



## 第V章

### P 2 特異性の改変

#### 目的

aqualysin I の S 2 部位は Ala 残基嗜好性であり、非分岐型アミノ酸 Ala, Nle に対して高い反応性を示した。分岐型アミノ酸 Val, Leu 残基に対する反応性は、 $k_{cat}$  値では Ala 残基の数分の 1 であり、S 2 部位の Ala 残基嗜好性は、S 3 部位の Phe 残基嗜好性に比較すると、あまり高くはなかった。

そこで、S 2 部位の Ala 残基嗜好性を更に高くする、または、Ala 残基よりも小さな Gly 残基に対する嗜好性を高くすることを目的とし、P 2 特異性の改変を行った。

## S 2 部位の検索とモデリング

Subtilisin の S 1 部位と同様に、S 2 部位は「ポケット」を形成している。S 2 部位は Asp<sup>32</sup>, Thr<sup>33</sup>, Asn<sup>62</sup>, His<sup>64</sup>, Leu<sup>96</sup>, Gly<sup>100</sup> (subtilisin Carlsberg の残基) 等の残基により形成されており、活性中心の Asp<sup>32</sup>, His<sup>64</sup> の 2 残基もそれぞれ「底」(Asp<sup>32</sup>) と「壁」(His<sup>64</sup>) に当たる部分を形成している。Thr<sup>33</sup>, Leu<sup>96</sup>, Gly<sup>100</sup> は His<sup>64</sup> とは反対側の「壁」を形成し、「天井」に当たる部分には Asn<sup>62</sup> が位置している。S 2 部位は subtilisin の S 1 部位とは異なり、「底」が浅く、かつ「天井」の低いポケットを形づくっていて、体積の大きな P 2 残基はポケットからはみ出した形で存在し、基質の P 2 残基側鎖と S 2 部位との親和性は、P 2 残基に対して subtilisin BPN' の S 1 部位と P 1 残基ほどには寄与しそうにない。むしろ、S 2 部位内に活性中心の残基 His<sup>64</sup> と Asp<sup>32</sup> があることから、反応速度定数  $k_{cat}$  値に寄与すると期待できる。

Fig-V-1 図 A、図 B に subtilisin Carlsberg の S 2 部位を示した。酵素主鎖(青色)と S 2 部位(緑と白)に基質として eglin c の P2'~P5 部位(桃色)を加えて示した。ただし、図は eglin c の P 2 部位を Gly、P 3 部位を Phe に置換したものを示しているため、S 2 部位に P 2 残基の側鎖は登場していない。

この S 2 部位を構成する残基 (Thr<sup>33</sup>, Asn<sup>62</sup>, Leu<sup>96</sup>, Gly<sup>100</sup>) に対して、残基置換のシミュレーションを行い、導入した側鎖の向きと P 2 アミノ酸残基側鎖との相互作用を調べたところ、S 2 部位の「ポケット」の体積・形状を変え、P 2 特異性を改変するのに寄与したのは Asn<sup>62</sup> と Gly<sup>100</sup> の 2 残基であった (His<sup>64</sup> の置換も S 2 部位の形状・体積を変更できるが、この残基

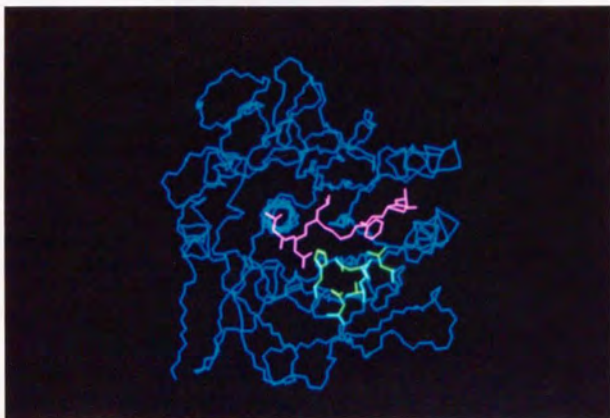
は活性中心の一部であるため、対象から外した)。

S 2 部位を拡大し、Fig-V-2 に示した。2 つのアミノ酸残基 Asn<sup>62</sup> と Gly<sup>100</sup> とを白で、他の S 2 部位の残基を青で、基質 eglin c (P2'~P5 部位) を桃色で示した。

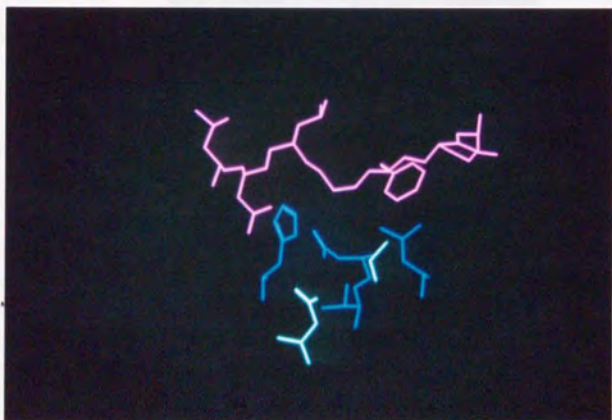
S 2 部位のアミノ酸の 1 つである Gly<sup>100</sup> をシミュレーションにより、他のアミノ酸残基 Ala, Val, Leu に置換した場合の側鎖の位置を Fig-V-3 に示した。図 A は Ala 残基に置換したもの (側鎖を赤で示した)、図 B は Val 残基、図 C は Leu 残基に置換したものを表す。Gly<sup>100</sup> 部位へ導入された側鎖が、S 2 部位の「ポケット」の内側へと伸びてゆき、P 2 残基の側鎖が入るはずの S 2 「ポケット」の空間を埋めて行く。

そこで、S2 部位の残基のうちから Gly<sup>100</sup> (aqualysin I では Gly<sup>101</sup> に当たる) を選んで変異導入の対象とし、P2 特異性を Gly 残基嗜好型に改変することにした。Aqualysin I の S 2 部位が subtilisin と同じならば、P 2 特異性は側鎖の小さい Ala や Gly 残基に対する嗜好性を上昇させ、より「エラスターゼ」的特異性を獲得することが期待できる。

また、残基置換のもう 1 つの候補である Asn<sup>62</sup> については、S 2 部位に存在する電荷を持った残基であるので、その側鎖の電荷を無くして S 2 部位の環境を変え、その役割について調べることにした。

