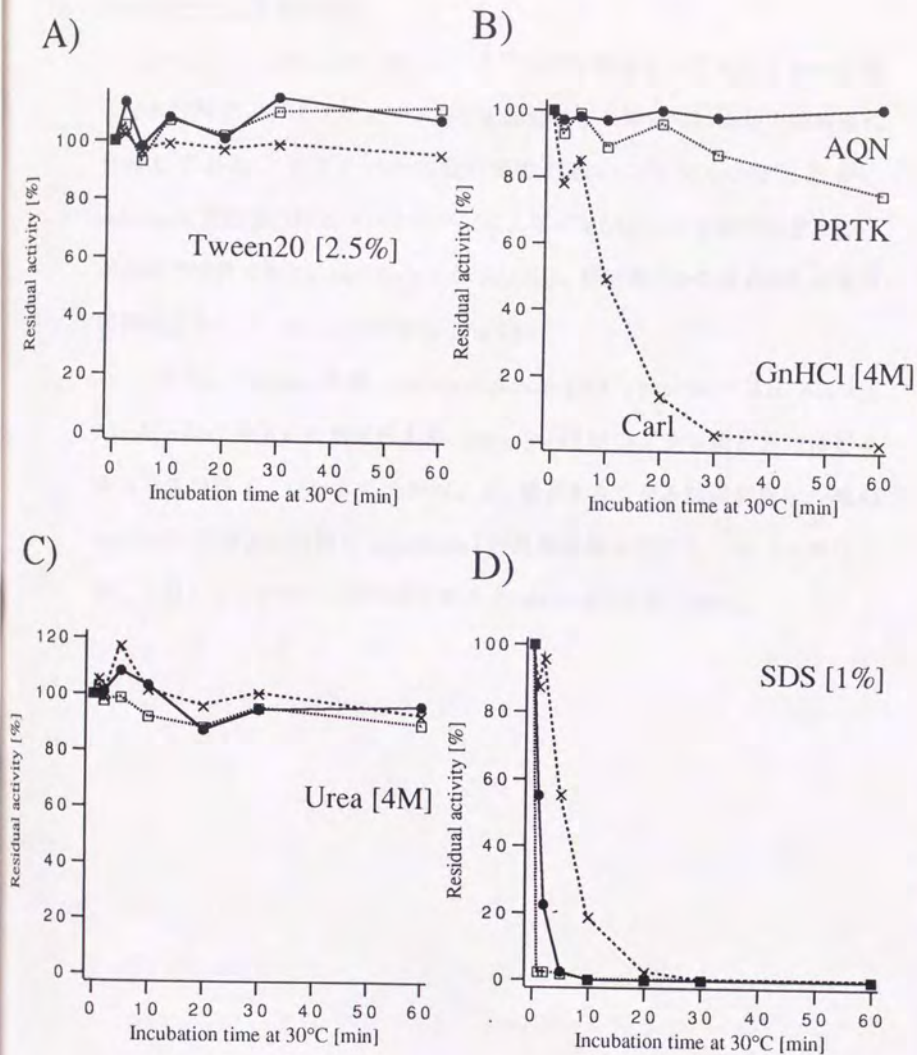


Fig-I-11. Residual activity of various proteases against detergents.

A) Tween20 [2.5%], B) Guanidine hydrochloride [4 M], C) Urea [4 M], D) SDS [1 %]

Each enzyme was incubated with the detergent at 30°C, and caseinolytic assay was performed at 50°C (1% casein, EPPS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8.5 at 25°C)

(1 unit = $\Delta A_{280}/0.002/\text{minutes}$)

Aqualysin I の基質特異性

Aqualysin I はタンパク質、ペプチド分子を基質としてエンド (endo) 的に加水分解する。インシュリンB鎖を基質とした場合には複数の切断部位を有しており、ペプチドの切断特異性が広いことがうかがえるが、subtilisin 型酵素以外のプロテアーゼによるインシュリンB鎖の切断部位とあわせて比較すると、aqualysin I が subtilisin 型酵素とかなり共通した基質特異性を有していることがわかる (Fig-I-2)。

また、elastase 基質 (succinyl-peptide-pNA : peptide = Ala, Ala-Ala, Ala-Ala-Ala) を用いた測定により、aqualysin I はペプチド鎖が長いほどミカエリス定数 K_m が小さく、かつ、 k_{cat} 値が大きくなる傾向があり、他の subtilisin 型酵素と同様に aqualysin I の基質認識も主に P1, P2, P3 部位に対して行われていることが示唆された (Matsuzawa *et al.* 1988)。

本論文の目的

本論文は以下に示す3つを目的としている。

- (1) プロテアーゼ aqualysin I の基質特異性そのものを明らかにすること
- (2) Subtilisin 型酵素との比較により、subtilisin 型酵素としての aqualysin I の反応における特異性の差異・共通性を明らかにすること
- (3) Subtilisin 型酵素との反応における共通性をもとに aqualysin I の立体構造を推定し、aqualysin I における基質結合部位を解析するとともに、基質特異性の改変を主とする新しい反応性を企画・導入することである。

以上のことを念頭に置き、合成ペプチド基質の特異性、タンパク性プロテアーゼ・インヒビターの阻害能等の活性測定を手段として用いて aqualysin I の subtilisin 型酵素における特性 (共通性や差異) を解析し、比較に用いた酵素の立体構造との相関から aqualysin I における立体構造というものを反応論の立場から考察してゆくことになる。

これらの測定を通じて aqualysin I の反応時における立体構造が、他の subtilisin 型酵素と極めて似たものであることが明かになってゆくが、そのことにより、立体構造が未知であった aqualysin I においてタンパク質工学的手法が構造既知のタンパクと同様な意味において有効となる。

本論文では、タンパク質工学手法の対象は aqualysin I に限定されているが、ここで用いられる手法・戦略は subtilisin 型酵素全体に共通した性質に関するものであるため、他の subtilisin 型酵素に対しても適応可能である。



第 1 部

野生型酵素 aqualysin I の基質特異性の解析

第II章

合成ペプチド基質による基質特異性の解析

本章の目的は2つある。プロテアーゼ aqualysin I の基質特異性そのものを明らかにすることと、subtilisin 型酵素において aqualysin I の位置付けをおこなうことである。

既に第I章でみたように、aqualysin I は広い基質特異性を示す。インシュリンB鎖に対する切断部位は複数あるが、これらは他の subtilisin 型酵素によく似ており、aqualysin I の基質特異性は他の subtilisin 型酵素に類似していることが期待できる。加えて、aqualysin I の基質認識も他の subtilisin 型酵素と同様に、切断部位よりもN末端側の P1, P2, P3 部位を強く認識することが示唆されており、これらの背景からペプチドのC末端に発色基を結合したトリペプチド基質 (succinyl-tripeptide-*p*-nitroanilide) を基質として用いることにした。また、subtilisin 型酵素における aqualysin I の特徴を明らかにするために、subtilisin 型酵素のうちで市販品が入手できかつ、立体構造が既に決定されている3つの酵素 proteinase K、subtilisin Carlsberg、subtilisin BPN' をあわせて同一条件にて測定し、aqualysin I の特異性と比較することにした。

材料と方法

基質

6種のペプチド基質 suc-Ala-Ala-Ala-pNA, suc-Ala-Ala-Val-pNA, suc-Ala-Pro-Ala-pNA, suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Sigma Chemical Co.,より購入)、suc-Ala-Ala-Phe-pNA, suc-Gly-Gly-Phe-pNA (Nova Biochem Co.,より購入)は市販品を購入した。5種のペプチド基質 suc-Ile-Val-Ala-pNA, suc-Gly-β-Ala-Ala-pNA, suc-Phe-β-Ala-Ala-pNA, suc-Leu-β-Ala-Ala-pNA, suc-Ile-β-Ala-Ala-pNAは浅野克彦博士らの好意によりキリンビール(株)医薬開発研よりいただいた。6種のペプチド基質 suc-Phe-Val-Ala-pNA, suc-Phe-Nle-Ala-pNA, suc-Phe-Leu-Ala-pNA, suc-Phe-Ala-Ala-pNA, suc-Phe-Val-Leu-pNA, suc-Phe-Val-Phe-pNAは当研究室において液相法により合成した(田中 修士論文参照)。

これらの基質は、測定の直前に HEPES 緩衝液 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5 at 40°C) に過剰量加えて溶解させた後、不溶画分を濾過 (0.22 μm milipore filter) により除去して得られた溶液を基質溶液として測定に用いた。調製した基質用液の濃度は、少量分取した基質溶液に高濃度の酵素溶液を加えて得られる遊離の *p*-nitroaniline の濃度から実験的に求めた (*p*-nitroaniline のモル吸光係数は、実験的に求めた値 $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を使用した)。

酵素

Proteinase K (Merck 社より購入。社製ロット番号710 E609668)
subtilisin Carlberg (Sigma Chemical Co.より購入。"Subtilisin Carlsberg ;
Subtilopeptidase A type VIII" 社製ロット番号 18F-0005) 、 subtilisin
BPN' (Nagase Biochemicals LTD., より購入。"Bacterial A1-Proteinase,
Nagarse" 社製ロット番号 6928013) は市販品を購入した。

これらの酵素は、リン酸緩衝液 (Na phosphate 10 mM, CaCl_2 1 mM, pH
6.0) に溶解させた後、イオン交換カラム (monoS column :FPLC system,
Pharmacia) に吸着させ、NaCl で塩濃度勾配をかけて溶出させた後、得ら
れた溶出画分のうちからタンパク分解活性の高い画分を選んで精製標品と
し、SDS-PAGEで純度を確認した後 (Laemli *et al.* 1970) 、Lowry らの方
法により BSA を標準タンパクとしてタンパク濃度を測定した (Lowry *et al.* 1951) 。

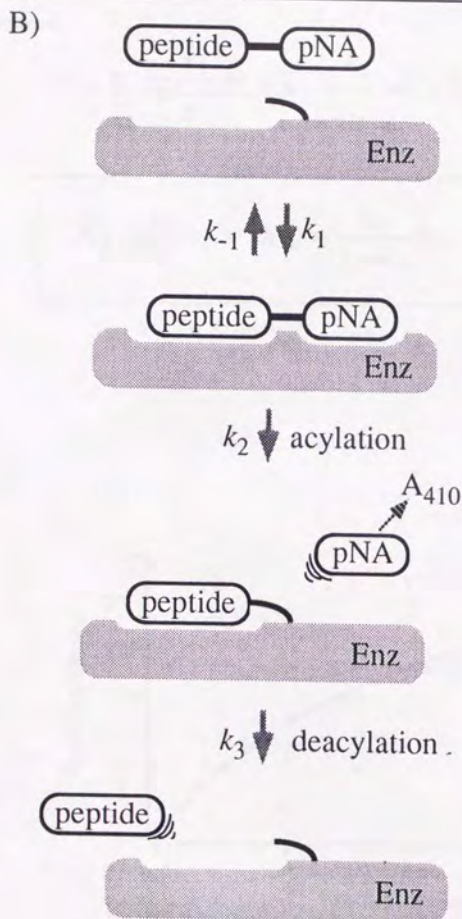
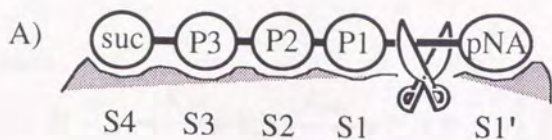
Aqualysin I は *Thermus aquaticus* YT-1 より分泌され硫酸沈澱として保
存されていたものを出発点として、イオン交換カラム等 (DEAE-cellulose,
CM-cellulose, monoS) を用いて精製し (Matsuzawa *et al.* 1988 参照) 、他
の酵素と同じく SDS-PAGE で純度を検定・確認した後、Lowry 法によりタ
ンパク質濃度を定量した。

酵素溶液の希釈には、基質と同じHEPES緩衝液 (HEPES 100 mM, CaCl_2
1mM, pH 7.5 at 40°C) を用いた。

測定方法

活性測定は 40℃、pH 7.5 にて行った (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5 at 40℃)。反応速度は *p*-nitroaniline の遊離による 410 nm における吸光度の変化の測定により求めた。

基質分子は、succinyl 基、ペプチド、*p*-nitroanilide から成る。この状態において基質は発色しないが、加水分解により 410 nm 付近に吸収極大をもつ *p*-nitroaniline が遊離することにより、基質の分解を分光学的に測定することができる (Fig-II-1 に模式図を示した。B 図に示したように、反応はミカエリス複合体の形成、アシル化、脱アシル化を経由して基質を加水分解する)。ペプチドの P₁ 部位が異なる基質を用いることにより、得られた反応速度定数を比較すれば酵素の P₁ 特異性が明らかになる。反応形式は測定したすべての基質、酵素の組合せにおいて、単純なミカエリス・メンテン型 (Fig-II-2, Scheme-1 参照) に従っており、すべてこの型における反応速度定数 K_M , V_{max} (または V_{max}/K_M) を実測値から求め、3つの反応速度定数 k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M の値を算出した。測定点は1つの酵素・基質の組合せに対して、12~24点とった。測定に用いた基質の濃度は、基質の溶解度が K_M 値よりも大きい場合を除いて、基質濃度はすべて K_M 値の3倍程度を上限とし、6段階もしくは8段階の基質濃度を調製して、2連以上で測定した。実測値からの反応速度の計算には、Newton 法による非線形最小自乗法を用いたアルゴリズムを作製し、内挿的・回帰的に算出した。Lineweaver-Burk プロットや Eadie-Hofstee プロットなどの、測定値の逆数を用いた直線回帰計算では回帰計算に持ち込まれる誤差が大きいため、これらの方法は用いていない。



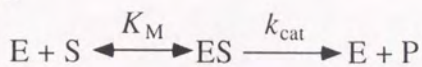
$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$K_M = \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

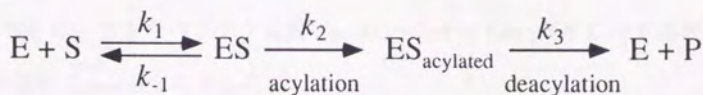
Fig-II-1. Subsite nomenclature and diagram of release of *p*-nitroaniline.
 A) Subsite nomenclature, case of chromogenic tripeptide substrate. "scissors"
 represent for the active Ser residue.
 B) Diagram of acylation and deacylation steps, for the scheme-2.

Scheme-1.



$$v = \frac{[S][E_0]k_{cat}}{K_M + [S]}$$

Scheme-2.



$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_M = \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S \quad k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

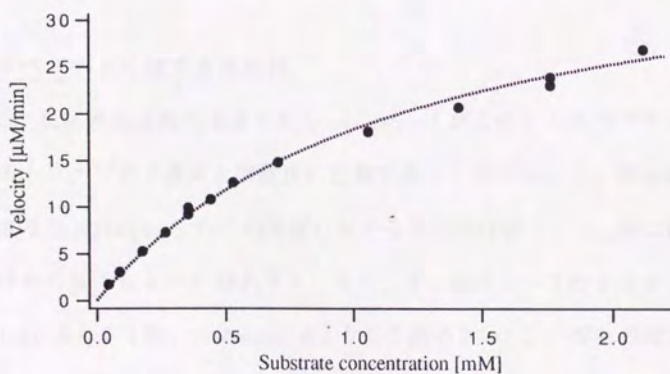


Fig-II-2. Reaction rate v plotted against substrate concentration $[S]$ for a reaction obeying Michaelis-Menten kinetics. The case of aqualysin I and a substrate suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. ($[E]=20$ [nM], $k_{cat} = 34$ [sec^{-1}], $K_M = 1.22$ [mM], 40°C , pH 7.5; HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM)

結果と考察

4種の酵素におけるトリペプチド基質に対する反応速度定数を Table-II-1 に、テトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA に対する反応速度定数を Table-II-2 に示した。

トリペプチド基質に対する反応性

4種の酵素の示した反応性は、類似していた。反応性の高い基質の場合で、1秒間当たりの k_{cat} 値は2桁、 K_M 値は [μ M] の単位で2桁を示し、 k_{cat}/K_M 値で 10^5 [$\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1}$] の値を示した。

高い反応性を示す基質は、4酵素で類似しており、4種酵素の基質特異性や反応性が類似していることが示された。

テトラペプチドに対する反応性

求めた反応速度定数の大きさから aqualysin I がこのテトラペプチド基質を他のトリペプチド基質と同程度に分解することがわかった。類縁酵素と比較すると aqualysin I のこの基質に対する反応性は低く、 K_M 値は他の3酵素のものよりも3~4倍大きく、また、 k_{cat} 値は1~3桁小さかった (subtilisin よりも1桁、proteinase K よりも3桁小さい)。いずれの酵素の場合でも、 k_{cat} 値の大きさはいずれのトリペプチド基質の場合よりも大きく、4酵素においてともに、基質のペプチド長が反応性に参与していることがわかった。

Table-II-1. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-tripeptide-pNA. Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1mM)

A) aqualysin I

P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe	Ala	Ala	11	44	2.5×10^5
Phe	Nle	Ala	8.8	36	2.5×10^5
Phe	Leu	Ala	3.3	71	4.6×10^4
Phe	Val	Ala	4.7	39	1.2×10^5
Phe	Val	Leu	0.09	340	2.5×10^2
Ile	Val	Ala	5.0	64	7.8×10^4
Ala	Ala	Val	0.04	900	5.0×10^1
Ala	Ala	Ala	1.2	1050	1.2×10^3
Ala	Pro	Ala	0.5	790	6.2×10^2
Ala	Ala	Phe	2.5	910	2.8×10^3
Gly	Gly	Phe	0.15	1600	9.5×10^1

B) proteinase K

P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe	Ala	Ala	12	55	2.1×10^5
Phe	Nle	Ala	8.8	80	1.1×10^5
Phe	Leu	Ala	3.7	140	2.6×10^4
Phe	Val	Ala	20	760	2.7×10^4
Phe	Val	Leu	0.6	350	1.7×10^3
Ile	Val	Ala	7.3	340	2.2×10^4
Ala	Ala	Val	0.006	180	3.3×10^1
Ala	Ala	Ala	2.7	200	1.4×10^4

Table-II-1. (continued)

C) subtilisin Carlsberg

P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe	Ala	Ala	2.3	160	1.4×10^4
Phe	Nle	Ala	28	24	1.2×10^6
Phe	Leu	Ala	20	270	7.4×10^4
Phe	Val	Ala	12	79	1.5×10^5
Phe	Val	Leu	4.5	110	4.1×10^4
Ile	Val	Ala	40	540	7.5×10^4
Ala	Ala	Val	0.16	1450	1.1×10^2
Ala	Ala	Ala	5.5	770	7.2×10^3

D) subtilisin BPN'

P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe	Ala	Ala	18	55	3.5×10^5
Phe	Nle	Ala	5.2	10	4.9×10^5
Phe	Leu	Ala	3.2	250	1.2×10^4
Phe	Val	Ala	3.7	160	2.4×10^4
Phe	Val	Leu	0.8	70	1.1×10^4
Ala	Ala	Val	0.02	2420	8.3
Ala	Ala	Ala	2.2	3200	6.7×10^2

The parameters for suc-Phe-Val-Phe-pNA were not determined, because of low solubility of the substrate.