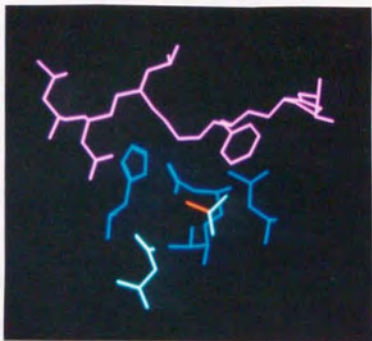


**Fig.-V-1.** S2 site of subtilisin Carlsberg (green), and substrate eglin-c (P2'-P5 ; P2 : Gly, P3 : Phe)

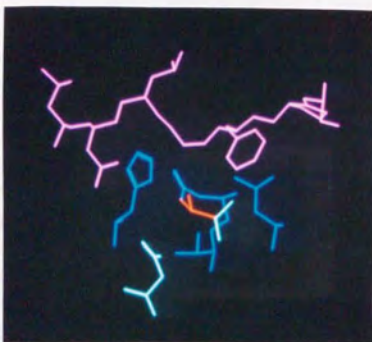


**Fig.-V-2.** Substrate ( eglin c ; P2'-P5 ) and S2-site ( subtilisin Carlsberg ).  
( Asn62 and Gly100 were painted in white )

A) Gly100 → Ala



B) Gly100 → Val



C) Gly100 → Leu

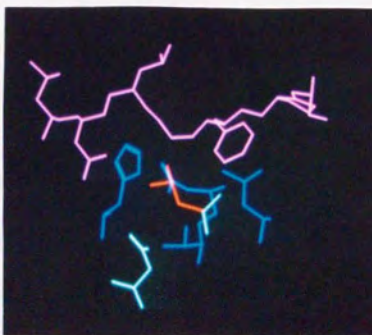


Fig-V-3. Simulation of amino acid replacement of Gly100 to Ala, Val, Leu.

## 材料 と 方法

### 変異型酵素

S 2 部位を構成している残基のうちの 2 残基を選び、Gly<sup>101</sup> を Ala, Val, Leu 残基に (ただし、Val は Gly<sup>101</sup>·Ser<sup>102</sup> → Val·His の 2 重変異の形で導入した)、Asn<sup>68</sup> を Asn 残基と同じ体積で疎水性の残基である Val に置換した、計 4 種の変異型酵素を調製した。

4 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(N68V)	Asn <sup>68</sup> → Val
AQN(G101A)	Gly <sup>101</sup> → Ala
AQN(G101L)	Gly <sup>101</sup> → Leu
AQN(G101V:S102H)	Gly <sup>101</sup> → Val, Ser <sup>102</sup> → His

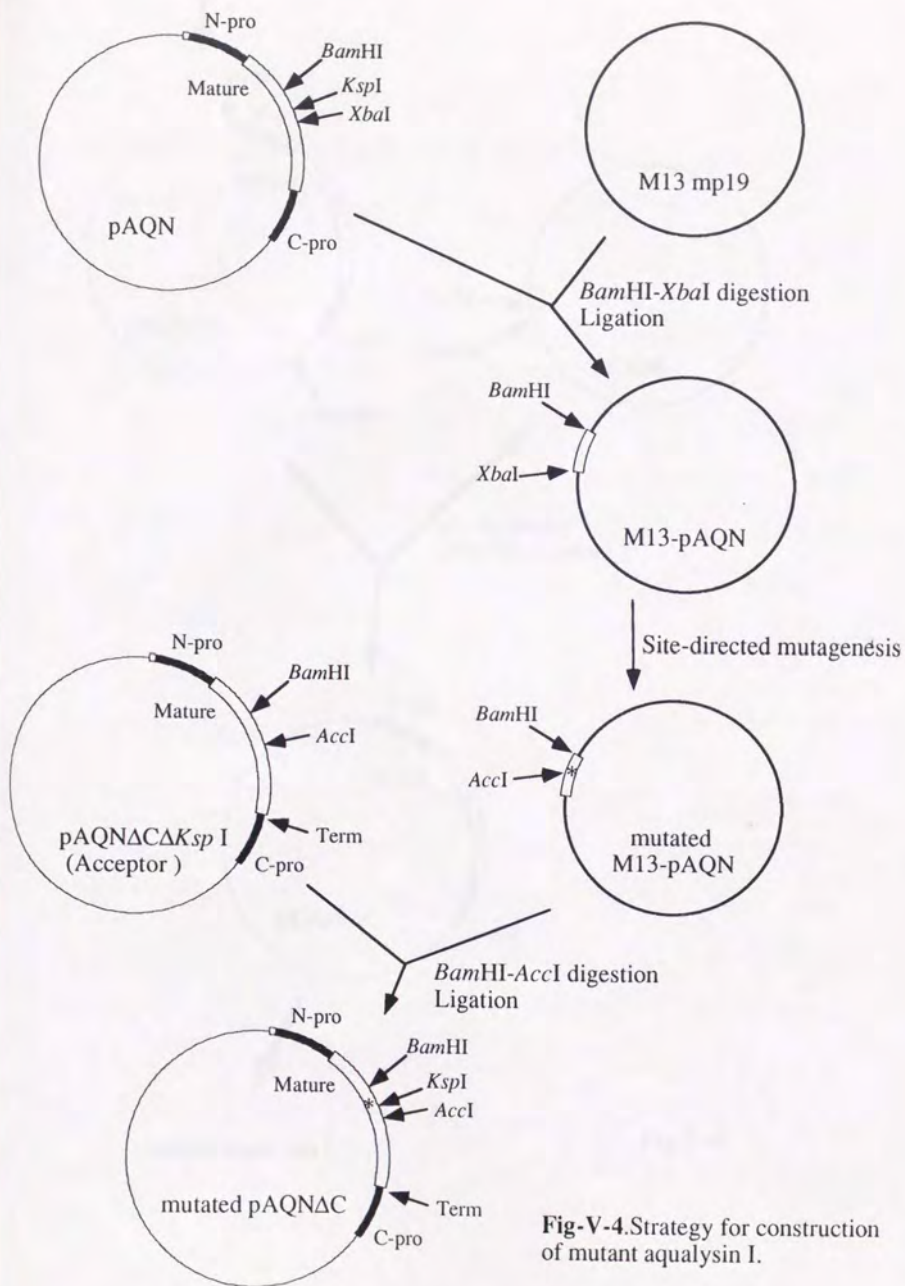
### 1. 変異の導入と発現ベクターの調製 (手順を Fig-V-4 に示した)

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 BamHI-XbaI 断片を切り出してファージ DNA (M13mp19 RF DNA) に組み込んで調製した U-ssDNA を鋳型とし、Table-V-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

**Table-V-1.** Oligonucleotide sequences of mutagenic primers

Mutation	Res.enz.	Oligonucleotide sequences
N68 Wild		AAC GGC CAG GAC TGC AAC GGC CAC GGT ACC CAT
N68 V	--	AAC GGC CAG GAC TGC <u>GTT</u> GGC CAC GGT ACC CAT
G101 Wild		GTC CTG GAC TGC AAC GGT TCC GGC TCC ACC TCT
G101 A	<i>MluI</i>	GTC CTG GAC TGC AAC <u>GCG</u> TCC GGC TCC ACC TCT
G101 L	--	GTC CTG GAC TGC AAC <u>CTG</u> TCC GGC TCC ACC TCT
G101V:S102H	--	GTC CTG GAC TGC AAC <u>GTA ACT</u> GGC TCC ACC TCT





**Fig-V-4.** Strategy for construction of mutant aqualysin I.

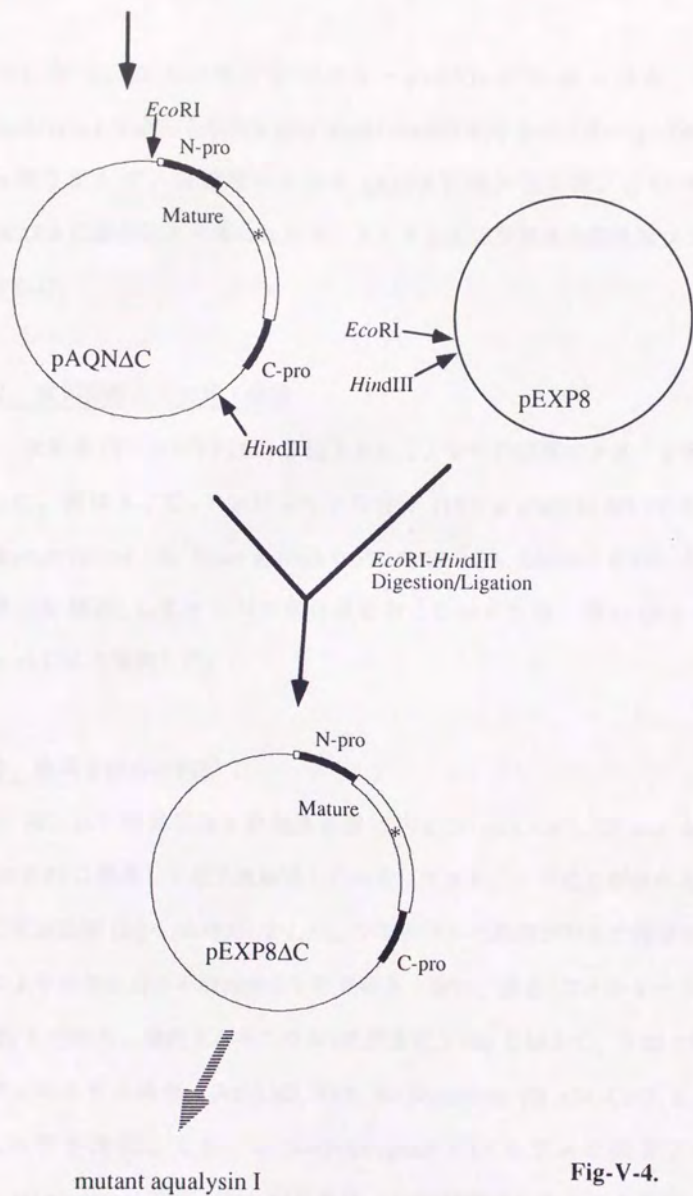


Fig-V-4.

出した *Bam*HI-*Acc*I 断片をベクター pAQN $\Delta$ C に組み込み、更に、*aqualysin* I 全遺伝子配列を含む *Eco*RI-*Hind*III 断片をベクター pAQN $\Delta$ C から切り出して、高発現ベクター pEXP8 に組み込んだ。このベクター pEXP8 に組み込んで得られたプラスミドを変異型酵素の発現用プラスミドとした。

## 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換した。菌は 37℃、アンピシリン存在下 (100  $\mu$ g/ml) において LB 培地 (Bactotryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, Glucose 0.2%) で一晚培養 (1% 植菌) してタンパク質合成をおこなわせた後、遠心 (5 k rpm, 10 min) により集菌した。

## 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<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%, Na phosphate 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 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 monoS 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4種の変異型酵素 AQN(N68V, G101A, G101L, G101V:S102H) の反応性を、トリペプチド基質を用いてP2特異性を測定し、あわせて標準基質としてのテトラペプチド基質を用いて測定した。一部の変異型酵素 AQN(N68V) に対しては、構造をもつ基質であるプロテアーゼ・インヒビター SSI を用いて阻害定数を測定し、導入した変異の影響を調べた。また、S2部位に導入した変異がP3特異性に対して及ぼす影響を調べるために、合成トリペプチド基質を用いて、2種の変異型酵素 AQN(N68V, G101A) のP3特異性を調べた。

#### 1. P2特異性の測定 (1)

P2部位の異なる4種の基質 suc-Phe-X-Ala-pNA (X =Ala, Nle, Val, Leu) (Boc-アミノ酸から液相法で合成したもの) を用いて、40℃、pH 7.5

(HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) における反応速度定数を求めた。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 (第II章参照)。

## 2. P 2 特異性の測定 (2)

S 2 部位に導入された変異が側鎖の更に小さなアミノ酸 Gly, Ala において及ぼす P 2 特異性の影響を調べるため、2 種の基質 suc-X-X-Phe-pNA (X=Ala,Gly) (Nova Biochem 社より購入) を用いて、3 種の変異型酵素 AQN(G101A, G101L, G101V:S102H) の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

ペプチド基質の P 2 特異性以外の反応性を調べるため、テトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Sigma 社より購入) を用いて測定した (40°C, pH 7.5)。反応様式は上記と同じくミカエリス・メンテン型に従っていた。

## 4. プロテアーゼ・インヒビター SSI の阻害定数の測定

変異型酵素の一つ AQN(N68V) を用いて、40°C、pH 7.5 における野生型 SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) の阻害定数を測定により求めた。野生型の aqualysin I の場合同様、SSI の阻害定数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、ペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を基質として SSI 濃度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 3 特異性の測定

P 3 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) と  $\text{Suc-Ala-Ala-Ala-pNA}$  (Sigma 社より購入) を用いて、2 種の変異型酵素 AQN(N68V, G101A) に対して、 $40^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7.5$  (HEPES  $100\text{mM}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $1\text{ mM}$ ) における反応速度定数を求めた。

## 結果と考察

### 変異型酵素 AQN(N68V)

#### 1. テトラペプチド基質と SSI に対する反応性

変異型酵素 AQN(N68V) 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と野生型 SSI の阻害定数を Table-V-2 に示した (pH 7.5, 40°C)。

テトラペプチド基質に対する反応性は、野生型酵素に比べると、 $k_{cat}$  値で約1/2倍、 $K_M$  値で約2倍となり ( $k_{cat}/K_M$  値は約1/4倍)、この基質に対する反応性は少し低下した。このテトラペプチド基質を用いて求めた野生型 SSI の阻害定数は、野生型 aqualysin I とほぼ同じであり、この変異は酵素・基質間の結合にはほとんど影響を及ぼしていなかった。また、データには示していないが、変異型酵素 AQN(N68V) と SSI との反応においては、平衡に達するのが遅く、約1時間を費やしており (野生型 aqualysin I の場合は5分程度で十分である)、この変異が反応速度 (つまり  $k_{cat}$ ) に影響を及ぼすことを示した。

#### 2. P 2 特異性

基質の P 2 部位を系統的に変えた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40°C, pH 7.5 におけ

**Table-V-2.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA by wild/mutant aqualysin I's, and inhibition constant of SSI toward these enzymes.