Table-II-2. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM)

	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
aqualysin I	3.3×10^1	1.22	2.8×10^4
proteinase K	1.1×10^4	0.34	3.2×10^7
subtilisin Carlsberg	3.0×10^2	0.29	1.0×10^6
subtilisin BPN'	4.8×10^2	0.29	1.7×10^6

P 1 特異性

種々の基質の反応速度定数のうちから P 1 特異性を表すものを Table-II-3 にまとめた。

(aqualysin I の P 1 特異性) 3 種のトリペプチド基質 suc-Ala-Ala-X-pNA (X = Ala, Val, Phe) の反応速度定数值を比較すると、ミカエリス定数 (K_M) の値には差がなく、 k_{cat} 値に反応性の差が表れていた (k_{cat} 値は Phe > Ala > Val の順に大きかった)。2 種のペプチド基質 suc-Phe-Val-X-pNA (X = Ala, Leu) の比較においても、P 1 残基の違いは主に k_{cat} 値に反映されていたが (Ala > Leu)、前に述べた基質の場合とは異なり、ミカエリス定数值にも差が表れていた (Ala 残基の場合の K_M 値の方が 1 桁小さい)。いずれのタイプの基質においても Ala 残基の反応性は高くなっており、第 I 章でみたモノペプチド基質 (Table-I-1) に対する反応性と共通して Leu, Val 残基は切られにくくなっていた。これらから aqualysin I の S 1 部位が P 1 残基として Ala 残基を、分岐型の Leu, Val 残基よりも好むことがわかった。基質 suc-Ala-Ala-X-pNA (X = Ala, Phe, Val) での測定では、芳香環を側鎖に有する Phe 残基が分岐型の Val 残基よりも高い反応性を与え、aqualysin I の P 1 特異性が単に P 1 アミノ酸残基側鎖の「大きさ」や「疎水性」によって規定されているわけではないことがうかがえる。

Fig-II-3 に aqualysin I の反応飽和曲線を示した。実際に測定した基質濃度は基質のミカエリス定数を反映して異なっており、また、実測値をグラフに載せると見にくくなることから、図には実測値を載せていない。同様

の理由により、特別な場合を除いては、以下に示す反応飽和曲線のグラフには実測値を載せずに示す。他の3酵素の飽和曲線も aqualysin I と同じ傾向を示していた。

(subtilisin 型酵素との P 1 特異性の比較) 3種の酵素 proteinase K, subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN' の4種のトリペプチド基質 suc-Phe-Val-X-pNA (X=Ala, Leu) suc-Ala-Ala-X-pNA (X = Ala, Val) に対する P 1 特異性を比較すると、P 1 残基の異なるいずれの基質の組合せにおいてもミカエリス定数値の差は小さく、特異性は k_{cat} 値に現われていた (Ala > Leu, Val)。いずれの酵素においても Ala 残基に対して高い反応性を示していた点は aqualysin I と共通していた。

これらの比較からわかる aqualysin I の P 1 特異性の特徴をまとめると、

(1) aqualysin I の S 1 部位は Ala 残基嗜好性を示し、Leu, Val 残基をあまり好まなかった。この Ala 残基嗜好性は、他の酵素と共通していた。

(2) P 1 部位のアミノ酸の違いは、主に k_{cat} 値に反映されていた。この傾向は4種の subtilisin 型酵素全体に共通していた。

Aqualysin I の P 1 特異性は、比較に用いた3種の subtilisin 型酵素、proteinase K, subtilisin BPN', subtilisin Carlsberg とよく似ていた。一次構造を比較すると、aqualysin I と proteinase K は subtilisin の S 1 部位(「ポケット」を形成している)の「天井」に当たる Val¹⁶⁵-Gly¹⁶⁶-Tyr¹⁶⁷部分の3残基を欠いている (Fig-II-4 に subtilisin 型酵素の残基番号160~170 付近

のアミノ酸配列を比較して示した)。このため、2 酵素 aqualysin I と proteinase K の S 1 部位の立体構造は subtilisin と異なると推定されるが、実際の野生型酵素における P 1 特異性には、この 3 残基の存在は大きな影響を与えていなかった。subtilisin BPN' における実験では、S 1 部位の天井を構成する残基の 1 つ Gly¹⁶⁶ を種々のアミノ酸に置換して S 1 ポケットの体積を変え、P 1 特異性を改変することに成功しており (Estell *et al.* 1986) Gly¹⁶⁶ 残基は側鎖を導入することにより P 1 特異性に対して積極的に関与することが知られているが、今回の測定の結果から推定すると subtilisin BPN' の Gly¹⁶⁶ 残基は Gly 残基の状態において P 1 特異性への寄与は小さいと考えられる。

Table-II-3. Comparison of P1-specificity.

A) aqualysin I

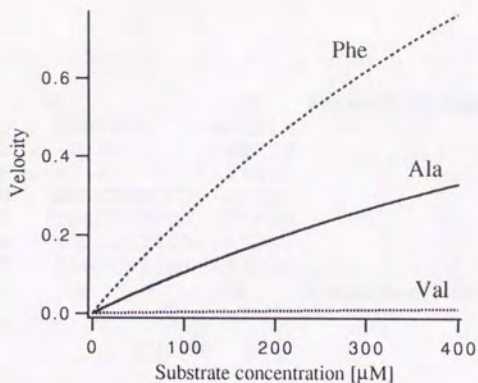
P1		k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe-Val-	Ala	4.7	39	1.2×10^5
	Val	0.09	340	2.5×10^2
Ala-Ala-	Ala	1.2	1050	1.2×10^3
	Val	0.04	900	5.0×10^1
	Phe	2.5	910	2.8×10^3

B) proteinase K, subtilisin Carlsberg and subtilisin BPN'

P1		proteinase K			subtilisin Carlsberg			subtilisin BPN'		
		k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe-Val-	Ala	20	760	2.7×10^4	12	79	1.5×10^5	3.7	160	2.4×10^4
	Leu	0.6	350	1.7×10^3	4.5	110	4.1×10^4	0.8	70	1.1×10^4
Ala-Ala-	Ala	2.7	200	1.4×10^4	5.5	770	7.2×10^3	2.2	3200	6.7×10^2
	Val	0.006	180	3.3×10^1	0.16	1450	1.1×10^2	0.02	2420	8.3

Data from Table-II-1

A) suc-Ala-Ala-X-pNA (X=Ala, Val, Phe)



B) suc-Phe-Val-X-pNA (X=Ala, Leu)

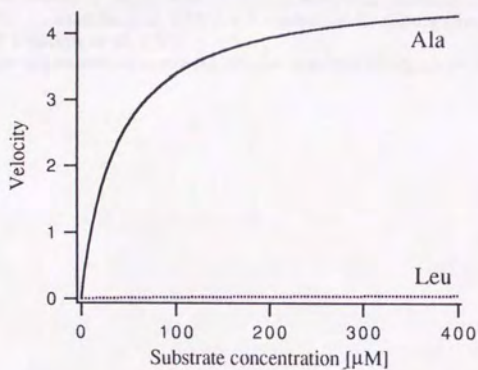


Fig-II-3. Saturation curves of aqualysin I obeying Michaelis-Menten kinetics.
Substrate : A) suc-Ala-Ala-X-pNA (X= Ala, Val, Phe), B) suc-Phe-Val-X-pNA (X=Ala, Leu)
[E]=1.0

	160		170	Residue No. of aqualysin I
AQ :	ANACNYS		PARVAEA	
PR :	-D-R---		--SEPSV	
TH :	NT-P--		--YYSN-	
AM :	SSGSTSTVGY-		-KYPST	
BP :	TSGSSSTVGY-		GKYPSV	
CA :	NSGSTNTIGY-		-KYDSV	
DY :	SSGSQNTIGY-		-KYDSV	
	160		170	Residue No. of subtilisin
		↑		
		Gly166		

Fig-II-4. Comparison of amino acid residues around residue number 166.

"-" represents for the same amino acid residue to aqualysin I; "↓" : the residues of catalytic triad.

AQ : aqualysin I (Kwon *et al.* 1988); PR : proteinase K (Gunkel *et al.* 1989);

TH : thermitase (Meloun *et al.* 1985); AM : subtilisin Amylosacchariticus (Stahl *et al.* 1984);

BP : subtilisin BPN' (Vanantha *et al.* 1984); CA : subtilisin Carlsberg (Smith *et al.* 1968);

DY : subtilisin DY (Nedkov *et al.* 1983)

The numbers above sequences represent for residue numbers of aqualysin I ; the numbers below for subtilisin.

P 2 特異性

Table-II-1 より P 2 特異性を表す Suc-Phe-X-Ala-pNA ($X = \text{Ala, Nle, Leu, Val}$) に対する反応速度定数を Table-II-4 にまとめた。

(aqualysin I の P 2 特異性) 4 種の基質でのミカエリス定数 (K_M) の値はほぼ同じ大きさを示しており、P 2 特異性は k_{cat} 値に表れていた ($\text{Ala} > \text{Nle} > \text{Val} > \text{Leu}$ の順に大きい)。P 2 残基の側鎖に関してまとめると、aqualysin I の S 2 部位は非分岐型の Ala, Nle 残基を好み、分岐型の Val, Leu 残基を余り好まなかった。

また、P 2 部位に β Ala を有する 4 種の基質に対して活性は見られなかった。 α アミノ酸に比べて、 β Ala 残基ではペプチド結合から次のペプチド結合までの距離がメチレン基 1 つ分長くなっており、酵素の基質結合部位と基質分子との逆平行 β シート形成が妨げられていたと考えられる。

(subtilisin 型酵素との P 2 特異性の比較) Aqualysin I においては P 2 残基の違いによらずほぼ一定のミカエリス定数値をとっていたのに対し、他 3 種の酵素ではこの傾向は見られなかった。ミカエリス定数に関して、4 種の酵素に共通して Nle 残基を P 2 部位に有する基質において K_M 値は小さかった。最も高い反応性を与えた P 2 残基は酵素によって異なるが (aqualysin I では Ala 残基、proteinase K では Val 残基、subtilisin Carlsberg では Nle 残基、subtilisin BPN' では Ala 残基であった)、aqualysin I を含む 3 酵素 (proteinase K と subtilisin BPN') においては Ala 残基に対する反応性が高いことが共通していた (subtilisin Carlsberg の

み Ala 残基に対する反応性は低く、他の3酵素と異なっていた)。P2 特異性の比較を容易にするために、4種基質の反応速度の飽和曲線を酵素ごとに比較して Fig-II-5 に示した。Subtilisin Carlsberg を除く3酵素において P2 嗜好性は Ala > Nle > Leu であり、側鎖の小さいもの、非分岐のものが好まれる傾向にあった。

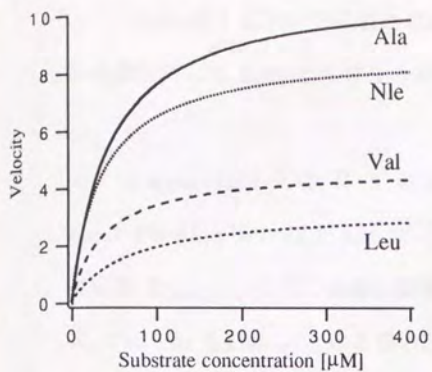
Table-II-4. Comparison of P2-specificity of four proteases.
Kinetic parameters for suc-Phe-X-Ala-pNA (X = Ala, Nle, Leu, Val).

P2	aqualysin I			proteinase K		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μ M]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μ M]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Ala	11	44	2.5×10^5	12	55	2.1×10^5
Nle	8.8	36	2.5×10^5	8.8	80	1.1×10^5
Leu	3.3	71	4.6×10^4	3.7	140	2.6×10^4
Val	4.7	39	1.2×10^5	20	760	2.7×10^4

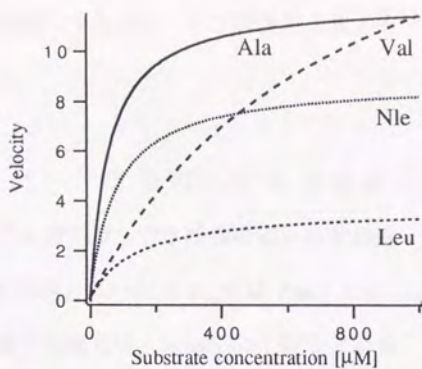
P2	subtilisin Carlsberg			subtilisin BPN'		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μ M]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μ M]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Ala	2.3	160	1.4×10^4	18	55	3.5×10^5
Nle	28	24	1.2×10^6	5.2	10	4.9×10^4
Leu	20	270	7.4×10^4	3.2	250	1.2×10^4
Val	12	79	1.5×10^5	3.7	160	2.4×10^4

Data from Table-II-1

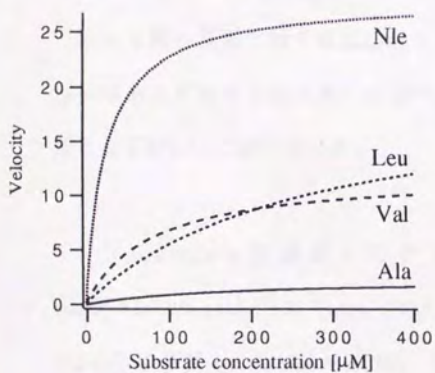
A) aqualysin I



B) proteinase K



C) subtilisin Carlsberg



D) subtilisin BPN'

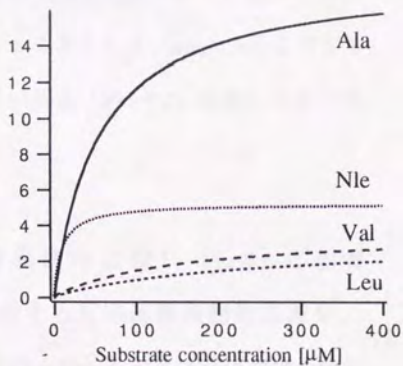


Fig-II-5. Comparison of P2-specificity by saturation curves of serine proteases obeying Michaelis-Menten kinetics.
 Substrate : suc-Phe-X-Ala-pNA (X= Ala, Nle, Leu, Val), [E]=1
 A) aqualysin I, B) proteinase K, C) subtilisin Carlsberg, D) subtilisin BPN'

P 3 特異性

Table-II-1 における基質の反応速度のうちから、P 3 特異性を表すものを選び出して Table-II-5 にまとめた。

(aqualysin I の P 3 特異性) 2 種のペプチド基質 suc-X-Ala-Ala-pNA ($X = \text{Ala, Phe}$) の比較では、P 3 残基の違いは反応速度定数 k_{cat} 、 K_M の両方の値に影響を及ぼしていた (k_{cat} では Phe) Ala、 K_M では Phe (Ala)。この 2 種の基質の比較では、aqualysin I の S 3 部位は P 3 残基として Ala 残基よりも Phe 残基を好むことがわかった。また、2 種の基質 suc-X-Val-Ala-pNA ($X = \text{Phe, Ile}$) の比較では、反応速度定数の差は小さく、アミノ酸残基の違いは P 3 特異性に反映されていなかった。これら 4 種の基質に対する反応性をあわせて考えると、aqualysin I の S 3 部位はある程度疎水性の高く体積の大きい残基 (Phe や Ile 残基) を P 3 残基として好むことがわかった。

(subtilisin 型酵素との P 3 特異性の比較) Fig-II-6 に基質 suc-X-Ala-Ala-pNA ($X = \text{Ala, Phe}$) に対する反応速度の飽和曲線を、Fig-II-7 に基質 suc-X-Val-Ala-pNA ($X = \text{Phe, Ile}$) に対する反応速度の飽和曲線を示した。2 酵素 proteinase K, subtilisin BPN' においては aqualysin I と同様に疎水性が高く体積の大きいアミノ酸残基 (Phe) に対して高い反応性を示した。基質 suc-X-Ala-Ala-pNA に対しては、 k_{cat} 、 K_M 値の大きさにおいて aqualysin I と同程度を示し、これらの類縁酵素の S 3 部位が同じ機構によって P 3 アミノ酸残基を認識していることが示唆された。Subtilisin

Carlsberg においては P 2 特異性の場合と同様に、他の 3 酵素と異なる P 3 特異性を示した。

Subtilisin Carlsberg の基質結合部位 (S 2 ポケットの構成残基、および S 3 部位の構成残基) の立体構造は proteinase K のものと類似した立体構造を有しているため、subtilisin Carlsberg が示した P 3 特異性の違いは、構造の差異によるものではなく、溶液中での基質反応時の動的構造の違いか、疎水環境の違いがあると考えられる。

Table-II-5. Comparison of P3-specificity of four proteases.