Enzyme	suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA			SSI
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$K_i$ [M]
Wild	33	1.2	28	$3.0 \times 10^{-10}$
N68V	15	2.4	6.2	$1.3 \times 10^{-10}$

Assays were performed at 40°C, pH 7.5(HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  
 $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )



る反応速度定数をTable-V-3に、反応速度の飽和曲線をFig-V-5に示した。

野生型酵素に比べると全体的に基質の $K_M$ 値は大きくなった(その影響で $k_{cat}/K_M$ 値は小さくなっていった)が、 $k_{cat}$ 値はAla残基において野生型酵素とほぼ同じ、Nle残基で約 $1/2$ 、Val残基で約 $1/3$ 、Leu残基で約 $1/4$ 倍となり、Ala残基以外での $k_{cat}$ 値が低下した。飽和曲線で比較すると、反応速度は基質濃度に関係なくAla>Nle>Val>Leuの順に大きく、野生型酵素と同じく、非分岐アミノ酸Ala、Nleを好み、分岐アミノ酸Val、Leuをあまり好まなかった。

全体的には、P2特異性は野生型酵素と同じであったが、Ala残基の反応性を保持したまま、他3種の残基の反応性を低下させていたため、P2特異性において、野生型酵素よりもAla嗜好性が高くなった。

### 3. P3特異性

P3部位の異なる2種のトリペプチド基質suc-X-Ala-Ala-pNA(X=Ala,Phe)に対する40℃、pH 7.5における反応速度定数をTable-V-4に、反応速度の飽和曲線をFig-V-6に示した。

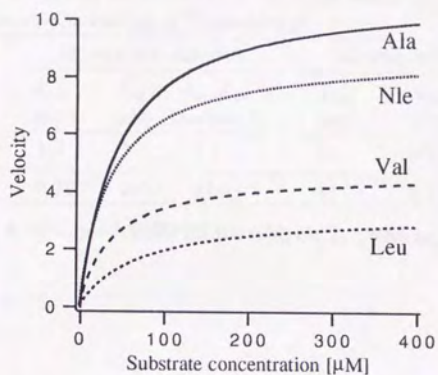
P2特異性の場合と同様に、全体に $K_M$ 値は大きくなった。Phe残基に対する反応では $k_{cat}$ 値は野生型酵素とほぼ同じであったが、Ala残基に対する $k_{cat}$ 値は野生型酵素よりも低くなった(約 $1/4$ 倍)。この変異型酵素のS3部位はPhe嗜好性で、野生型酵素と同じP3特異性を示したが、野生型酵素よりもPhe嗜好性が高くなった。

**Table V-3.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Phe-X-Ala-pNA (X=Ala, Nie, Val, Leu) by wild/mutant aqualysin I's. (Comparison of P2-specificity)

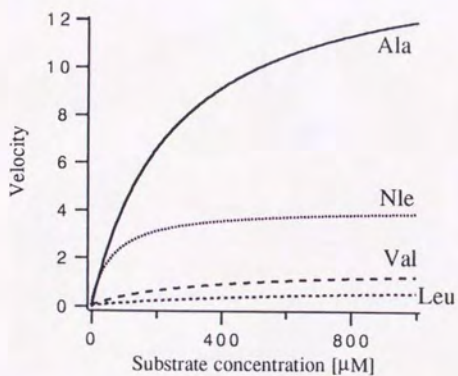
Enzyme	suc-Phe-Leu-Ala-pNA			suc-Phe-Val-Ala-pNA			suc-Phe-Ala-Ala-pNA			suc-Phe-Nie-Ala-pNA		
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Wild	3.3	0.071	46	4.7	0.039	120	11	0.044	250	8.8	0.036	250
N68V	0.87	0.64	1.36	1.6	0.323	4.9	15	0.256	56	4.1	0.067	61

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

A) wild



B) AQN(N68V)

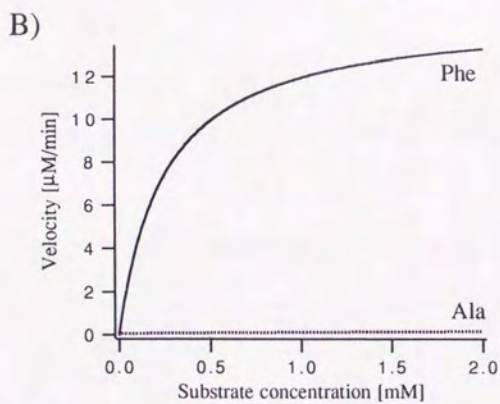
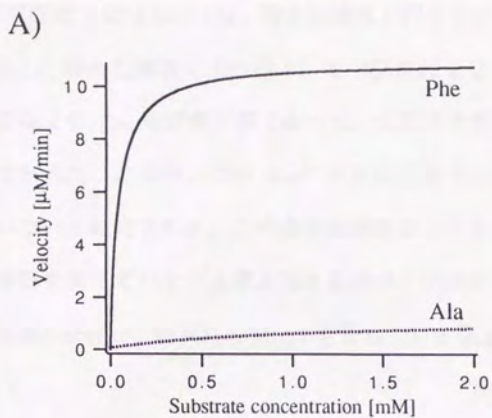


**Fig-V-5.** Comparison of P2-specificity by saturation curves of wild/mutant aqualysin I obeying Michaelis-Menten kinetics. Substrate : suc-Phe-X-Ala-pNA (X= Ala, Nle, Leu, Val), [E]=1  
A) aqualysin I (wild type), B) AQN(N68V)

**Table-V-4.** 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 <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Wild	1.2	1.1	1.1	11	0.044	250
N68V	0.39	6.0	0.065	15	0.256	56

Assays were performed at 40°C, pH 7.5(HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )



**Fig-V-6.** Comparison of P3-specificity by saturation curves for the substrates suc-X-Ala-Ala-pNA (X= Ala, Phe). A) wild type, B) AQN(N68V)

### 変異型酵素 AQN(N68V) のまとめ

変異型酵素 AQN(N68V) は、野生型酵素と同じ P 2・P 3 特異性を示した。しかし、野生型酵素に比べると、S 2 部位はより Ala 嗜好性が高く、S 3 部位はより Phe 嗜好性が高くなった。反応性そのものは、野生型酵素と同等であったことから、この Asn<sup>68</sup> 残基は活性中心とはほとんど相互作用していないと推定される。この変異型酵素における変異の導入は、S 2 部位の体積を変えていないと考えられるので、変異の導入による S 2 部位の疎水環境の変化が、特異性の変化をもたらしたと推定できる。

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

### 1. テトラペプチド基質に対する反応性

P 2 部位に Pro 残基をもつテトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA の反応速度定数を Table-V-5 に、反応速度の飽和曲線を Fig-V-7 に示した。

この基質に対する  $K_M$  値は野生型酵素と同等かそれ以下の値をとっており、導入した変異はミカエリス複合体形成の妨げになっていないことが示唆された。変異導入による主な変化は  $k_{cat}$  値の低下であり、AQN(G101A, G101V:S102H) の 2 酵素では約  $1/36$ 、AQN(G101L) では約  $1/2400$  倍の低下がみられた。

### 2. P 2 特異性 (1)

変異型酵素 AQN(G101A) の、P 2 部位の異なる 4 種の基質 suc-Phe-X-Ala-pNA ( $X = \text{Ala, Nle, Val, Leu}$ ) に対する反応速度定数を Table-V-6 に、反応速度の飽和曲線を Fig-V-8 に示した。

変異型酵素 AQN(G101L) は、これらの基質に対する反応性が低く、いずれの反応速度定数も決定できなかったため、データには載せていない。また、AQN(G101V:S102H) は、S 2・S 3 部位の 2 重変異型酵素であるため、P 3 部位に Phe 残基を有するこれらの基質に対する反応性が低くなっていて、 $k_{cat}$  値と  $K_M$  値が決定できず ( $k_{cat}/K_M$  値は求められた)、データからはずした。4 種の基質全体を通じて  $K_M$  値は大かった。反応性の大きさは  $\text{Nle} > \text{Val} > \text{Leu} > \text{Ala}$  の順であり、Ala 残基の反応性が大きく低下した。

**Table-V-5.** 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		
	$k_{\text{cat}}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Wild	33	1.2	28
G101A	0.88	1.3	0.68
G101V:S102H	0.90	0.73	1.2
G101L	0.014	0.67	0.021

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )



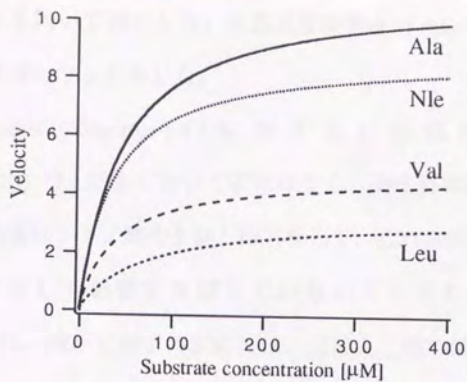
**Table V-6.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Phe-X-Ala-pNA (X=Ala, Nle, Val, Leu) by wild/mutant aqualysin I's. (Comparison of P2-specificity)

Enzyme	suc-Phe-Leu-Ala-pNA		suc-Phe-Val-Ala-pNA		suc-Phe-Ala-Ala-pNA		suc-Phe-Nle-Ala-pNA				
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Wild	3.3	0.071	4.7	0.039	120	11	0.044	250	8.8	0.036	250
G101A	>>1	>>1	0.18	1.22	0.148	>1.5	>0.5	0.0065	0.18	0.727	0.25

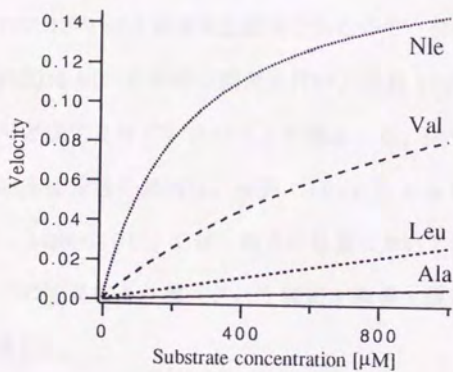
Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Kinetic parameters of G101L were not determined because of weak reactivities with four suc-Phe-X-Ala-pNA substrates.

A) wild



B) AQN(G101A)



**Fig-V-8.** Comparison of P2-specificity toward suc-Phe-X-Ala-pNA (X= Ala, Nle, Val, Leu) by saturation curves obeying Michaelis-Menten kinetics. ([E]=1) A) aqualysin I (wild type), B) AQN(G101A)

### 3. P2特異性(2)

側鎖の更に小さなアミノ酸 Gly, Ala を有する基質 suc-X-X-Phe-pNA (X=Gly, Ala) を用いて測定した、反応速度定数を Table-V-7 に、反応速度の飽和曲線を Fig-V-9 に示した。

基質 suc-Gly-Gly-Phe-pNA に対する反応性は、AQN(G101A, G101V:S102H) の2酵素において変化はなく、野生型酵素とほぼ同じであった。Gly 残基はアミノ酸の主鎖と同じなので、これらの変異は基質のペプチド主鎖に対して影響を及ぼしていないことがわかった。一方、suc-Ala-Ala-Phe-pNA に対する反応性は、主に  $k_{cat}$  値の低下を引き起こし、AQN(G101A)では約1/10、AQN(G101V:S102H)では約1/30倍になっており、導入した側鎖が大きいほど  $k_{cat}$  値は低下した(変異型酵素 AQN(G101V:S102H) は2重変異型酵素であるので、P2特異性の対照として AQN(S102H) を用いて同様の測定を行い、変異 S102H がこの基質の反応性をほとんど変化させていないことを確認した。従って、これらの基質に対する反応速度定数の傾向は、変異 G101V によるものであると考えられる)。また、AQN(G101L) では、両方の基質において反応性は大きく低下しており、この変異により導入された側鎖が基質主鎖とも相互作用していたことを示唆した。