A) aqualysin I

P3	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe -Ala-Ala	11	44	2.5 × 10 ⁵
Ala	1.2	1050	1.2 × 10 ³
Phe -Val-Ala	4.7	39	1.2 × 10 ⁵
Ile	5.0	64	7.8 × 10 ⁴

B) proteinase K

P3	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe -Ala-Ala	12	55	2.1 × 10 ⁵
Ala	2.7	200	1.4 × 10 ⁴
Phe -Val-Ala	20	760	2.7 × 10 ⁴
Ile	7.3	340	2.2 × 10 ⁴

C) subtilisin Carlsberg

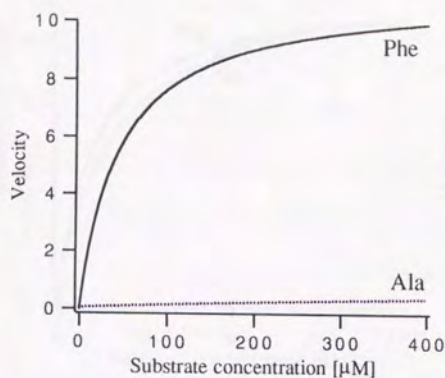
P3	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe -Ala-Ala	2.3	160	1.4 × 10 ⁴
Ala	5.5	770	7.2 × 10 ³
Phe -Val-Ala	12	79	1.5 × 10 ⁵
Ile	40	540	7.5 × 10 ⁴

D) subtilisin BPN'

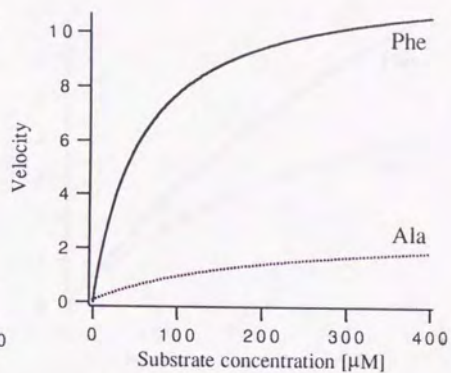
P3	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Phe -Ala-Ala	18	55	3.5 × 10 ⁵
Ala	2.2	3200	6.7 × 10 ²

Data from Table-II-1

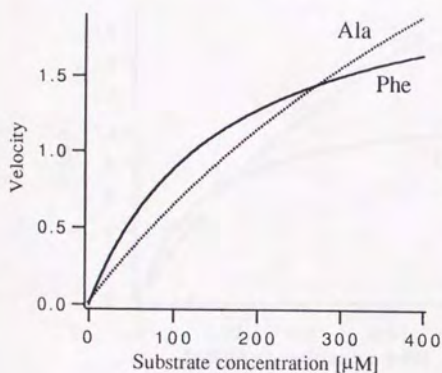
A) aqualysin I



B) proteinase K



C) subtilisin Carlsberg



D) subtilisin BPN'

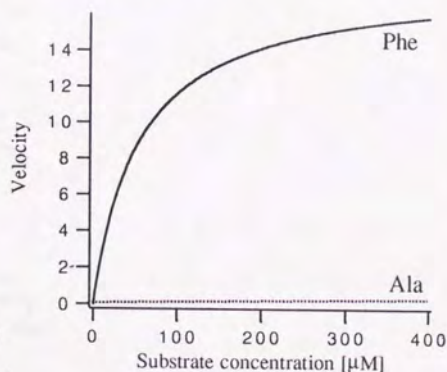
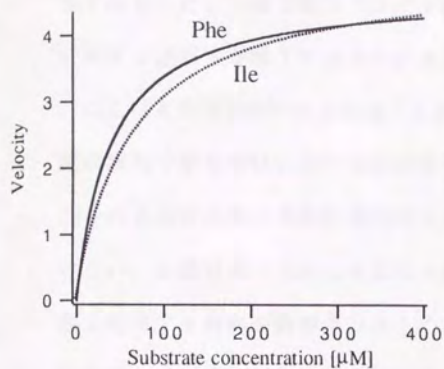
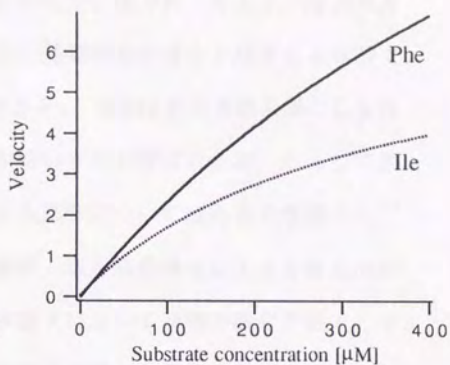


Fig-II-6. Comparison of P₃-specificity by saturation curves of serine proteases obeying Michaelis-Menten kinetics.
Substrate : suc-X-Ala-Ala-pNA (X= Ala, Phe), [E]=1.0
A) aqualysin I, B) proteinase K, C) subtilisin Carlsberg, D) subtilisin BPN'

A) aqualysin I



B) proteinase K



C) subtilisin Carlsberg

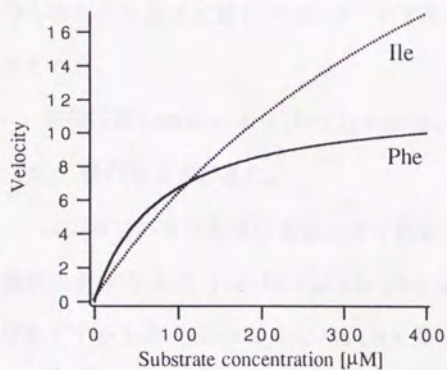


Fig-II-7. Comparison of P3-specificity by saturation curves of serine proteases obeying Michaelis-Menten kinetics.
Substrate : suc-X-Val-Ala-pNA (X= Ile, Phe), [E]=1.0
A) aqualysin I, B) proteinase K, C) subtilisin Carlsberg

基質特異性に対して有機溶媒が与える影響

Table-II-1 に示した反応速度定数はすべて、有機溶媒を含まない溶媒系で測定した。基質であるペプチドはペプチド鎖が長くなると、水溶媒系に対する溶解度が低下する傾向があり、基質の溶解度を上昇させる目的でしばしば有機溶媒が添加されることがある。添加される有機溶媒としては両親媒性で酵素活性に対する阻害能が低いものを選ばれるが、こうして添加される有機溶媒が基質特異性に与える影響についてはあまり考慮されていない。有機溶媒の添加は基質の一般酸・塩基触媒機構による非酵素的分解を促進する傾向が観測されるため本論文において通常の測定方法としては採用していないが、この有機溶媒の添加が酵素の基質特異性を変化させる現象が観測された。

有機溶媒として Dimethylsulfoxide (DMSO, 10%) を含む条件下で得られた反応速度定数を Table-II-1 の反応速度定数と比較し、Table-II-6 にまとめた。

有機溶媒の添加により、いずれの酵素、基質においてもミカエリス定数 (K_m) 値の増大が起きた。

反応性に対する影響は基質により異なっていて、有機溶媒の添加で k_{cat} 値が上昇するもの (suc-Ile-Val-Ala-pNA, suc-Phe-Val-Ala-pNA 等) もあれば低下するもの (suc-Phe-Ala-Ala-pNA 等) もあった。

有機溶媒の添加は、主に P 2 特異性に対して影響を及ぼした。反応速度定数が変化したものの中で、特に基質 suc-Phe-Ala-Ala-pNA において反応速度定数の変化が大きく、 k_{cat} 値は 2 桁低下した。3 種の基質 suc-Phe-X-Ala-pNA (X=Ala, Leu, Val) に対する反応速度定数を比較すると

有機溶媒を含まない系では k_{cat} 値は Ala > Val > Leu の順に大きかったが、DMSO (10%) の添加により k_{cat} 値は Val > Leu > Ala の順となり、Ala 残基に対する反応性は低下した。この時の aqualysin I の P2 特異性は、有機溶媒非存在下における subtilisin Carlsberg の P2 特異性と類似していた。このように、有機溶媒 DMSO の添加は aqualysin I の基質特異性を変化させた。

この結果から、有機溶媒 DMSO が aqualysin I の P2 特異性を変化させる「スイッチ」として働くことが示唆された。

Table-II-6. Effect of organic solvent (dimethylsulfoxide) on kinetic parameters for the hydrolysis of suc-tripeptide-pNA by three bacterial proteases. Assays were performed with/without 10 % DMSO, at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM)

A) aqualysin I

			without DMSO a)			with 10% DMSO b)		
P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Ile	Val	Ala	5.0	64	7.8×10^4	8.1	1050	7.8×10^3
Phe	Val	Ala	4.7	39	1.2×10^5	9.2	440	2.1×10^4
Phe	Leu	Ala	3.3	71	4.6×10^4	0.43	3070	1.4×10^2
Phe	Ala	Ala	11	44	2.5×10^5	0.18	2200	8.0×10^1
Ala	Ala	Ala	1.2	1050	1.2×10^3	---	>2000	1.2×10^2

B) proteinase K

			without DMSO a)			with 10% DMSO b)		
P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Ile	Val	Ala	7.3	340	2.2×10^4	---	>2000	6.0×10^2
Phe	Val	Ala	20	760	2.7×10^4	---	>>10 ⁴	3.4×10^3
Ala	Ala	Ala	2.7	200	1.4×10^4	4.9	1100	4.4×10^3

C) subtilisin Carlsberg

			without DMSO a)			with 10% DMSO b)		
P3	P2	P1	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [μM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Ile	Val	Ala	40	540	7.5×10^4	1.2	1000	1.1×10^3
Phe	Val	Ala	12	79	1.5×10^5	---	>2000	5.8×10^3
Ala	Ala	Ala	5.5	770	7.2×10^3	---	>2000	1.5×10^3

a) Data from Table-II-1.

b) Data from Tanaka, T., *graduation thesis, university of Tokyo*, 1987.

subtilisin Carlsberg の基質特異性の考察

subtilisin Carlsberg の P 2 · P 3 特異性は、他の subtilisin 型の 3 酵素と異なっていた。この酵素の S 2 部位の Ala 残基嗜好性は低く、S 3 部位の Phe 残基嗜好性も低かった。

subtilisin Carlsberg は、subtilisin 型酵素において他のものよりも高い反応性を示すことが報告されている（今回の測定においてもそのことは確認された）。この反応性の差異は、S 2 部位の構成残基の違いによるという報告もあり（Takagi *et al.* 1988）、こうした S 2 部位の構成残基の違いに起因する疎水環境の違いが、P 2 特異性の違いをもたらしていると推定することが出来る。この推論の根拠の 1 つは、上述した有機溶媒の添加による aqualysin I の P 2 特異性の変化である（aqualysin I の P 2 特異性は DMSO の添加により subtilisin Carlsberg と同じ傾向を示した）。

また、第 V 章で述べることであるが、S 2 部位の残基 Gly¹⁰¹ を Ala 残基に置換した変異型酵素も、subtilisin Carlsberg と同じ P 2 · P 3 特異性を示し、S 2 部位の環境の違いが、P 2 · P 3 特異性の双方に影響を及ぼすことがわかった。

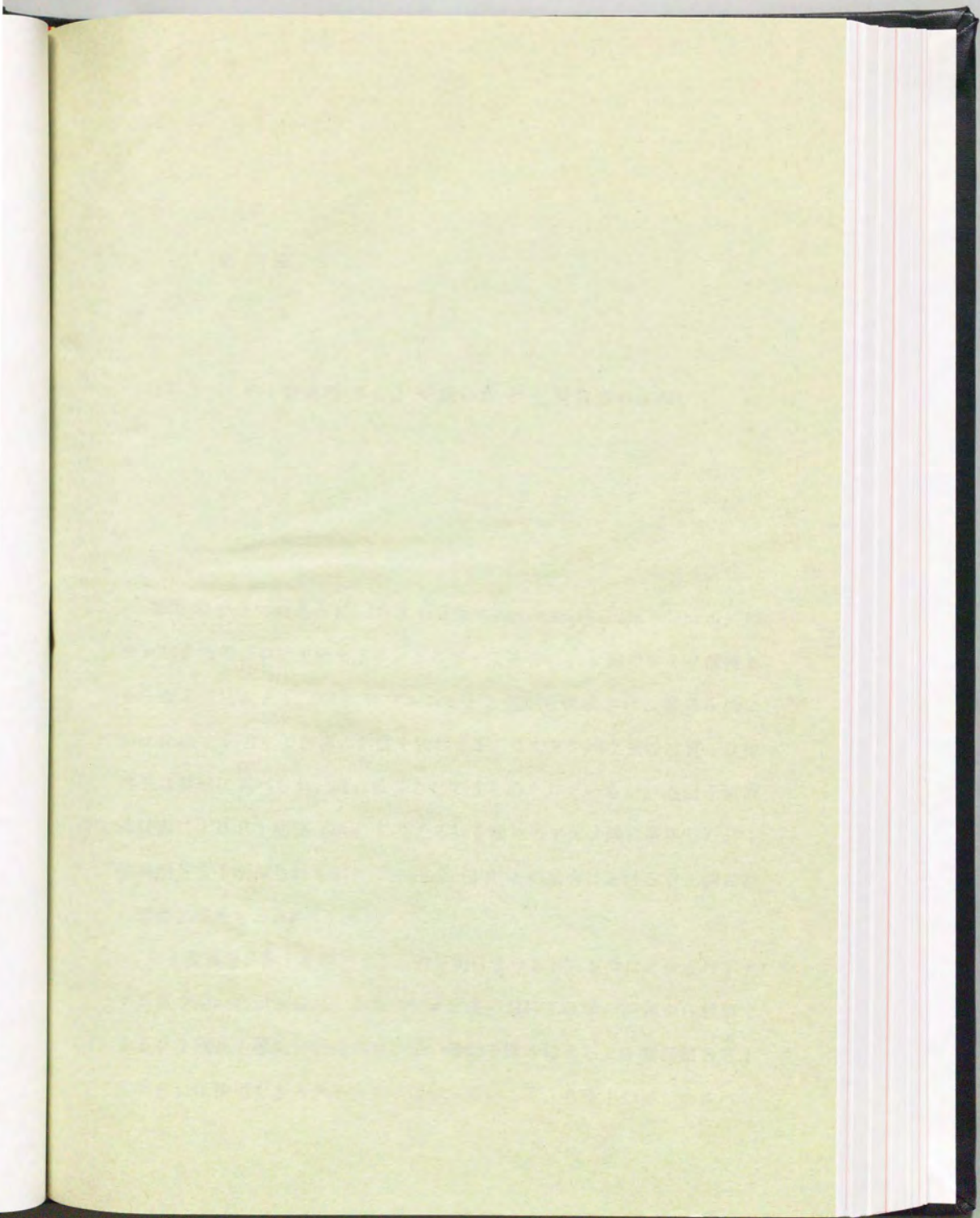
これらのことから推定して、subtilisin Carlsberg の基質結合部位の立体構造は、他の subtilisin 型酵素と同じであり、特異性の違いは反応時における動的構造の違いによる影響よりも、むしろ、サブサイトの疎水環境の違いによるものであると考えられる。

基質特異性のまとめ

以上みてきた P 1 ~ P 3 特異性の比較により、aqualysin I は一次構造だけでなく反応性においても、他の subtilisin 型酵素と類似していることがわかった。特に、P 2 · P 3 特異性においては aqualysin I は subtilisin BPN' や proteinase K と似ており、立体構造や反応時における構造の変化までも似ていることが示唆された。

これらの解析から、S 2 · S 3 部位を中心とした基質結合部位における aqualysin I の立体構造は、他の subtilisin 型酵素とほぼ同じであると推定することができる。

トリペプチド基質における aqualysin I の疎水性残基に対する特異性をまとめると、S 1 部位は Ala または Phe 残基嗜好型、S 2 部位は Ala 残基嗜好型であり、S 3 部位は Phe 残基嗜好型である。P 1 · P 2 残基としては、側鎖の小さい疎水性残基 Ala が好まれたため、その意味においてこの部位の特異性は「エラスターゼ」的であるが、S 3 部位は反対に Phe 残基嗜好型であるために「エラスターゼ」性は低い。したがって、aqualysin I を含む subtilisin 型酵素を「エラスターゼ」に改変するには、S 3 部位を標的とすればよいことがわかった。また、「エラスターゼ」的に改変するのは反対に、Phe 残基のような疎水的で体積が大きいアミノ酸に対する嗜好性をもたせるには、S 2 部位を標的にすればよいことになる。□



第 III 章

P 1 変異型 S S I を用いた P 1 特異性の解析

第III章で述べたように、S S I (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) はタンパク性のプロテアーゼ・インヒビターである。113個のアミノ酸残基からなる (MW = 11,500) サブユニット2個から構成され、等モル的に subtilisin と結合して酵素の活性を失わせる。このタンパク質の性質・立体構造は詳細に調べられ、既に成書としてまとめられているが、遺伝子組換え技術により P 1 部位 (Met²⁹ に当たる) を種々のアミノ酸に置換した P 1 変異型 S S I が得られており、subtilisin BPN^r との結合における P 1 特異性の解析に成果をおさめている。

P 1 変異型 S S I を用いることの長所は2つある。1つは、合成ペプチド基質を用いた測定には、基質の化学合成における収率の問題から使用できる P 1 残基の種類に制限があるが、遺伝子操作による P 1 変異型 S S I の場合には使用できる P 1 残基の種類が多いこと。もう1つは、合成ペプ

チド基質に対する P 1 特異性は K_M 値のみならず k_{cat} 値に大きな影響を与えるため、 k_{cat} 値が小さい場合には測定上の困難（酵素を多量に消費する）が増すが、SS I との反応においては k_{cat} 値に関わらず低濃度酵素を用いて測定できること、である。

本章の目的は 2 つある。

(1) SS I との反応を利用して aqualysin I の基質結合部位周辺の情報をえること

(2) Aqualysin I の P 1 特異性を解析し、他の subtilisin 型酵素と比較することである。

これらの目的から、第 II 章のペプチド基質を用いた測定と同様に、3 種の subtilisin 型酵素 proteinase K, subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN' を対照に用いて、P 1 部位の異なる 6 種の SS I において阻害定数 (K_i) の測定をおこなった。

材料と方法

酵素

Aqualysin I と 3 種の subtilisin 型酵素 proteinase K (Merck 社より購入)、subtilisin BPN' (Nagase Biochemicals LTD., より購入)、subtilisin Carlsberg (Sigma Biochem. Co., より購入) を使用した (第 II 章参照)。