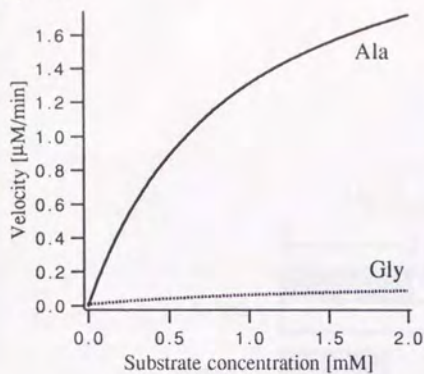
2つの変異型酵素 AQN(G101A, G101V:S102H)において、Gly 残基嗜好性は上昇した。変異の導入による Gly 残基嗜好性の変化を、 $k_{cat}/K_M$  値を用いて、Fig-V-10 に示した。

**Table-V-7.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-X-X-Phe-pNA (X=Gly, Ala) by wild/mutant aqualysin I.

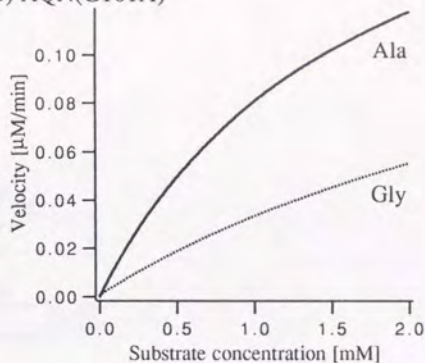
Enzyme	suc-Ala-Ala-Phe-pNA			suc-Gly-Gly-Phe-pNA		
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
wild	2.5	0.91	$2.8 \times 10^3$	0.15	1.6	$9.5 \times 10^1$
G101A	0.22	1.73	$1.3 \times 10^2$	0.17	4.2	$4.0 \times 10^1$
G101V:S102H	0.091	1.01	$9.0 \times 10^1$	0.25	3.44	$7.2 \times 10^1$
G101L	0.009	1.47	6.2	0.024	5.3	4.5
S102H	1.7	1.3	$1.3 \times 10^3$	0.26	6.0	$4.2 \times 10^1$

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410} = 8680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

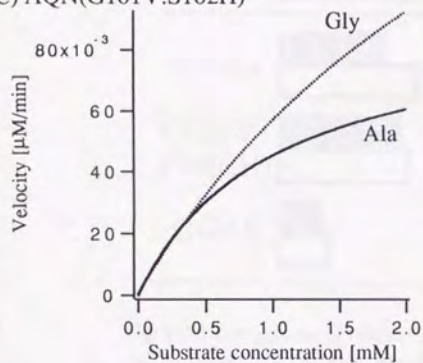
A) wild



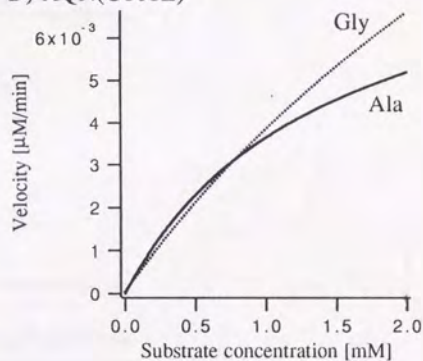
B) AQN(G101A)



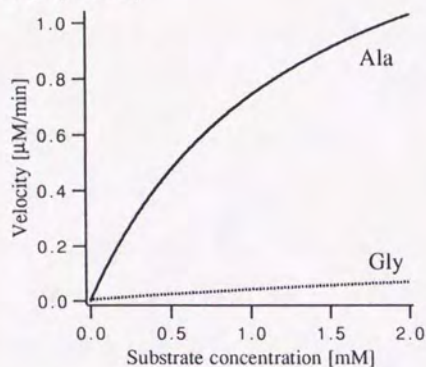
C) AQN(G101V:S102H)



D) AQN(G101L)

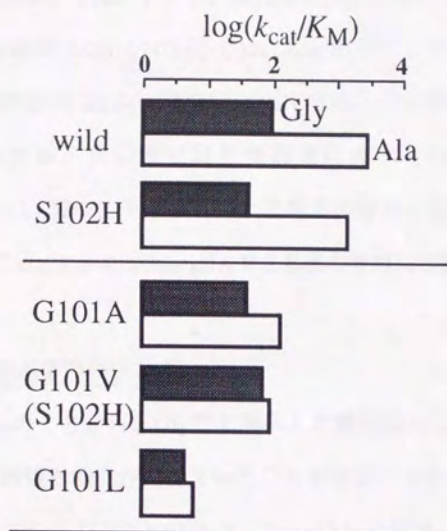


E) AQN(S102H)



**Fig-V-9.** Comparison of reactivity toward suc-X-X-Phe-pNA (X= Ala, Gly), by saturation curves obeying Michaelis-Menten kinetics.

A) wild type, B) AQN(G101A), C) AQN(G101V:S102H), D) AQN(G101L), E) AQN(S102H)



**Fig-V-10.** Comparison of reactivity ( $k_{cat}/K_M$ ) toward suc-X-X-Phe-pNA (X = Gly, Ala) by wild/mutant aqualysin I.

#### 4. P3 特異性

P3部位の異なる2種の基質  $\text{suc-X-Ala-Ala-pNA}$  ( $X = \text{Ala, Phe}$ ) に対する反応速度定数を Table-V-8 に、反応速度の飽和曲線を Fig-V-11 に示した。

変異型酵素 AQN(G101A) では、Ala 嗜好型となり P3 特異性は変化した。変異型酵素 AQN(G101V:S102H) では、Phe 嗜好型で野生型酵素と同じであったが、反応性は野生型酵素に比べて低下した。変異型酵素 AQN(G101L) では、テトラペプチド基質の場合と同様に反応性の低下が大きく、基質  $\text{suc-Phe-Ala-Ala-pNA}$  では基質の分解は検出されなかった。

#### Gly<sup>101</sup> の残基置換のまとめ

これらのことから、Gly<sup>101</sup> に導入した側鎖は S2 部位を埋める方向に伸び、P2 側鎖と相互作用していたことが推定できる。Subtilisin をモデルとしたシミュレーションによると、Gly→Ala の置換、および Gly→Val の置換は S3 部位に側鎖を伸ばして空間を埋め、P2 部位の Ala 残基などのアミノ酸の側鎖と重なる。Gly→Leu の置換では、Leu 側鎖は基質主鎖とも重なり、全ての基質に対する反応を阻害することを示した。

このシミュレーションの結果と測定の結果とはよく一致しており、Gly 残基から Ala, Val 残基への置換は、S2 部位の空間を狭くすることにより Gly 嗜好性を上昇させた。Gly→Leu 残基への置換は S2 部位の空間を埋めて P2 残基側鎖を排斥するだけでなく、基質主鎖の結合をも阻害することにより、すべての基質の反応性を低下させた。