基質

2 つの基質 suc-Phe-Nle-Ala-pNA (液相法により合成したもの。第 II 章参照)、suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Sigma Chemical Co., より購入) を使用した。基質は HEPES 緩衝液 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5 at 40°C) に溶解させ、基質濃度は、分取した一部を酵素分解させた後、分光学的に定量した ($\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

P 1 変異型 S S I

精製した野生型 S S I は村尾教授の好意により譲り受けたものを使用した。5 種の P 1 変異型 S S I は三浦教授の好意により譲り受けたものを使用した。S S I のタンパク質濃度は、吸光度 (野生型 S S I は $\epsilon_{280} = 18660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) および Lowry 法 (B S A を標準タンパク質とした) により定量し、SDS-PAGE により純度を確認した。

阻害定数 (K_i) の測定原理

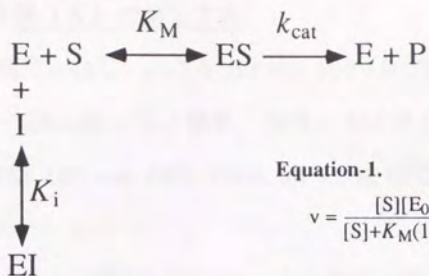
SS I は subtilisin の基質結合部位に対して、基質と競争的に結合する。したがって、SS I と酵素との結合の強さは基質と酵素との結合に対する阻害定数(競争阻害としての K_i) の値として評価することができる。Scheme-1 にミカエリス・メンテン型反応形式における競争阻害の様式を示した。ミカエリス定数 (K_M) と阻害定数 (K_i) がほぼ同じ大きさであるとき、みかけの反応速度 v は Equation-1 に示すようにみかけのミカエリス定数を増大させる。このミカエリス定数のみかけの値の変化を調べることにより (Dixon plot 等の方法を用いる)、阻害定数の値は決定できるはずである。しかし、実際には SS I と酵素との結合は強く (つまり SS I・酵素間の解離定数が K_M よりも小さい)、また平衡状態に到達する速さが基質と SS I の場合で異なること、及び、それぞれの結合の大きさを測定するのに適した酵素濃度が異なることなどから、Scheme-1 に基づく測定法においては、SS I は基質に対して不可逆的な競争阻害剤として振舞い、平衡論的な阻害定数の測定ができない。

そこで、ここでは「強い結合をする」阻害剤 (tight-bound inhibitor) の阻害定数を測定する方法を採用した (Henderson *et al.* 1972, Kuramochi *et al.* 1979, Tyagi 1991, Leatherbarrow *et al.* 1991)。SS I と酵素の解離定数 (阻害定数 K_i と便宜的に同じであるとする) は非常に小さく、Scheme-2 に示した SS I・酵素間の平衡状態の到達に多少時間がかかる。平衡状態においては Equation-2~4 に示した条件から Equation-5 に示すように全酵素に対する遊離酵素の濃度比を α とおくと、Equation-6,7 に示した SS I 濃度 $[I]$ と遊離酵素の相対濃度比 α の値との関係式が得られる。し

たがって、一定濃度の酵素に対して、阻害剤 S S I の濃度 $[I]$ に対する α の値を求めれば阻害定数 (K_i) の値が決定できる。反応論における阻害定数を測定する場合には、基質を用いて遊離酵素の相対濃度比 α を求める。基質を分解できるのは遊離の酵素のみであるため、この濃度比 α は基質に対する反応速度比 (阻害剤の非存在時の反応速度を 1 とする) と同じになる (Equation-5)。しかし、見かけの阻害定数 $K_{i(app)}$ は、基質が阻害剤に対してもたらず競争効果により大きく評価されるため、Equation-8 に示した操作により補正し、真の値 $K_{i(0)}$ を得る。実際の反応においては、SSI はダイマーとして挙動する。そのため反応様式は Scheme-3 に示す形式に従い、2 段階の解離・会合をおこなうと考えられるが、それぞれの段階における解離定数 (K_i) の値の差異は報告されておらず、正または負の協同性も観測されていないため、モデルおよび計算を単純化するために Scheme-2 の反応形式に従うと仮定して解析を行った。

また、Equation-6 (Henderson plot に対応する。Henderson, 1972) に従う方法では両逆数プロットを使用するために、 α の値が 0 付近と 1 付近の両方において計算誤差を大きくしてしまうため、阻害定数 (K_i) の測定にはすべて Equation-7 に従う方法を採用した。

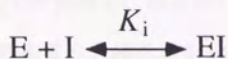
Scheme-1. Competitive inhibition



Equation-1.

$$v = \frac{[S][E_0]k_{cat}}{[S] + K_M(1 + [I]/K_i)}$$

Scheme-2.



Equation-2.

$$[E_0] = [E] + [EI]$$

Equation-3.

$$[I_0] = [I] + [EI]$$

Equation-4.

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Equation-5.

$$\alpha = \frac{[E]}{[E_0]} \left(= \frac{v_i}{v_0} \right)$$

Equation-6.

$$\frac{[I_0]}{1 - \alpha} = [E_0] + \frac{K_i}{\alpha}$$

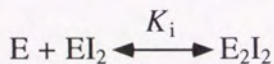
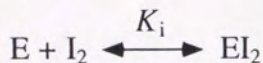
Equation-7.

$$\alpha = \frac{([E_0] - [I_0] - K_i) + \sqrt{([E_0] - [I_0] - K_i)^2 + 4[E_0]K_i}}{2[E_0]}$$

Equation-8.

$$K_{i(\text{int})} = \frac{K_{i(\text{app})}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

Scheme-3.



阻害定数 (K_i) の測定方法

測定は40℃、pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5 at 40℃) においておこなった。酵素、基質、および SSI はすべて HEPES 緩衝液 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.5 at 40℃) を用いて希釈し濃度を調整した。

SSI (濃度可変。100 μl) と酵素 (濃度一定。100 μl) とを混合して40℃で保温 (10~30分間) して平衡状態に到達させたのち、溶液から140 μl を分取し、あらかじめ40℃で保温しておいた基質溶液 200 μl と混合して基質の分解活性を410 nm で追跡した。得られた反応速度の値から、SSI 非存在時の反応速度を 1 として SSI 濃度に対する相対残存活性 (α) を求め、阻害定数 $K_{i(app)}$ を求めた。得られた阻害定数の値をもとに、酵素濃度と SSI 濃度を再調製し (ともに阻害定数 K_i 値付近の濃度に調製する)、阻害定数 $K_{i(app)}$ を求めた。得られた $K_{i(app)}$ の値から、使用した基質の濃度とミカエリス定数 K_M の値を用いて (Table-III-1 にまとめた。第II章参照) Equation-8 に従い、真の阻害定数 $K_{i(int)}$ の値を得た。SSI 濃度 $[I]$ と残存活性 (α) からの K_i の算出は、Equation-7 に従い、非線形の最小自乗法によるアルゴリズムを作製して、回帰的に求めた。

結果と考察

反応形式の検証

Aqualysin I に対する野生型 SSI の阻害曲線を Fig-III-1 に示した。図中の点は実際の測定値を、波線は Equation-7 にもとづいて得られた K_i 値から計算した値を表す。解析に用いた反応形式 (Scheme-2, Equation-2~8) は aqualysin I において実測値とよく一致していた。また、図には示していないが、他の 3 酵素においても aqualysin I の場合と同様にこの反応形式と実測値の一致を確認した。

野生型 SSI の阻害定数

野生型および 5 種の P1 変異型 SSI の阻害定数を Table-III-2 にまとめた。

野生型 SSI (P1 部位は Met 残基) の阻害定数は、4 種の酵素いずれの場合も非常に小さく ($10^9 \sim 10^{11}$ M)、SSI はこれらの酵素と強く結合した。

阻害定数の大きさを酵素間で比較すると subtilisin Carlsberg < subtilisin BPN' < aqualysin I < proteinase K の順に大きくなり、2 つの subtilisin に対して特に強い阻害能を示した。

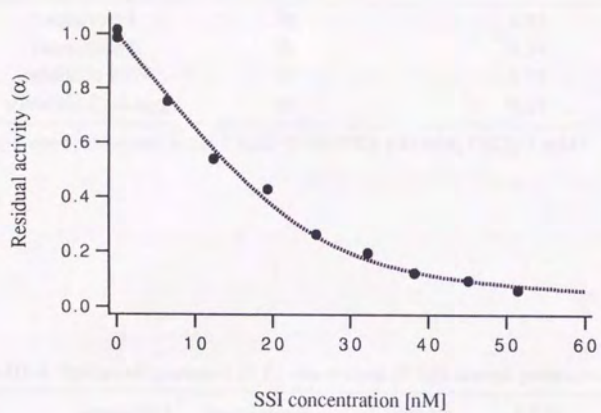


Fig-III-1. Residual activity (α) plotted against SSI concentration. Closed circles represent for measured values, and dotted line represents for theoretical value, calculated from the data on Table-III-2. Aqualysin I and SSI(wild type)

Table-III-1. Michaelis constants of proteases for peptide substrates.

enzyme	K_M	
	suc-Phe-Nle-Ala-pNA	suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
	[μ M]	[mM]
aqualysin I	36	1.22
proteinase K	80	0.34
subtilisin BPN'	10	0.29
subtilisin Carlsberg	24	0.29

Assays were performed at pH 7.5, 40°C (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM).

Table-III-2. Inhibition constants of P1 site mutant of SSI toward proteases.

P1	aqualysin I	proteinase K	Carlsberg	BPN'
Met(wt)	3.0×10^{-10}	1.5×10^{-9}	7.6×10^{-11}	9.6×10^{-11}
Ala	3.8×10^{-10}	2.2×10^{-9}	4.2×10^{-12}	6.0×10^{-11}
Phe	3.6×10^{-10}	1.8×10^{-9}	6.4×10^{-11}	7.2×10^{-11}
Leu	5.9×10^{-10}	2.6×10^{-9}	1.9×10^{-11}	8.2×10^{-11}
Asp	1.7×10^{-10}	1.0×10^{-8}	5.0×10^{-9}	4.0×10^{-9}
Arg	8.1×10^{-11}	1.1×10^{-9}	1.3×10^{-10}	6.6×10^{-11}

Assays were performed at pH 7.5, 40°C (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM)

P 1 特異性の比較

野生型を含む 6 種の P 1 変異型 SSI の阻害定数を酵素ごとに比較し、Fig-III-2 に示した。

(疎水性 P 1 残基の比較) 4 つの疎水性残基 Ala, Met, Phe, Leu を P 1 部位にもつ S S I の阻害定数を比較した。Subtilisin Carlsberg を除く 3 酵素においては、野生型 (Met) と他の残基 (Ala, Phe, Leu) において差はほとんど見られなかった。この 3 酵素において観測された唯一の違いは、subtilisin BPN' において、変異型 (Leu) S S I に対する反応が他のものよりも遅く (平衡状態に到達する速度が小さい)、他のものが 10 分間の反応ではほぼ平衡状態に到達したのに対して、(Leu) S S I と subtilisin BPN' の組合せにおいては 30 分間程度の時間を必要としたことである。これら 3 酵素での P 1 特異性は、第 II 章で調べたペプチド基質に対する P 1 特異性と比較すると、P 1 特異性がミカエリス定数 (K_M) 値にほとんど反映されていなかった点において、この結果とよく一致した。

一方、subtilisin Carlsberg ではペプチド基質で見られた P 1 特異性とは異なり、S S I の P 1 残基の違いが阻害定数に大きく反映された (阻害定数 K_i は Ala < Leu < Phe, Met の順に大きくなっていった)。

(電荷をもつ P 1 残基の比較) 電荷をもつ 2 種の残基 Asp, Arg を P 1 部位にもつ S S I の阻害定数を比較すると、4 酵素に共通して Arg 残基において阻害定数は小さな値を示し、Asp 残基では大きな値を示した。

野生型 (Met) S S I の場合と比較すると、3 酵素 proteinase K,

subtilisin BPN', subtilisin Carlsberg においては、(Arg)SSI は (Met)SSI と同程度の値を示し、(Asp)SSI では大きな値を示した。このように 4 酵素に共通してプラス電荷をもつ Arg 残基が S 1 部位に好まれた。

subtilisin BPN' における「電荷」に対する P 1 特異性は、S 1 部位の一部を構成している Glu¹⁵⁶ との静電的相互作用に起因すると考えられているが (Wells *et al.* 1987)、2 酵素 proteinase K, subtilisin Carlsberg においてはこの部位に対応する電荷は異なっており (subtilisin Carlsberg では Ser 残基、proteinase K では Asn 残基、aqualysin I では Asp 残基になっている)、少なくとも SSI との反応においては Glu¹⁵⁶ 以外の残基の寄与があると推定できる。

また、P1 部位に電荷をもつ 2 つの (Asp, Arg)SSI に対する aqualysin I の反応性は、他の 3 酵素と異なって (Asp)SSI の阻害定数が野生型 SSI の場合よりも大きく、S 1 部位における静電的環境の違いを示唆した。

subtilisin BPN' と P 1 変異型 SSI とを用いた解析の結果は、異なる条件下で既に得られている結果 (Kojima *et al.* 1991) と一致していた。

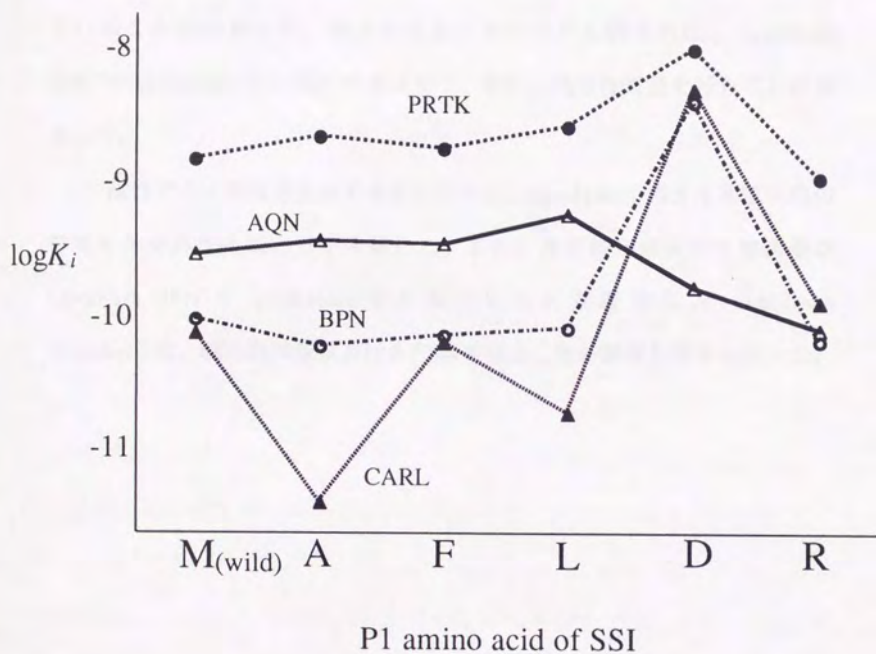


Fig-III-2. Comparison of P1 specificity.
 Abbreviations : AQN, aqualysin I; PRTK, proteinase K;
 BPN, subtilisin BPN' ; CARL, subtilisin Carlsberg

まとめ

以上をまとめると、SSIの結合の様式・強さから、aqualysin Iの基質結合部位周辺の立体構造は、比較に用いた他の subtilisin 型酵素と大体似ていることがわかった。疎水性残基における P1 特異性は、subtilisin BPN' や proteinase K と同じで差はなく、また、塩基性残基を好むことがわかった。

酸性アミノ酸残基に対する反応性では、aqualysin I の S1 部位は他の酵素と多少異なる反応性を示唆した。また、基質結合部位の立体構造が subtilisin BPN' や proteinase K と似ていると期待される subtilisin Carlsberg は、疎水性残基における P1 特異性は、他の酵素と異なっていた。

第1部 (第II、III章) のまとめ

Aqualysin Iは少なくとも3つのサブサイト (S1、S2、S3部位) を有することが、トリペプチド基質を用いての測定により明らかになった。基質特異性はそれぞれのサブサイトごとに異なっていて、しかも広い。S1部位はAlaやPhe残基を好み、分岐側鎖をもつLeu、Val残基を好まないという特徴を示した。S2部位は、AlaやNle残基の非分岐側鎖を有するアミノ酸を好み、S3部位は、Phe残基のような疎水性の高いアミノ酸を好んだ。これらのサブサイトごとの特徴は、subtilisin BPN'やproteinase Kと類似しており、aqualysin Iの基質結合部位の立体構造が、これらの類縁酵素と似ていることを期待させる。更に、構造を有する基質であるタンパク性プロテアーゼ・インヒビターSSIとの反応においてもaqualysin Iはこれらの類縁酵素との類似性を示し、subtilisin型酵素としての共通性を示した。

比較に用いた酵素のうちsubtilisin Carlsbergは、他の酵素と異なる反応性を示したが、aqualysin IのP2特異性が有機溶媒(DMSO)の添加によりsubtilisin Carlsberg型に変化することを考え合わせると、この酵素の基質認識機構は、見かけの反応性の差ほどには異なっていないと推定される。

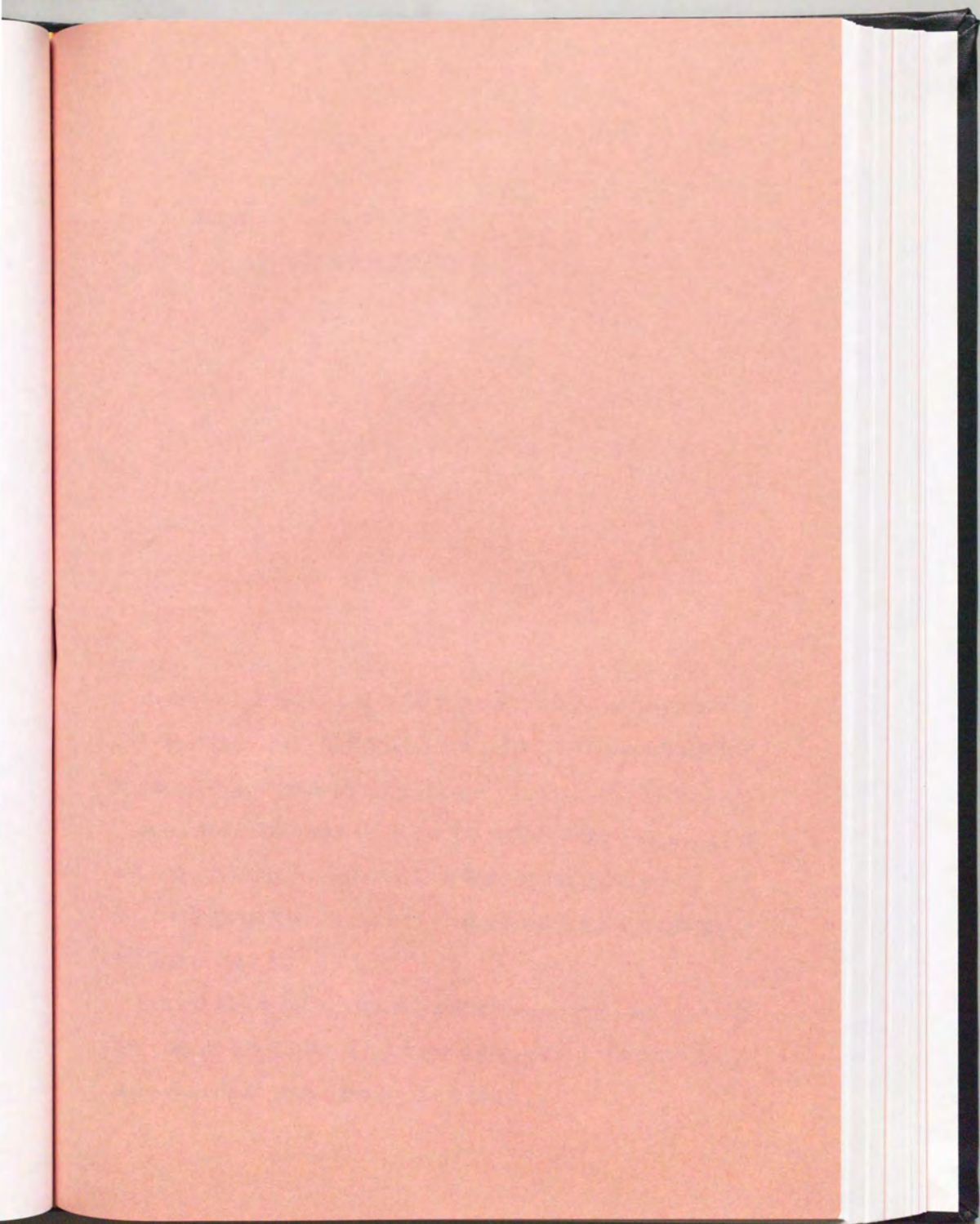
References

- Abrahm n,L., Tom,J., Burnier,J., Butcher,K.A., Kossiakoff,A., Wells,J.A.,
(1991) *Biochemistry*, **30**, 4151-4159
- Alden,R.A., Birktoft,J.J., Kraut,J., Robertus,J.D., Wright,C.S.,
(1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 337-344
- Betzel,C., Pal,G.P., Struck,M., Jany,K-D., Saenger,W., (1986) *FEBS Lett.*, **197**, 105-110
- Betzel,C., Pal,G.P., Saenger,W., (1988) *Eur.J.Biochem.*, **178**, 155-171
- Bode,W., Papamokos,E., Musil,D., Seemueller,U., Fritz,H., (1986) *EMBO J.*, **5**, 813-818
- Bode,W., Papamokos,E., Musil,D., (1987) *Eur.J.Biochem.*, **166**, 673-692
- Bott,R., Ultsch,M., Kossiakoff,A., (1988) *J.Biol.Chem.*, **263**, 7895-7906
- Braxton,S., Wells,J.A., (1991) *J.Biol.Chem.*, **266**, 11797-11800
- Brock,T.D., Freeze,H., (1969) *J.Bacteriol.*, **98**, 289
- Br mme,D., Klein,R., (1984) *Curr. Microbiol.*, **11**, 93-100
- Carter,P., Abrahms n,L., Wells,J.A., (1991) *Biochemistry*, **30**, 6142-6148
- Drenth,J., Hol,W.G.J., Jansonius,J.N., Koekoek,R., (1972) *Eur.J.Biochem.*, **26**, 177-181
- Estell,D.A., Graycar,T.P., Miller,J.V., Powers,D.B., Burnier,J.P., NG,P.G., Wells,J.A.,
(1986) *Science*, **233**, 659-663
- Gr n,H., Meldal,M., Breddam,K., (1992) *Biochemistry*, **31**, 6011-6018
- Gros,P., Kalk,K.H., Hol,W.G.J., (1991) *J.Biol.Chem.*, **266**, 2953-2961
- Gunkel,F.A., Gassen,H.G., (1989) *Eur.J.Biochem.*, **179**, 185-194
- Heinz,D.W., Priestle,J.P., Rahuel,J., Wilson,K.S., Gr tter,M.G.,
(1991) *J.Mol.Biol.*, **217**, 353-371
- Henderson,P.J.F., (1972) *Biochem.J.*, **127**, 321-333
- Hilz,H., Wieggers,U., Adamietz,P., (1975) *Eur.J.Biochem.*, **56**, 103-108
- Ichishima,E., Hamamatsu,H., Motai,H., Hayashi,H., (1983) *Food Chem.*, **11**, 187-200
- Ikenaka,T., Odani,S., Sakai,M., Nabeshima,Y., Sato,S., Murao,S.,
(1974) *J.Biochem.*, **76**, 1191-1209
- Jany,K-D., Lederer,G., Mayer,B., (1986) *FEBS Lett.* **199**, 139-144
- Johansen,J.T., Ottesen,M., Svendsen,I., Wybrandt,G.,
(1968) *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **36**, 365-384
- Kimura,T., Mayumi,Y., Takeuchi,M., Hayashi,K., Ichishima,E.,
(1979) *Curr. Microbiol.*, **3**, 153-156
- Kojima,S., Nishiyama,Y., Kumagai,I., Miura,K., (1991) *J.Biochem.*, **109**, 377-382
- Kossiakoff,A.A., White,M.U., Eigenbrot,C., (1991) *Biochemistry*, **30**, 1211-1221
- Kraus,E., Kiltz,H.-H., Femfert,U.F.,
(1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 233-237

- Kumagai,H., Matsue,M., Majima,E., Tomoda,K., Ichishima,E.,
(1981) *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 981-985
- Kuramochi,H., Nakata,H., Ishii,S., (1979) *J.Biochem.*, **86**, 1403-1410
- Kurihara,M., Markland,F.S., Smith,E.L., (1972) *J.Biol.Chem.*, **247**, 5619-5631
- Kwon,S.-T., Terada,I., Matsuzawa,H., Ohta,T., (1988) *Eur.J.Biochem.*, **173**, 491-497
- Kwon,S.-T., Matsuzawa,H., Ohta,T., (1988) *J. Biochem.*, **104**, 557-559
- Laemli,U.K., (1970) *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275
- Leatherbarrow,R.J., Salacinski,H.J., (1991) *Biochemistry*, **30**, 10717-10721
- Lee,Y.-C., Miyata,Y., Terada,I., Ohta,T., Matsuzawa,H.,
(1991) *Agric.Biol.Chem.*, **55**, 3027-3032
- Lee,Y.-C., Ohta,T., Matsuzawa,H., (1992) *FEMS Microbiology Lett.*, 73-78
- Lowry *et al.* (1951) *Nature*, **227**, 680-685
- Markland,F.S., Smith,E.L., (1967) *J.Biol.Chem.*, **242**, 5198-5211
- Markland,F.S., Shaw,E., Smith,E.L., (1968) *Proc.Natl.Acad.Sci.*,
- Matsuzawa,H., Hamaoki,M., Ohta,T., (1983) *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 25-28
- Matsuzawa,H., Tokugawa,K., Hamaoi,M., Mizoguchi,M., Taguchi,H., Terada,I.,
Kwon,S.-T., Ohta,T., (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 441-447
- Matthews,D.A., Alden,R.A., Birktoft,J.J., Freer,S.T., Kraut,J.,
(1975) *J.Biol.Chem.*, **250**, 7120-7126
- McPhalen,C.A., James,M.N., (1988) *Biochemistry*, **27**, 6582-6598
- Meloun,B., Braudys,M., Kostka,V., Hausdorf,G., Frömmel,C., Höhne,W.E.,
(1985) *FEBS Lett.*, **183**, 195-200
- Mitsui,Y., Satow,Y., Watanabe,Y., Iitaka,Y., (1979) *J.Mol.Biol.*, **131**, 697-724
- Mizushima,N., Spellmeyer,D., Hirono,S., Pearlman,D., Kollman,P.,
(1991) *J.Biol.Chem.*, **266**, 11801-11809
- Morihara,K., Oka,T., (1970) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **138**, 526-531
- Morihara,K., Oka,T., (1973) *FEBS Lett.*, **33**, 54-56
- Morihara,K., Oka,T., Tsuzuki,H.,
(1974) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **165**, 72-79
- Morihara,K., Tsuzuki,H., (1975) *Agric.Biol.Chem.*, **39**, 1489-1492
- Nedkov,P., Oberthür,W., Braunitzer,G.,
(1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 1537-1540
- Nedkov,P., Oberthür,W., Braunitzer,G.,
(1985) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **366**, 421-430
- Neet,K.E., Nanci,A., Koshland,D.E., (1968) *J.Biol.Chem.*, **243**, 6392-9401
- Peek,K., Daniel,R.M., Monk,C., Parker,L., Coolbear,T.,
(1992) *Eur.J.Biochem.*, **207**, 1035-1044
- Obata,S., Taguchi,S., Kumagai,I., Miura,K., (1989) *J.Biochem.*, **105**, 367-371

- Obata, S., Taguchi, S., Kumagai, I., Miura, K., (1989) *J. Biochem.*, **105**, 371-376
- Polgar, L., Bender, M.L., (1967) *Biochemistry*, **6**, 610-620
- Polgar, L., Bender, M.L., (1969) *Biochemistry*, **8**, 136-141
- Poulos, T.L., Alden, R.A., Freer, S.T., Birktoft, J.J., Kraut, J.,
(1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 1097-1103
- Power, S.D., Adams, R.M., Wells, J.A., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 3096-3100
- Robertus, J.D., Alden, R.A., Birktoft, J.J., Kraut, J., Powers, J.C., Wilcox, P.E.,
(1972) *Biochemistry*, **11**, 2439-249
- Russel, R.A., Klivanov, A.M., (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 11624-11626
- Sato, S., Muraio, S., (1973) *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1067-1074
- Schechter, I., Berger, A., (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157-162
- Sekine, H., (1973) *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1765-1767
- Sobek, H., Hecht, H.J., Hofmann, B., Aehle, W., Schomburg, D., (1990) *FEBS*, **274**, 57-60
- Smith, E.L., Delange, R.J., Evans, W.H., Landon, M., Marlland, F.S.,
(1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 2184-2191
- Shaw, E., Ruscica, J., (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6312-6313
- Siezen, R.J., Vos, W.M., Leunissen, J.A.M., Dijkstra, B.W.,
(1991) *Protein Engineering*, **4**, 719-737
- Takagi, H., Morinaga, Y., Ikemura, H., Inouye, M., (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 19592-19596
- Tanaka, N., Takeuchi, M., Ichishima, E., (1977) *Biochim. Biophys. Acta.*, **485**, 406-416
- Terada, I., Kwon, S.-T., Miyata, Y., Matsuzawa, H., Ohta, T.,
(1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 6576-6581
- Touhara, N., Taguchi, H., Koyama, Y., Ohta, T., Matsuzawa, H.,
(1991) *Appl. Env. Microbiol.*, **57**, 3385-3387
- Tyagi, S.C., (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 5279-5285
- Uehara, Y., Tonomura, B., Hiromi, K., (1980) *Archiv. Biochem. Biophys.*, **202**, 250-258
- Vidales, F.J., Benabeu, C., Ballesta, J.P.G., (1979) *Biochemistry*, **18**, 4155-4158
- Wells, J.A., Ferrari, E., Henner, D.J., Estell, D.A., Chen, E.Y.,
(1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7911-7925
- Wells, J.A., Powers, D.B., Bott, R.R., Graycar, T.P., Estell, D.A.,
(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 1219-1223
- Wright, C.S., Alden, R.A., Kraut, J., (1969) *Nature*, **221**, 235-241
- Wright, C.S., Alden, R.A., Kraut, J., (1972) *J. Mol. Biol.*, **66**, 283-289
- Wright, C.S., (1972) *J. Mol. Biol.*, **67**, 151-163
- Zaks, A., Klivanov, A.M., (1987) *J. Biol. Chem.*, **263**, 3194-3201
- IUPAC Nomenclature (1972) *Eur. J. Biochem.*, **27**, 201-207

Protein Protease Inhibitor - The Case of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI) Elsevier



第2部

基質特異性の改変

Aqualysin I は subtilisin 型のプロテアーゼである。subtilisin 型のプロテアーゼは総じて、広い基質特異性を示す。Aqualysin I が他の類縁酵素と異なるところは、その高い熱安定性にある。

もし、特異性の高い酵素や、もっと反応性の高い酵素が、aqualysin I のような高い熱安定性をもっていれば、産業面・研究面で有用である。しかし、熱安定性の改変・向上はタンパク質分子の構造全体を含む問題が絡み、困難も付随する。

そこで、視点をかえて、既に高い熱安定性をもつ酵素 aqualysin I の特異性・反応性を改変することにより、野生型のセリン・プロテアーゼとは異なる特異性をもつ酵素を創り出すことを試みた。

第I章でみたように、subtilisin 型のプロテアーゼは、基質分子において被切断部位よりもN末端側の部分 (P 1 ~ P 3 部位) を主として認識することが知られており、特異性の議論をする際には、P 1 · P 2 · P 3 の3つの部位に対する特異性が重要である。P 1 特異性を標的とした研究は、既に subtilisin BPN' を材料として行われており、成果を収めている (Estell *et al.* 1986)。

そこで、この第2部では、subtilisin 型酵素において未知である P 2 · P 3 特異性に標的を絞り、subtilisin 型酵素に共通した広い基質特異性を、より狭く、アミノ酸限定的な、高い特異性をもつ酵素に改変することを目的とした。

変異型酵素の構築に先立って、問題が一つあった。それは aqualysin I の立体構造が不明であるということである。しかし、3つの状況証拠

1. 一次構造の相同性——基質結合部位付近では、更に相同性が高い
2. subtilisin 型酵素間 (aqualysin I は除く) における基質結合部位周辺の立体構造の相同性
3. ペプチド基質、プロテアーゼ・インヒビター S S I との反応性の類似性 (第II、III章参照)

をもとに、基質結合部位近傍の aqualysin I の立体構造は他のセリン・プロテアーゼと極めてよく似ていると仮定し、類縁酵素の立体構造を aqualysin I のものの代わりに用いることにした。

特異性の改変は、3種の類縁酵素 subtilisin BPN', subtilisin Carlsberg, proteinase K の立体構造を用い、コンピューター・グラフィクス上において

1. 各サブサイト (S_i 部位) の検索

2. P_i 部位に種々の残基を導入した基質と、 S_i 部位との相互作用のシミュレーション

を行って、実測によって得られた基質特異性との関連を考え、更に、

3. S_i 部位と想定される残基に対して残基置換を行い、基質の P_i 部位との相互作用のシミュレーション

をするという手順をふんで、「変異型酵素」の基質特異性のモデリングをし、それをもとに実際の変異型酵素の構築をした。

従って、これから行う基質特異性の改変は aqualysin I のみでなく、他の類縁酵素全体にも共通する戦略である。

第IV章 特異性の改変

第IV章

P 3 特異性の改変

特異性の改変は、その性質を保持しながら、その表現形式を変化させることである。これは、言語の柔軟性を示す重要な現象の一つである。特異性の改変は、しばしば文脈によって行われ、その結果として、元の意味が多少なりとも変化する。しかし、その核心的な意味は保たれる。この改変は、言語の多様性を生み出し、コミュニケーションの幅を広げる役割を果たしている。

目的

野生型酵素 aqualysin I の基質特異性は概して広い。

合成トリペプチド基質に対する野生型酵素 aqualysin I のP3特異性は、体積が小さく疎水性が低いアミノ酸 (Ala) に比べて、体積が大きく疎水性が高いアミノ酸 (Phe) に対して高い反応性 (小さな K_M , 大きな k_{cat}) を示し、P 3 特異性は Phe 嗜好型である。

このP3特異性の Phe 嗜好型を Ala 嗜好型に改変することを企画した。

第II章でみたように aqualysin I の P 1 · P 2 特異性はともに Ala 残基に対して高い反応性を示す Ala 嗜好型である。従って、P 3 特異性がもし Ala 嗜好型に転じたならば、基質結合部位の主要認識部位である P 1 ~ P 3 部位においてすべて Ala 嗜好型となり、aqualysin I は「エラスターゼ」的特異性を獲得する (ここでは Ala, Gly 残基を基質として好むプロテアーゼの代表という意味において "elastase 的" という言葉を使った。正確には、elastase は Ala 残基ばかりでなく他の残基も広く基質として認識するため、elastase との構造相関は今回のモデルとして採用しない。Kasafirek *et al.* 1976, Thomson *et al.* 1979, Dimicoli *et al.* 1979, 1980, Davril *et al.* 1984)