変異型酵素 AQN(G101A) では、側鎖の導入により、P2 特異性だけでなく、P3 特異性までもが変化した。

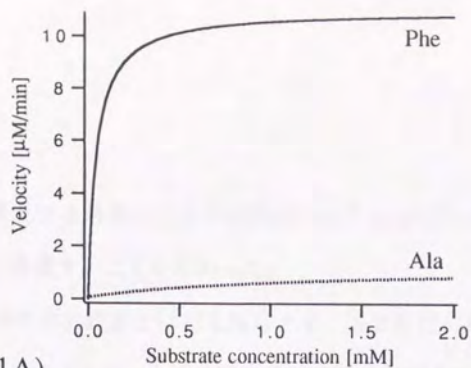
**Table-V-8.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-X-Ala-Ala-pNA (X=Ala, Phe) by wild/mutant aqualysin I's. (Comparison of P3-specificity)

Enzyme	suc-Ala-Ala-Ala-pNA			suc-Phe-Ala-Ala-pNA		
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Wild	1.2	1.1	1.1	11	0.044	250
G101A	1.5	18	0.08	>1.5	>0.5	0.0065
G101V:S102H	0.07	5.6	0.012	>0.01	>0.2	0.046
G101L	>0.01	>10	0.003		ND	

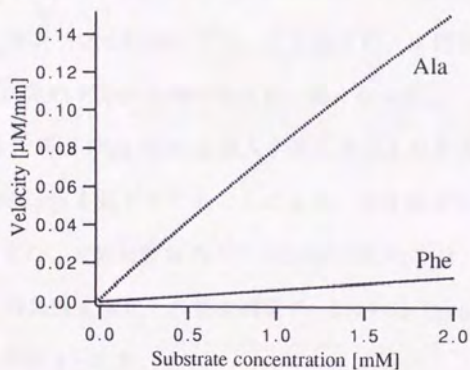
Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\epsilon_{410}$  = 8680 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)  
 "ND" represents for "not detected"



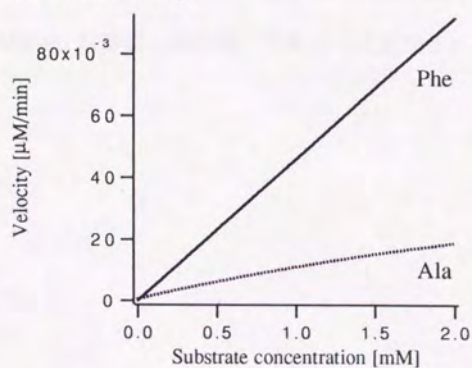
A) wild



B) AQN(G101A)



C) AQN(G101V:S102H)



**Fig-V-11.** Comparison of P3-specificity toward suc-X-Ala-Ala-pNA (X= Ala, Phe) by saturation curves obeying Michaelis-Menten kinetics. ( $[E]=1.0$ )  
A) aqualysin I (wild type), B) AQN(G101A), C) AQN(G101V:S102H)

## 第V章のまとめ

S 2 部位を構成する残基のうちの 2 残基 Asn<sup>68</sup> と Gly<sup>101</sup> は残基置換により P 2 特異性を改変することがわかった。

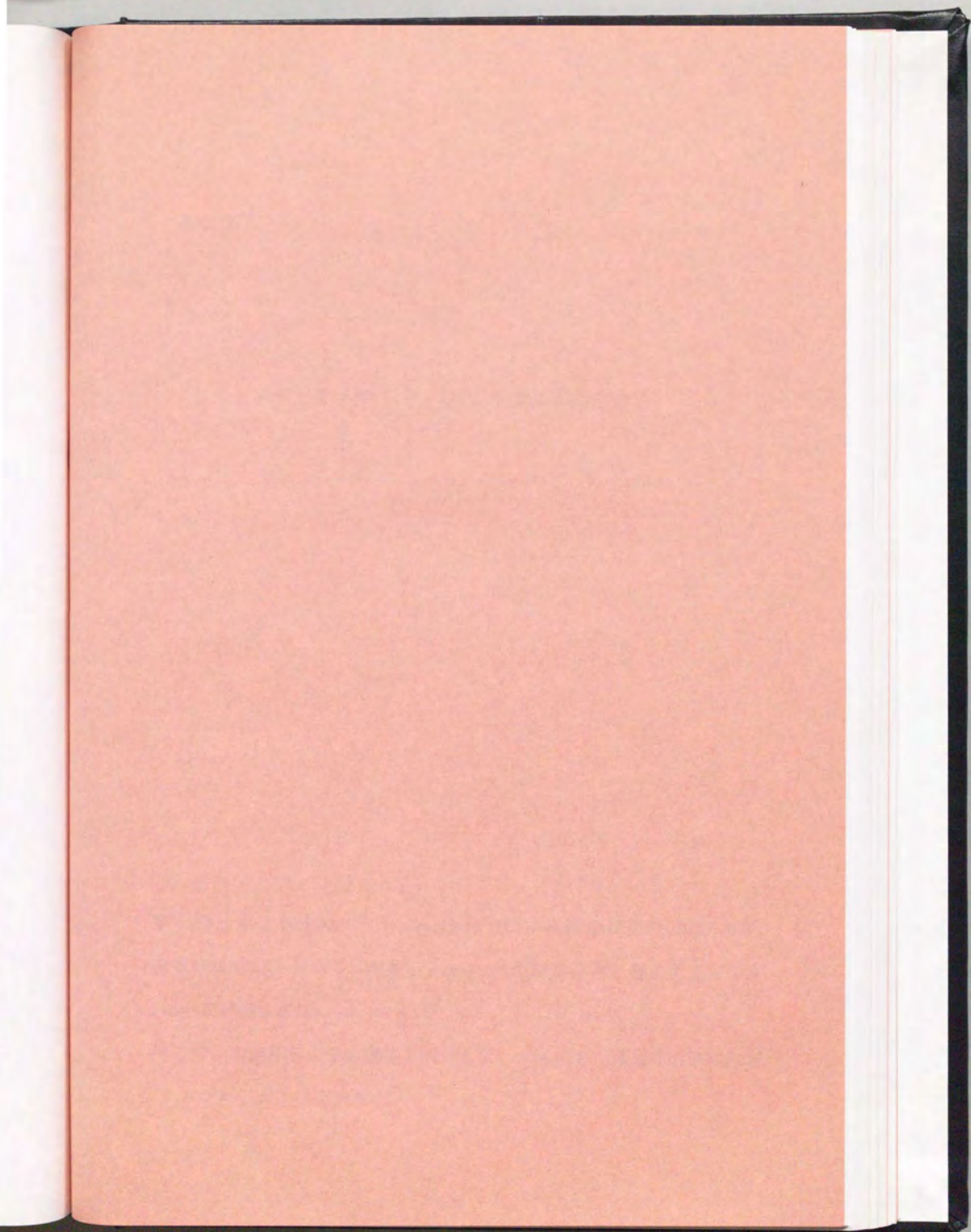
Asn<sup>68</sup> 残基は活性中心残基とは相互作用せず、S 2 部位の疎水環境に影響を与えていると推定された。この残基を体積が同じで疎水性の Val 残基に置換した変異型酵素 AQN(N68V) では、S 2 部位の Ala 残基嗜好性は更に高くなり、S 3 部位の Phe 残基嗜好性は更に高くなった。