S 3 部位の検索とモデリング

3 種の subtilisin 型酵素 subtilisin Carlsberg [PDB ID コード:2SEC]、subtilisin BPN' [PDB ID コード : 1SBT]、proteinase K [PDB ID コード: 2PRK] の立体構造に共通して基質結合部位周辺は、主に Gly, Ser 等の残基から構成され、唯一大きな側鎖をもつ Leu (proteinase K では Leu¹³³) の側鎖は酵素内部を向いており、溶媒側には、Ser 残基の側鎖が出ているだけである (Fig-IV-1 に proteinase K の基質結合部位を示した。基質結合部位を黄色、活性中心を赤、酵素の主鎖を青で示してある)。この基質結合部位の残基は酵素間で非常によく保存されており (Fig-IV-2)、加えて、立体構造も主鎖を重ね合わせられる程度に一致している (Siezen *et al.* 1991)。基質分子は、この基質結合部位主鎖と局所的な逆平衡 β シートを形成して結合するが (Fig-IV-3 に subtilisin Carlsberg の基質結合部位と eglin c の反応部位 P2'~P5 部位を示した。酵素主鎖を青、活性中心を赤、基質結合部位を水色、基質を黄色で示した)、このとき基質の P 3 残基側鎖は酵素側ではなく溶媒に向かって突き出ている (Fig-IV-4 に基質結合部位と P 3 残基側鎖の模式図を示した。ただし、残基番号はすべて aqualysin I のものである)。この立体構造をもとにして、コンピューター・グラフィクス上において、P 3 残基をいろいろなアミノ酸に置換してみてもこの傾向は変わらず、P 3 残基側鎖はいずれも溶媒側に露出していて酵素表面とあまり接触・相互作用しなかった。つまり、基質の P 3 残基側鎖は「クレフト」や「ポケット」には収まっていない状態で酵素表面に存在していると推定された。ペプチド基質に対する P 3 特異性 (第II章参照) において aqualysin I は subtilisin BPN' や proteinase K と同様に疎水性の高いアミノ酸に対して高い反応性を

示したが、このP3残基の構造の状態からは考えにくく、実際の水溶液中においては、P3残基側鎖は疎水性の高い酵素表面と大きな(疎水性)相互作用をしていると想像できた。

こうしたことから考えて、P3特異性をPhe嗜好型から疎水性の低いAla嗜好型に改変するには、基質結合時の酵素表面において、P3残基側鎖を取り巻く(疎水的)環境をつくりかえる必要がある。それには、P3残基側鎖と相互作用しうる位置(酵素表面)に、新たに適当な側鎖を「生やし」てやるのが妥当である。P3残基側鎖は溶媒側に向いているので、導入する側鎖に対して、次の2つの条件を設けた。

条件1. 導入する側鎖は溶媒側に向いていること

条件2. 導入する側鎖はP3残基側鎖と相互作用できる距離にあること

以上の2条件に従い、基質結合部位周辺(P3残基側鎖のC β から1 nm以内)に存在するすべてのアミノ酸残基に対して、コンピューター・グラフィクス上において残基置換、および、置換導入した側鎖に対してMMやMDのシミュレーションを行ってP3残基側鎖と相互作用する残基を検索したところ、適当な候補としてSer¹⁰²とGly¹³¹(subtilisin CarlsbergではSer¹⁰⁰とGly¹²⁸に当たる)の2残基が見つかった。Fig-IV-5にsubtilisin Carlsbergを用いてP3残基とSer¹⁰⁰とGly¹²⁸残基の位置関係を示した(ここでは、P3残基をPhe残基に置換して示した)。Ser残基のC β からPhe残基側鎖までの距離は約0.4 nm、Gly残基のC α からは約0.6 nm程度であり、SerやGlyの代わりに体積・長さのある側鎖をもつアミノ酸がくれば、P3側鎖と十分に相互作用することが期待できる。Fig-IV-6にSer¹⁰²、Gly¹³¹に導入した側鎖とP3残基側鎖との位置関係を模式図として示した(た

だし、残基番号は aqualysin I のもので示した)。グラフィクスの写真ではかえってわかりにくいので模式図で表したが、Ser¹⁰² と Gly¹³¹ に導入された側鎖は図のように、P 3 残基と隣接し、かつ、溶媒側を向くと推定された。

これら 2 残基 (Ser¹⁰², Gly¹³¹) に対して、それぞれ「体積」「長さ」のあるアミノ酸の側鎖を与えて P 3 特異性を改変することにした。



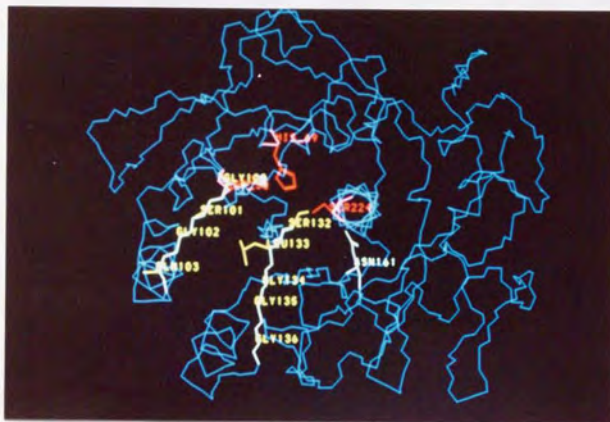


Fig-IV-1. Substrate binding site of proteinase K
 Blue : main-chain structure, Yellow : substrate binding site, Red : catalytic triad

	101	104	127	132 (No. of aqualysin I)
AQ	GSGS			MSLGGGV
PR	GSGQ			LSLGGGV
TH	GSGT			LSLGGGT
AM	GSGQ			MSLGGGP
BP	GSGQ			MSLGGGP
CA	GSGS			MSLGGGA
DY	GSGT			MSLGGGP
	100	103	124	129 (No. of subtilisin)

AQ, aqualysin I ; PR, proteinase K ; TH, thermitase ; AM, subtilisin *Amylosschariticus*
 BP , subtilisin BPN' ; CA, subtilisin Carlsberg ; DY, subtilisin DY

Fig-IV-2. Comparison of amino acid residues in the substrate binding site.

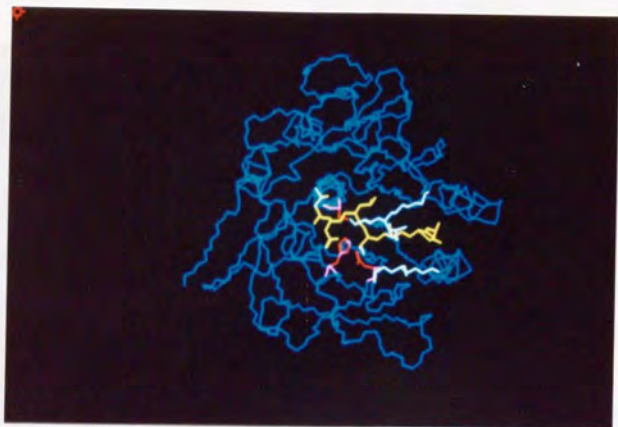


Fig-IV-3. Substrate binding site of subtilisin Carlsberg, and the substrate eglin c.
 Red : catalytic triad, Cyan : substrate binding site, Yellow : eglin c (P2'-P5)

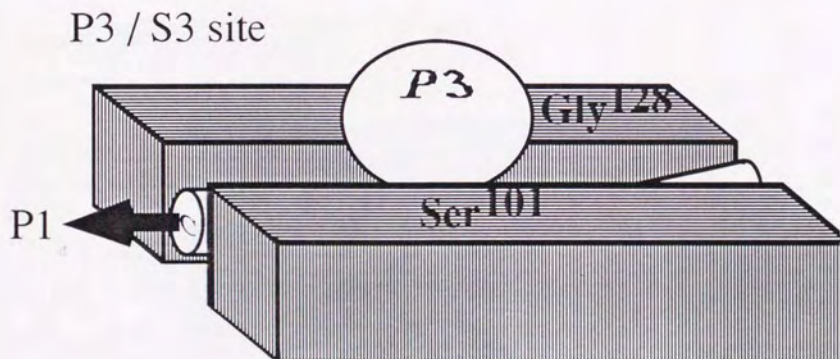


Fig-IV-4. Diagram of substrate binding site, and the side-chain of P3 amino acid.

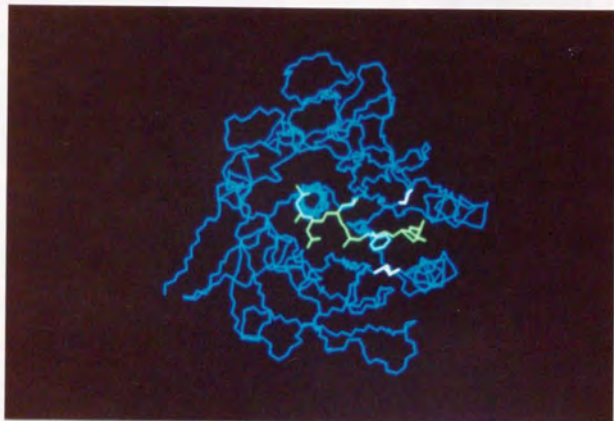
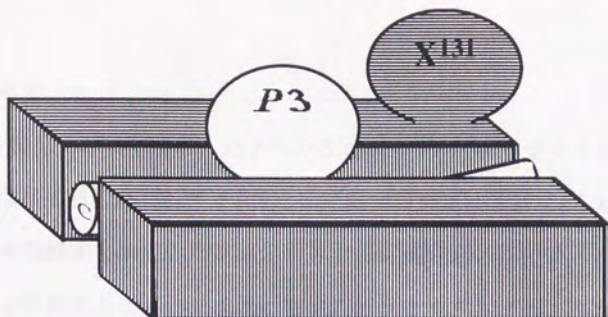
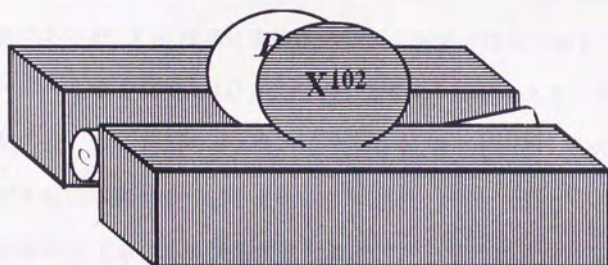


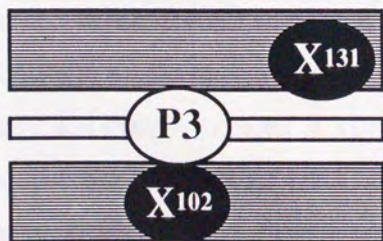
Fig-IV-5. P3(Phe) side chain and the position of Ser100 and Gly128.
(subtilisin Carlsberg)



A) Introduction of side-chain to Gly131.



B) Introduction of side-chain to Ser102.



C) Relative position of introduced side-chain.

Fig-IV-6. Diagram of introduced side chain at Ser102, Gly131
(Residue numbers : aqualysin I)

材料と方法

変異型酵素

S 3 部位として予想された2つの残基 Ser¹⁰²と Gly¹³¹をそれぞれ3種のアミノ酸に置換した (Ser¹⁰²→ His, Lys, Glu ; Gly¹³¹ → His, Lys, Asp)、計6種の変異型酵素を調製した。導入するアミノ酸残基の選定は、導入した残基側鎖が酵素表面において溶媒に露出した状態で存在するように、解離基をもつアミノ酸として Lys 残基や His 残基を選んだ。この2残基は共に塩基性残基であるが、Lys 残基は直鎖状の側鎖を有する残基であり、His 残基はイミダゾール環を有する (C β に結合している) 残基である。2残基における側鎖の違いは、側鎖の相互作用を及ぼす範囲の違いや、この側鎖に立体障害が生じた場合において、その衝突の解消しやすさの違いとして現れることが期待できる。Lys 残基側鎖は直鎖状であるため、回転可能な炭素-炭素間の結合の数は多く、側鎖の「自由度」は大きい。そのため、側鎖に立体障害が生じた場合において、容易に立体障害を解消できると考えられ、その意味において Lys 残基は“柔らかい”残基である。His 残基の側鎖は環状であり、回転可能な炭素-炭素間の結合は C α -C β と C β -C γ の2つで、Lys 残基の側鎖に比べて側鎖の「自由度」小さい。そのため、Lys 残基よりも側鎖において生じた立体障害を解消しにくいと考えられ、側鎖の“硬い”残基として振舞うと期待できる。また、解離基の電荷の影響を考慮するために、Lys, His とは逆の電荷をもつ Asp または Glu 残基をあわせて導入した。

6種の変異型酵素の名称(略号)を次のように定めた。

略号	変異
AQN (S102H)	Ser ¹⁰² → His
AQN (S102K)	Ser ¹⁰² → Lys
AQN (S102E)	Ser ¹⁰² → Glu
AQN (G131H)	Gly ¹³¹ → His
AQN (G131K)	Gly ¹³¹ → Lys
AQN (G131D)	Gly ¹³¹ → Asp

1. 変異の導入と発現ベクターの調製(手順を Fig-IV-7 に示した)

Aqualysin I の全構成遺伝子を含むプラスミド pAQN より変異導入の対象となる部分を含む *Bam*HI-*Xba*I 断片を、ファージ DNA (M13 mp19 RF DNA) に組み込んで得た U-ssDNA を調製して鋳型とし、Table-IV-1 に示す変異導入プライマーを用いて変異を導入した(方法は Bio-Rad のマニュアルにしたがった)。変異導入の有無は DNA シークエンシングにより直接確認した。変異導入が確認されたファージ DNA より切り出した *Bam*HI-*Acc*I 断片を、2つのベクター pAQN (aqualysin I の全構成遺伝子を含む) と pAQN Δ C (pAQN より aqualysin I の前駆体の C-プロ領域を欠失させたもの) に組み込んで、発現ベクターを得た。

2. 変異型酵素の生産・発現

大腸菌 (*E. coli* MV1184) を宿主として、全ての発現ベクターを形質転

Table-IV-1. Oligonucleotide sequences for mutagenic primers

Mutation	Res.enz.	Oligonucleotide sequences
S102 Wild		CTG GAC TGC AAC GGT TCC GGC TCC ACC TCT GGG
S102 H	<i>NcoI</i>	CTG GAC TGC AAC GGC <u>ACT</u> GGC TCC ACC TCT GGG
S102 E	--	CTG GAC TGC AAC GGT <u>GAA</u> GGC TCC ACC TCT GGG
S102 K	--	CTG GAC TGC AAC GGT <u>AAA</u> GGC TCC ACC TCT GGG
G131 Wild		AAC ATG AGC TTA GGA GGC GGA GTC TCC ACT GCC
G131 H	<i>NcoI</i>	AAC ATG AGC TTA GGC <u>CAT</u> GGA GTC TCC ACT GCC
G131 D	--	AAC ATG AGC TTA GGT <u>GAC</u> GGA GTC TCC ACT GCC
G131 K	--	AAC ATG AGC TTA GGT <u>AAA</u> GGA GTC TCC ACT GCC

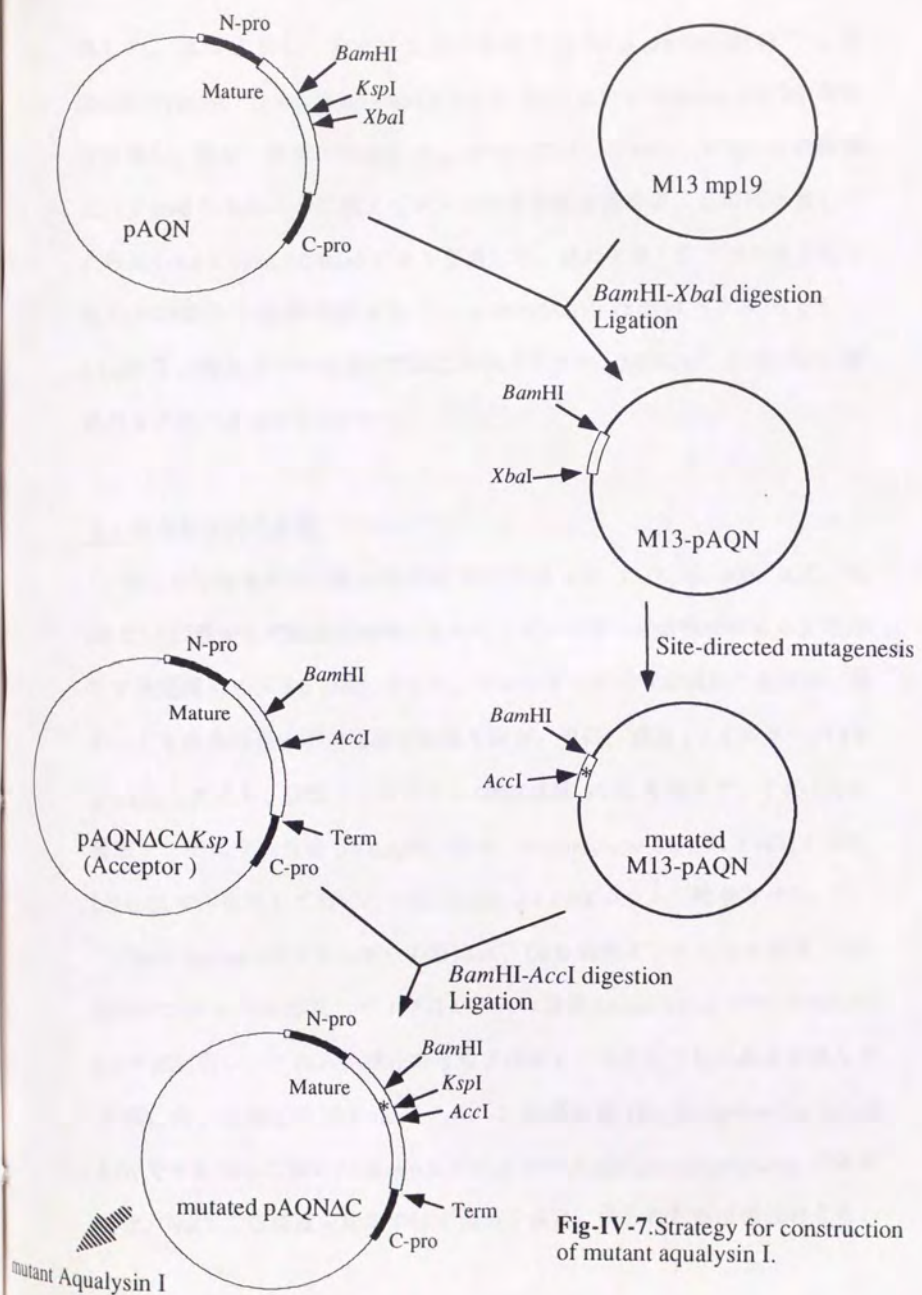


Fig-IV-7.Strategy for construction of mutant aqualysin I.

換した。菌は 37℃、アンピシリン存在下 (100 μ g/ml) において LB (Bacto tryptone 1.0 %, Yeast extract 0.5 %, NaCl 0.5 %, Glucose 0.2 %) 培地で培養し、菌体・培地の吸光度 A_{600} が 0.9 に達したのち、IPTG を最終濃度 0.7 mM になるように加えてタンパク質合成を誘導後、2 時間培養してから遠心 (5 k rpm, 10 min) により集菌した。菌の生育・タンパク生産量の兼ね合いから、変異型酵素の 1 つ AQN(S102H) は発現ベクターとして pAQN を、他の 5 つの変異型酵素は発現ベクター pAQN Δ C を用いて、最終的なタンパク発現を行わせた。

3. 変異型酵素の精製

得られた培養菌体を熱処理溶液 (EPPS 50 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 1%, pH 8.5) に懸濁して超音波破碎したのち、プロテアーゼ活性が現れるまで 70℃ で熱処理 (10 ~ 50 時間) をした。プロテアーゼ活性が現れた溶液は、遠心により菌体由来の不溶性画分を取り除き、更に、濾過 (フィルター 0.45 μ m 径) したのち、硫酸アンモニウム (最終濃度 25%) を加えて、予め 25% 硫酸アンモニウム溶液 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 %, Na phosphate 20 mM, CaCl_2 1 mM, pH 6.0) で平衡化しておいた Butyl-toyopearl 650 カラムに吸着させた。

Butyl-toyopearl カラムからの溶出は、10% 硫酸アンモニウム溶液、0% 硫酸アンモニウム溶液、イソプロパノール溶液 (Isopropanol 20%, NaCl 2.5 M) の順に行い、これらの画分のうちプロテアーゼ活性をもつ画分を選んで透析した。透析した画分は、予めリン酸緩衝液 (Na phosphate 10 mM, pH 6.0) で平衡化しておいた mono-S カラム (FPLC system : Pharmacia) に吸着させ、NaCl で塩濃度勾配をかけて溶出させた。得られた溶出画分のうち、

プロテアーゼ活性の高いものを選んで精製標品とし、SDS-PAGEで分子量と純度を確認した後、BCAキット (Pierce 社) を用いてタンパク濃度を定量した。

反応速度定数の測定

精製した6種の変異型酵素 AQN(S102H, S102K, S102E, G131H, G131K, G131D)の反応性を、P3特異性の解析のためのトリペプチド基質、及び、反応性の標準基質としてのテトラペプチド基質を用いて測定し、導入した変異がペプチド基質のP3特異性をどのように変化させたのかを調査した。一部の変異型酵素 AQN(S102H, G131H) に対しては、構造をもつ基質であるタンパク性プロテアーゼ・インヒビター SSI (野生型) を用いて阻害定数 (K_i) を測定し、導入した変異がもたらす影響を調べた。また、S3部位に導入した変異がP2特異性に対して及ぼす影響も考え、P2部位の異なる合成トリペプチド基質を用いて、一部の変異型酵素 AQN(S102K, G131K) のP2特異性を調べた。

1. P3特異性の測定 (1)

P3部位の異なる2つの基質 $\text{Suc-Phe-Ala-Ala-pNA}$ (Boc-アミノ酸から液相法で合成したもの。第II章参照) と $\text{Suc-Ala-Ala-Ala-pNA}$ (Sigma社より購入) を用いて、 40°C 、 $\text{pH } 7.5$ (HEPES 100 mM, CaCl_2 1 mM) における反応速度定数を求め、変異型酵素のP3部位のアミノ酸嗜好性を調べた。反応はすべてミカエリス・メンテン型に従っており、反応速度定数は観測された

反応速度 v と調製した基質濃度 $[S]$ をもとに、 V_{max} と K_M とを変数として、非線形の最小自乗法を用いて計算した。

2. P3 特異性の測定 (2)

側鎖の更に小さなアミノ酸 (Gly, Ala) における P3 特異性を調べるために、変異型酵素の一つ AQN(S102H) に対して、P2・P3 部位が同時に異なる 2 つの基質 suc-Ala-Ala-Phe-pNA, suc-Gly-Gly-Phe-pNA (Nova Biochem 社より購入) を用いて 40℃、pH 7.5 における反応速度定数を求め、野生型酵素と比較した。

3. テトラペプチド基質に対する反応速度定数の測定

2 つの部位 Ser¹⁰² と Gly¹³¹ とに導入した側鎖が基質分子において相互作用している範囲を調べるために、トリペプチド基質とは長さの異なるテトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を使用して、その反応速度定数を求めた。トリペプチド基質は P4 部位に、テトラペプチド基質は P5 部位に、それぞれマイナス電荷をもつ suc 基を有しているため、酵素に導入した側鎖の電荷との静電的相互作用による影響も知ることができるはずである。

4. タンパク性プロテアーゼ・インヒビター SSI の阻害定数の測定

2 種の変異型酵素 AQN(S102H, G131H) を用いて、40℃、pH 7.5 において野生型 SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) の阻害定数 (K_i) を測定により求めた。野生型 aqualysin I の場合と同様、SSI の阻害定数 (K_i) が十

分小さな値をとっていたため、通常の競争阻害様式としてではなく、SSI
濃度に対してペプチド基質 $\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$ に対する残存活性を測
定して阻害定数値を求めた（第III章参照）。

5. P 2 特異性の測定

Ser¹⁰² 及び Gly¹³¹ は S 3 部位の残基であると推定したが、S 3 部位の変
異導入が P 3 特異性以外にも寄与している可能性がある。そこで、2つの
変異型酵素 AQN(S102K, G131K) に対して、P 2 部位を体系的に換えた 4
種の合成トリペプチド基質 Suc-Phe-X-Ala-pNA ($X = \text{Ala, Leu, Nle, Val}$),
(Boc-アミノ酸から液相法で合成したもの。第II章参照)を用いて40℃、pH
7.5 における反応速度定数を求めて、これら変異型酵素の P 2 特異性を調べ
た。

結果と考察

P 3 特異性

2種の基質 Suc-X-Ala-Ala-pNA ($X = \text{Ala, Phe}$) に対する変異型酵素の反応速度定数を野生型酵素のものとともに Tabl-IV-2 に示した。

6種変異型酵素全てに共通して、変異の導入により、基質の K_M 値が増大し、かつ、Phe 残基をP3部位に有する基質の k_{cat} 値が低下した。また、4種の変異型酵素 AQN(S102H, S102K, G131H, G131K) では Ala 残基に対する k_{cat} 値の増大がみられ、変異の導入により Ala 残基に対する嗜好性が高くなった。

6種の変異型酵素が示した P 3 特異性は、以下に示す3つの型に分類できる。

型-1. (Ala 残基嗜好型: 2種の変異型酵素 S102H と G131H)

全ての基質濃度において Ala 残基を P 3 部位にもつ基質の反応性の方が高くなった。P 3 特異性は、野生型酵素と完全に逆転し、Ala残基嗜好型であった。比較のため、基質濃度 $[S]$ に対する反応速度 v の飽和曲線を Fig-IV-8 (図A:野生型酵素、図B:変異型酵素S102H) に示した。

型-2. (混合型: 3種の変異型酵素 S102K, S102E, G131K)

基質濃度が低いときには Phe 残基を P 3 部位にもつ基質の反応性の方が

高いが、基質濃度がある値 (S102K では $[S]=5.1$ mM、S102E では $[S]=0.64$ mM、G131K では $[S]=1.2$ mM) を超えると、逆に、Ala 残基を P3 部位にもつ基質の反応性の方が高くなった。型としては、野生型酵素と型-1 に示した変異型酵素との混合型で、P3 特異性は変異の導入によって低くなっていたが、これは、Phe 残基を P 3 部位に有する基質の K_M 値が小さく、かつ、Ala 残基を P 3 部位に有する基質の k_{cat} 値が大きいことによる。変異型酵素 AQN(G131K) の飽和曲線を Fig-IV-8 図 C に示した。

型-3. (Phe 残基嗜好型：変異型酵素 G131D)

全ての基質濃度において Phe 残基を P 3 部位に有する基質の反応性の方が高く、野生型酵素と同じで Phe 残基嗜好型であったが、この変異型酵素では Phe 残基を P 3 部位に有する基質の K_M 値が増大した。

これらの変異型酵素のうち、2 種の変異型酵素 AQN(S102H) と AQN(G131H) の P 3 特異性は Ala 嗜好型に改変された。この 2 酵素の Ala 残基に対する反応性は、野生型酵素とほぼ同一であったのに対し、Phe 残基に対する反応性は大きく低下した。この Ala 嗜好性を詳しく解析するため、変異型酵素の 1 つ AQN(S102H) を用いて、Ala 残基と Gly 残基の反応性を比較した (Table-IV-3)。基質は P 3 部位だけでなく P 2 部位においても同時に置換されているが、2 つの酵素間で 2 種の基質に対する反応性に大きな差はなく、この変異型酵素 AQN(S102H) において導入された変異は、Gly や Ala 残基に対する反応性にはほとんど影響を与えていないことがわかった (Fig-IV-9 に反応速度の飽和曲線を比較して示した)。つまり、この

2種の変異型酵素における His 残基の導入は、P 3 部位の Phe 残基に対して排斥的に作用していたことを示す。

2種の変異型酵素 AQN(S102K, G131K) では、見かけ上、P 3 特異性が低くなった。これらの変異型酵素では、他の変異型酵素に比べてミカエリス定数の増大が大きく、かつ、 k_{cat} 値も大きな値をとった。この2種の変異型酵素では、上述した2酵素 AQN(S102H, G131H) に比べて Phe 残基に対する反応性の低下は小さく、Ala 嗜好性の上昇という現象は Ala 残基に対する k_{cat} 値の増大による。

Table-IV-2. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-X-Ala-Ala-pNA (X=Ala, Phe) by wild/mutant aqualysin I's. (Comparison of P3-specificity)

Enzyme	suc-Ala-Ala-Ala-pNA			suc-Phe-Ala-Ala-pNA		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Wild	1.2	1.1	1.1	11	0.044	250
S102H	1.6	2.1	0.76	0.11	0.243	0.453
S102K	8.5	10.3	0.83	2.9	0.146	20
S102E	0.50	3.8	0.13	0.11	0.335	0.33
G131H	5.4	2.3	2.4	1.1	0.518	2.1
G131K	7.3	7.1	1.0	1.5	0.506	3.0
G131D	0.44	1.9	0.23	>4	>1	13.4

Assays were performed at 40°C, pH 7.5.(HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

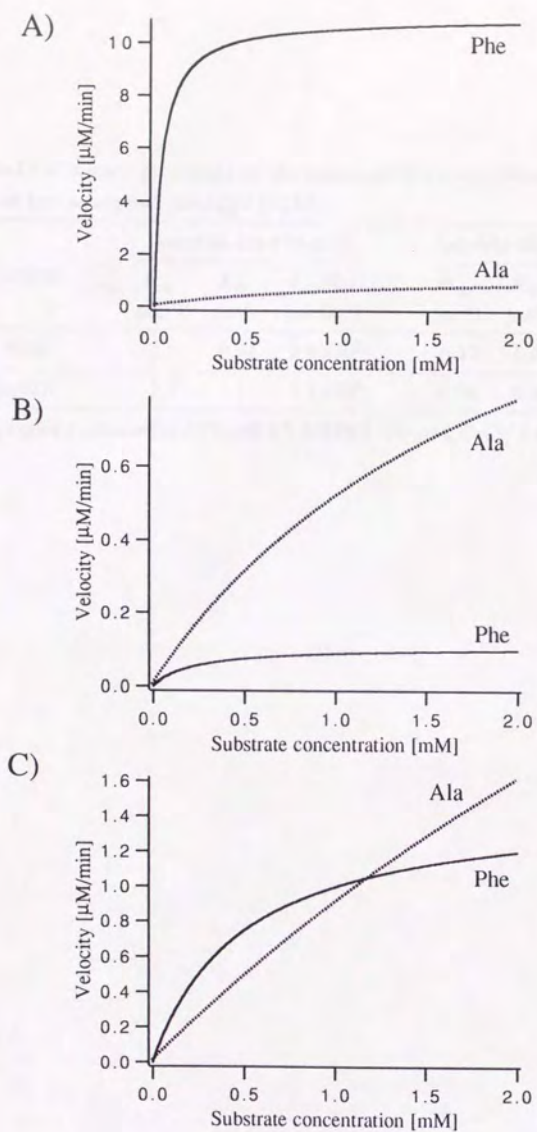


Fig-IV-8. Comparison of P3-specificity by saturation curves for the hydrolysis of suc-X-Ala-Ala-pNA (X= Ala, Phe). A) wild type, B) AQN(S102H), C) AQN(G131K)

Table-IV-3. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-X-X-Phe-pNA (X=Gly, Ala) by wild type aqualysin I and AQN(S102H).

Enzyme	suc-Ala-Ala-Phe-pNA			suc-Gly-Gly-Phe-pNA		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ M ⁻¹]
Wild	2.5	0.91	2.8×10^3	0.15	1.6	9.5×10^1
S102H	1.7	1.3	1.3×10^3	0.26	6.0	4.2×10^1

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

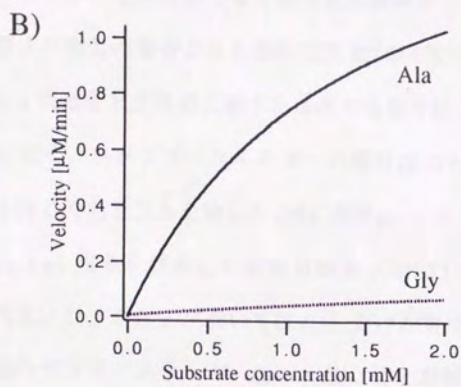
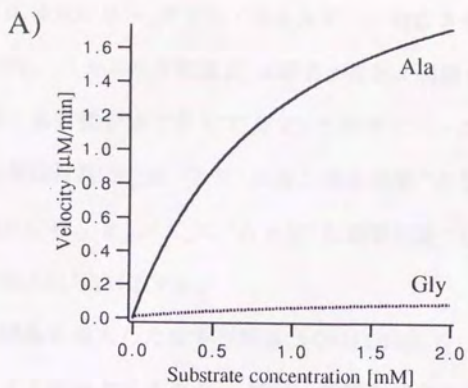


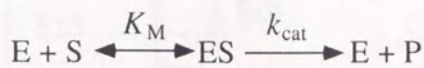
Fig-IV-9. Saturation curve for suc-X-X-Phe-pNA (X= Ala, Gly).
 A) wild type, B) AQN(S102H)

反応速度定数の値を最も単純なミカエリス・メンテン型 (scheme-1) に示した反応様式に従い、ギブス・エネルギーに対応させて考えると (Fig-IV-10 図A参照)、ミカエリス定数 K_M は酵素と基質が遊離の状態 ("E + S"に対応) と酵素・基質複合体 ("E S"に対応) とのギブス・エネルギー差 ΔG_s に対応し、代謝回転数 k_{cat} は "E S" 状態と遷移状態 "E S[‡]" とのギブス・エネルギー差 ΔG^\ddagger に、 k_{cat}/K_M は "E + S" と遷移状態 "E S[‡]" とのギブス・エネルギー差 ΔG_T^\ddagger に対応する。

His残基を導入した変異型酵素 AQN(S102H, G131H) の場合には、Phe残基を P 3 残基とすると、酵素・基質の結合エネルギー ΔG_s を少し上昇させていたが、それだけでなく活性化エネルギー ΔG^\ddagger をそれ以上に上昇させ、野生型酵素の場合よりも遷移状態 ES[‡] が不安定化されていることを示した。Ala 残基を P 3 残基に有する基質の場合では、反応速度定数の変化はほとんどなく、各ギブス・エネルギーの変化はほとんどなくて野生型酵素の場合と同じであることを示した (図C参照)。

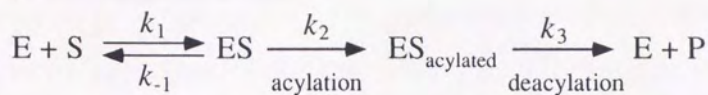
また、Lys 残基を導入した変異型酵素 AQN(S102K, G131K) の場合には、Ala残基に対する反応においては ΔG_s だけが野生型酵素よりも上昇し、遷移状態のギブス・エネルギー ΔG^\ddagger の値は野生型酵素と同程度に保たれていて、 k_{cat} 値の上昇は K_M 値を代償にしておこっていることに対応する (図D参照。このとき、反応速度定数 k_{cat}/K_M の値は変化しないで k_{cat} の値は大きくなり、反応速度の飽和曲線は野生型酵素よりも高い反応性を示す)。Phe 残基に対する反応性は、上述の変異型酵素 AQN(S102H, G131H) と同様に低下していて、この残基を P 3 部位に有するときの遷移状態は野生型酵素の場合に比べて不安定化されていることを示した。

Scheme-1.



$$v = \frac{[S][E_0]k_{cat}}{K_M + [S]}$$

Scheme-2.

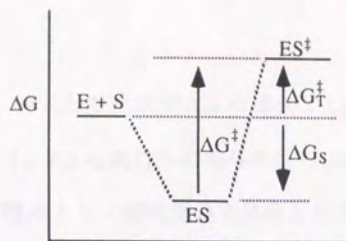


$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

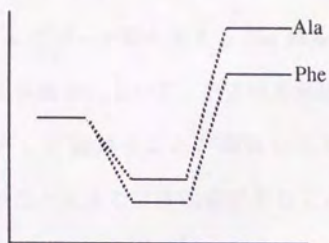
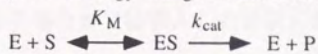
$$K_M = \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S$$

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

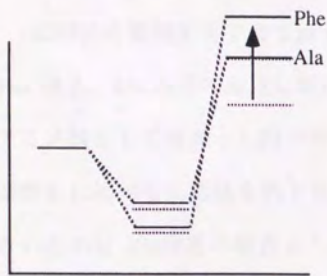
rate limiting step	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
deacylation	$k_3 K_S / k_2$	k_3	k_2 / K_S
acylation	K_S	k_2	k_2 / K_S



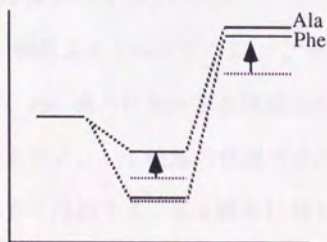
A) Gibbs energy change for the scheme



B) Comparison of Gibbs energy changes, with respect to P3-specificity, in case of wild-type aqualysin I.



C) in case of AQN(S102H)



D) in case of AQN(S102K)

Fig.-IV-10.

導入した残基が His の場合と Lys 残基の場合とでは導入した部位に関係なく、P3 特異性への寄与の仕方は同じであったが、これは前述したように 2 種のアミノ酸残基の立体特異性の違いによると考えられる。コンピューター・グラフィクスにおけるアミノ酸残基置換のシミュレーションと併せて導入したアミノ酸残基側鎖の違いに対し、次のようなモデルを考えた。

イミダゾール環を有する His 残基は、側鎖の自由度が小さく、側鎖に生じた立体障害において、P3 残基側鎖を排斥する作用の強い“硬い”アミノ酸残基として振舞うことが期待できる。この His 残基側鎖は、P3 部位の Phe 残基と大きな立体的衝突をして (Fig-IV-11 参照)、Phe 残基に対する反応性を低下させる。この“硬い”側鎖は、P3 部位の Ala 残基とは側鎖同志の立体障害が小さいために相互作用するには至らず、Ala 残基に対する反応性は野生型酵素と変わらない。

直鎖状の側鎖を有する Lys 残基は側鎖の自由度が大きく、P3 部位の Phe 残基、Ala 残基の両方に対して、側鎖間の立体障害において“柔らかい”アミノ酸として振舞うと期待できる。Phe 残基に対する立体障害は、野生型酵素に比べて反応性を低下させるものの、Lys 残基の側鎖の自由度が大きいために His 残基の場合よりは小さく作用する。Ala 残基に対しては、His 残基や Lys 残基いずれの残基を導入した場合においても、側鎖間の立体障害はほとんど生じないと推定される。従って、側鎖の自由度が大きい Lys 残基のほうが、P3 部位の Ala 残基と正の相互作用をして、反応性を上昇させると推定した。

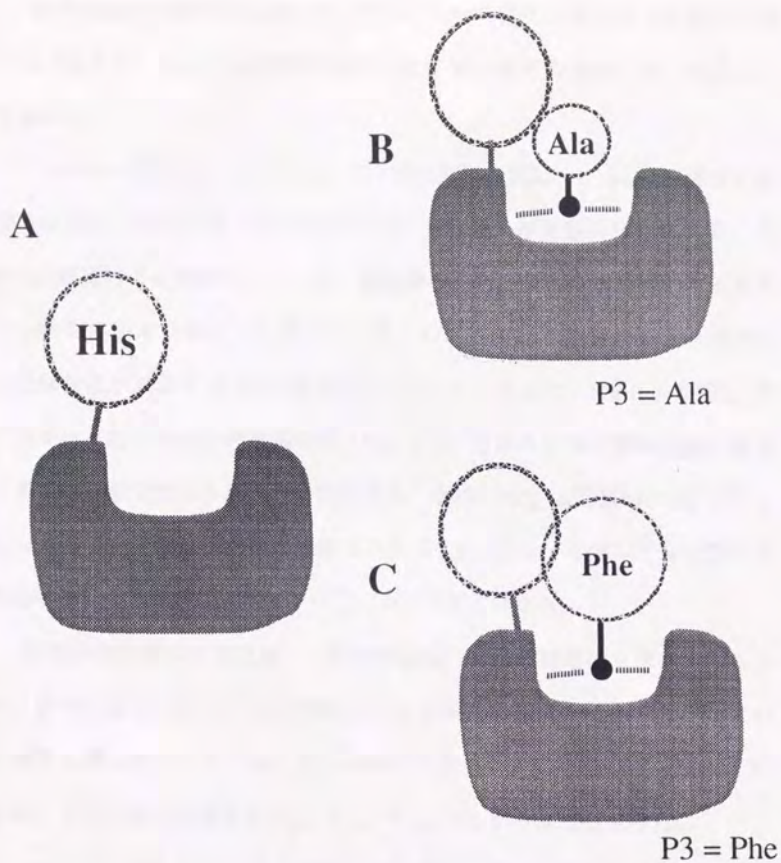


Fig.-IV-11. Schematic representation of P3-S3 interaction.
 A : S3 site with introduced His. B : S3 site and the Ala-substrate (P3 = Ala).
 C : S3 site and the Phe-substrate (P3 = Phe).

基質の加水分解反応において、このような特異性の変化がどの段階で起きているのか、His、Lys 残基を導入した4種の酵素の場合について推定してみた。

subtilisin 型のセリン・プロテアーゼの反応様式は、trypsin 型酵素の場合と同様に、ミカエリス複合体と呼ばれる酵素・基質複合体形成の後、活性 Ser 残基による基質のアシル化、溶媒から持ち込まれた水分子によるエステル結合の加水分解による脱アシル化、の反応を経て基質分子の一連の加水分解反応が終結する(反応様式を scheme-2 に示した。Fig-II-1 参照)。脱アシル化反応が律速段階であれば ($k_2 \gg k_3$)、ミカエリス定数は実際の酵素・基質の解離定数よりも大きく評価され、かつ、 k_{cat} は近似的に k_3 と同じになる。アシル化反応が律速段階であれば ($k_2 \ll k_3$)、ミカエリス定数は近似的に解離定数と同じになり、 k_{cat} は k_2 と同じになる。

実際の反応速度の測定は、定常状態における反応初速度を求めているため、律速段階の反応がアシル化反応であるか脱アシル化反応であるかという情報は得られていないが、P3 特異性の変化がどのようにして生じているか、3つの反応速度定数 K_M 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_M から推定してみた。

scheme-2 に従うと、律速段階がそれぞれ、アシル化反応・脱アシル化反応の場合で2つの反応速度定数 k_{cat} 、 K_M は異なる形をとる (k_{cat}/K_M は同じ)。上述したシミュレーションからの推定から、S3 部位の変異の導入により酵素・基質の解離定数 K_S は野生型酵素の場合よりも大きくなると仮定し、測定により得られた反応速度定数の野生型酵素の場合に対する変化を組み合わせると、アシル化反応が律速段階の場合 ($k_2 \ll k_3$ 、 $k_{cat} = k_2$) には、4種の変異型酵素全てにおいて、P3 = Ala の場合には k_2 の

上昇、P3=Pheの場合には k_2 の低下がおき(k_3 の値の変化は無関係である)、脱アシル化反応が律速段階の場合($k_2 \gg k_3$ 、 $k_{cat} = k_3$)には、 k_2 が上昇(P3残基に関係なく)していかつ、P3=Alaの場合には k_3 の上昇、P3=Pheの場合には k_3 の低下、が起きていると推定される。いずれの場合においても、律速段階となる反応の反応速度定数が、P3=Alaの場合には上昇し、P3=Pheの場合には低下するのが共通している。しかし、先ほどのシミュレーションから推定して、P3部位のPhe残基とS3部位のHis残基の側鎖間の相互作用は強い立体障害のためにエネルギー的に不利であると考えられ、脱アシル化反応が律速段階である場合(P3=Phe)の k_2 の上昇は起きにくいと推定される。従って、P3=Pheの場合には律速段階はアシル化反応であると推定できる(P3=Alaの場合にはアシル化・脱アシル化反応のいずれが律速段階でも矛盾しない)。

テトラペプチド基質に対する反応性

6 種の変異型酵素、及び、野生型酵素のテトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA に対する反応速度定数を Table-IV-4 に示した。また、基質濃度に対する反応速度の飽和曲線を Fig-IV-12 に示した。

3 種の変異型酵素 AQN(S102H, S102K, S102E) は共通して、野生型酵素と同等かそれ以上の反応性を示したのに対し、他の 3 種の変異型酵素 AQN(G131H, G131K, G131D) はいずれも、野生型酵素よりも低い反応性を示した。この基質の P 3 部位は Ala 残基であるが Ser¹⁰² の置換においては、トリペプチド基質の場合と同じように Lys 残基の導入において k_{cat} 値の増大が大きく表れていたのに対して、Gly¹³¹ の置換ではこの現象はみられなかった。Ser¹⁰² の置換では電荷の影響は僅かながら見られていた。AQN(S102E) において k_{cat} 値が少し低くなっていて、Ser¹⁰² 部位に導入した側鎖の静電的影響が基質の P4・P5 部位まで及んでいることがうかがえたが、全体を通じて電荷の影響は小さく、むしろ、変異を導入した部位の違いの影響の方が大きく表れていた。このことから、N 末端の suc 基の電荷は P 3 特異性に大きな影響は与えていないことがわかったが、加えて、基質ペプチドの長さが反応性に関与することが示唆された。類縁酵素の構造におけるシミュレーションから、Gly¹³¹ に導入した側鎖は P4・P5 部位主鎖と相互作用していると推定された。

Table-IV-4. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA by wild/mutant aqualysin I's.

Enzyme	suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Wild	33	1.2	28
S102H	54	1.8	30
S102K	145	1.7	87
S102E	25	1.1	24
G131H	8.9	1.9	3.1
G131K	9.0	2.0	4.4
G131D	7.9	0.49	16

Assays were performed at 40°C, pH 7.5.(HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM,
 $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

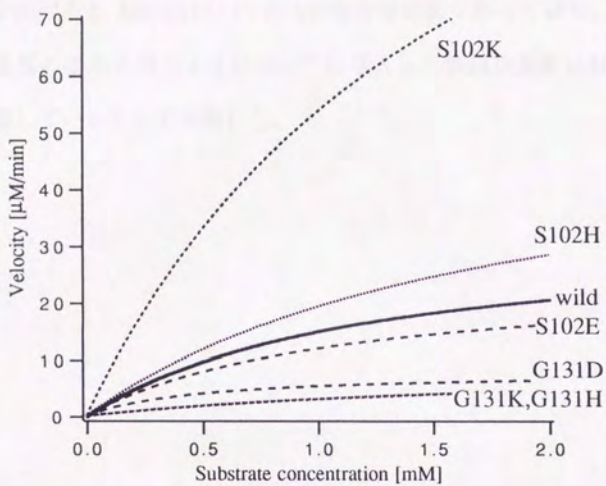


Fig-IV-12. Comparison of reactivity toward suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. by wild and six mutant aqalysin I.

プロテアーゼ・インヒビター SSI の阻害定数

野生型 SSI の、基質 $\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$ に対する阻害定数を Table-IV-5 に示した。2つの変異型酵素はともに、野生型酵素と同様に、小さな阻害定数値を示し、S 3 部位における変異の導入が SSI との結合においてあまり大きな影響は及ぼしていないことがわかった。2つの変異型酵素を比べると AQN(G131H) の方が結合性が低くなっており、テトラペプチド基質の場合と同じように Gly¹³¹ に導入した側鎖は基質に対して排他的に作用していることを示唆した。

Table-IV-5. Inhibition constant of SSI toward wild/mutant aqualysin I's.

Enzyme	K_i [M]
Wild	3.0×10^{-10}
S102H	5.8×10^{-10}
G131H	1.3×10^{-9}

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM).

P 2 特異性

2つの変異型酵素 AQN(S102K, G131K) の、4種のトリペプチド基質 suc-Phe-X-Ala-pNA (X = Ala, Nle, Val, Leu) に対する反応速度定数を Table-IV-6 に示した。基質濃度に対する反応速度の飽和曲線を酵素ごとにまとめ、Fig-IV-13 (図A: 野生型酵素、図B: AQN(S102K)、図C: AQN(G131K)) に示した。

1. AQN(S102K) の P 2 特異性

4種の基質に対する K_M 値はほぼ同じ値を示し、この点において野生型酵素と同じ傾向を示した(但し、P 3 特異性の変化の影響で全体の K_M 値は野生型酵素よりも大きくなっていった)。飽和曲線を見ると、野生型酵素(図A)が非分岐型アミノ酸 Ala, Nle に対して高い反応性を示していたのと同様に、変異型酵素(図B)も非分岐型のアミノ酸 Ala, Nle に対して高い反応性を示した(但し、反応性の順番は、Ala > Nle > Leu > Val であり、分岐型側鎖を有する Val と Leu 残基との順が入れ替わっていた)。全体としては、変異型酵素 AQN(S102K) の P 2 特異性はあまり変化していなかった。

2. AQN(G131K) の P 2 特異性

この変異型酵素においては、4種の基質の K_M 値は様々な値をとっており、P 2 特異性は野生型酵素と少し異なっていた。反応性は Ala > Leu > Nle > Val の順であり、Ala 残基に対して高い反応性を示したこと、及び、分岐型アミノ酸 Val, Leu に対する反応性が低いことなどは野生型酵素と同じであったが、非分岐アミノ酸 Nle に対する反応性が低下していて、P 2 特

異性は変化していた。

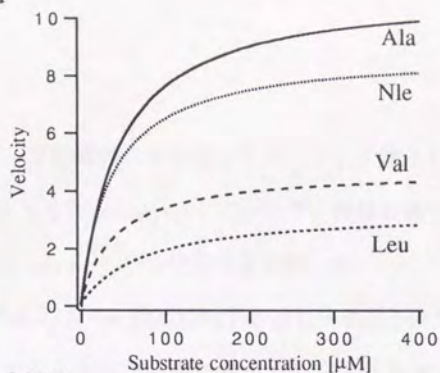
これらから、S3部位の変異はP3特異性だけでなくP2特異性にも影響を及ぼすことがわかった。しかし、P2特異性はいずれの場合も非分岐アミノ酸の Ala 残基嗜好型であり、かつ、分岐アミノ酸の Val, Leu 残基に対して低い反応性を示したことなど、大きなP2特異性の変化は無かった。

Table IV-6. Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Phe-X-Ala-pNA (X=Ala, Nle, Val, Leu) by wild/mutant aqualysin I's. (Comparison of P2-specificity)

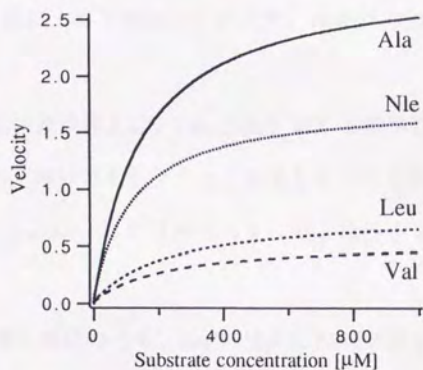
Enzyme	suc-Phe-Leu-Ala-pNA			suc-Phe-Val-Ala-pNA			suc-Phe-Ala-Ala-pNA			suc-Phe-Nle-Ala-pNA		
	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat} [sec ⁻¹]	K_M [mM]	k_{cat}/K_M [sec ⁻¹ mM ⁻¹]
Wild	3.3	0.071	46	4.7	0.039	120	11	0.044	250	8.8	0.036	250
S102K	0.80	0.24	3.29	0.54	0.22	2.5	2.9	0.15	20	1.77	0.12	14
G131K	0.64	0.59	1.08	>>0.1	>>0.3	0.212	1.5	0.51	3.0	0.57	1.53	0.37

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl₂ 1 mM, $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A) wild



B) AQN(S102K)



C) AQN(G131K)

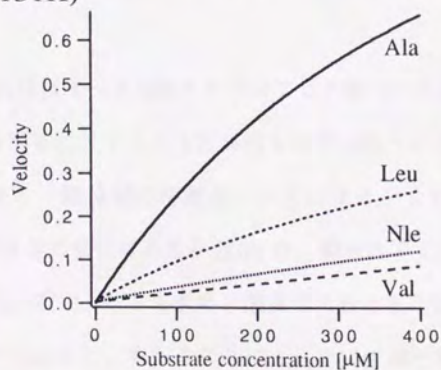


Fig-IV-13. Comparison of P2-specificity by saturation curves of wild/mutant aqualysin I obeying Michaelis-Menten kinetics. Substrate : suc-Phe-X-Ala-pNA (X= Ala, Nle, Leu, Val), [E]=1
 A) aqualysin I (wild type), B) AQN(S102K), C) AQN(G131K)

まとめ

類縁の subtilisin 型酵素の立体構造をモデルとして選定した2つの残基 Ser¹⁰² と Gly¹³¹ とともに aqualysin I において、側鎖の導入によってS3部位として機能し、aqualysin I のP3特異性を改変した。

Lys 残基の置換導入は Phe 残基に対する遷移状態を不安定化させる一方で、Ala 残基に対するミカエリス複合体をも不安定化させ、Ala 嗜好性を Phe 嗜好性と同程度に上昇させることにより、みかけのP3特異性を低下させた。

一方、His 残基の置換導入は、Phe 残基に対する遷移状態を不安定化させることにより Phe 嗜好性を低下させ、結果としてP3特異性を Ala 嗜好型へと改変させ、aqualysin I に「エラスターゼ」活性をもたせることに成功した。

これらの変異導入部位のうち、Ser¹⁰² は主にP3特異性に寄与していると言えるが、Gly¹³¹ ではP3部位以外の部位にも相互作用していることが示唆された。

今回導入した変異はすべて電荷を有するアミノ酸への置換であり、従って、電荷を有する基質に対するP3特異性も改変されているはずである。また、導入したアミノ酸側鎖の解離基の状態によるP3特異性への影響(pH 依存による特異性の変化はあるか否か) や、疎水性アミノ酸を導入した場合でのP3特異性の変化、などを含め、溶液中におけるこれら残基とP3側鎖の実際の挙動の追跡など、を行うことにより更に詳細な解析が期待されるであろう。