Gly<sup>101</sup> 残基は、側鎖 (Ala, Val) を導入することにより P 2 特異性を変化させ、Ala 残基嗜好性を低下させることにより、S 3 部位の Gly 嗜好性を高く改変した。また、変異型酵素の 1 つ AQN(G101A) では、P 2 特異性だけでなく、P 3 特異性も変化し、類縁酵素の subtilisin Carlsberg と類似した P 2・P 3 特異性を示した。

シミュレーションと測定値の一致から、aqualysin I の S 2 部位の構造は、他の subtilisin 型酵素とほぼ同一であると推定できる。

## References

- 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
- Davril,M., Jung,M.-L., Duportail,G., Lohez,M., Han,K.K., Bieth,J.G.,  
(1984) *J.Biol.Chem.*, **259**, 3851-3857
- Dimicoli,J.-L., Renaud,A., Bieth,J.B., (1980) *Eur.J.Biochem.*, **107**, 423-432
- Dimicoli,J.-L., Renaud,A., Lestienne,P., Bieth,J.G., (1979) *J.Biol.Chem.*, **254**, 5208-5218
- Gros,P., Kalk,K.H., Hol,W.G.J., (1991) *J.Biol.Chem.*, **266**, 2953-2961
- Heinz,D.W., Priestle,J.P., Rahuel,J., Wilson,K.S., Grütter,M.G.,  
(1991) *J.Mol.Biol.*, **217**, 353-371
- Kasafrek,E., Fric,P., Slaby,J., Malis,F., (1976) *Eur.J.Biochem.*, **69**, 1-13
- Kossiakoff,A.A., White,M.U., Eigenbrot,C., (1991) *Biochemistry*, **30**, 1211-1221
- 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
- Poulos,T.L., Alden,R.A., Freer,S.T., Birktoft,J.J., Kraut,J.,  
(1976) *J.Biol.Chem.*, **251**,1097-1103
- Robertus,J.D., Alden,R.A., Birktoft,J.J., Kraut,J., Powers,J.C., Wilcox,P.E.,  
(1972) *Biochemistry*, **11**, 2439-249
- Sobek,H., Hecht,H.J., Hofmann,B., Aehle,W., Schomburg,D., (1990) *FEBS*, **274**, 57-60
- Siezen,R.J., Vos,W.M., Leunissen,J.A.M., Dijkstra,B.W.,  
(1991) *Protein Engineering*, **4**, 719-737
- Takagi,H., Morinaga,Y., Ikenaka,H., Inouye,M., (1988) *J.Biol.Chem.*, **263**, 19592-19596
- Thomson,A., Kapadia,S.B., (1979) *Eur.J.Biochem.*, **102**, 111-116
- 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



### 第3部

#### タンパク質工学 —— 新たな試みへの序章

第1部、第2部を通じて、aqualysin Iの立体構造は活性中心及び基質結合部位において、類縁の subtilisin 型酵素たちと極めてよく似ていることが理解された。

そこで、類縁酵素の立体構造を利用して、活性中心と基質結合部位に対して、タンパク質工学を試みた。

## 第 VI 章

### メタル・スイッチの導入

アクアライシン I は単量体酵素である。通常条件下において活性を可逆的に制御する「リガンド」や「エフェクター」等の制御因子は存在しない。前駆体からひとたび成熟体へ転じてしまえば、分解により朽ち果ててゆくその瞬間まで、ずっと「活性型」として存在してゆく。

しかし、それではあまりに「芸」がない。

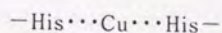
そこで、この酵素に活性のオン・オフを切り替える「スイッチ」を導入することを企画した。

## モデリング

野生型酵素には「スイッチ」になるようなものは存在しない。従って、新たに導入する必要がある。モデルを単純化するため、導入する「スイッチ」として、以下に示す3つを条件とした。

1. 化学修飾は用いない
2. 酵素はモノマーのまま機能する
3. ありふれた試薬の投与により「スイッチ」のオン・オフが切り替えられる

以上を満たす「スイッチ」として、金属イオンとキレーターの組合せを利用することを考えた。すなわち、金属イオンを「リガンド」として作用させ、それと配位結合するアミノ酸残基を酵素分子表面のいずれかの部位に導入することにより、金属イオン結合時には活性の「オフ」、非結合時には「オン」となるように機能させるのである。金属イオンと配位結合しやすいアミノ酸残基に His 残基があるが、金属イオンとして Cu イオンを選んだ場合、2つの His 残基と Cu イオンとが適当な配置にあるならば、



の形で配位結合を形成することが期待できる。2つの His 残基と配位結合している Cu イオンは EDTA (His 残基のイミダゾール環よりもはるかに結合定数大きい金属キレーター) 等の試薬の投与によって容易に酵素表面から引き剥せるため、酵素分子にとって Cu の結合は“可逆的”であり、「スイッチ」として機能することが期待できる。

動物由来のセリン・プロテアーゼである chymotrypsin を材料として、

金属イオンと His 残基との配位結合を利用した活性の制御に成功した実例が1つある (Higaki et al. 1990)。この例では、活性中心の His 残基とアミノ酸残基置換により導入した His 残基とを利用して、Cu イオンの投与により配位結合を形成させて、活性中心の His 残基の側鎖の向きを変え、活性中心の3残基の連携を破壊することによって活性を消失させる (消失した活性は金属キレーターの投与により回復する)。

この例から、2つの His 残基は適当な距離・角度に存在していれば、容易にCu等の金属イオンと配位結合を形成することが期待でき、「スイッチ」として用いるのによい候補となる。

セリン・プロテアーゼのような球状分子では構造変化を巻き込んだのスウィッチングを期待することは難しいため、この「メタル・スイッチ」は活性中心か、基質結合部位を標的とすることになる。subtilisin 型のセリン・プロテアーゼでは上述した trypsin 型の酵素の場合とは異なり、活性中心の His 残基は基質結合部位の S 2 部位に面して存在しているため、chymotrypsin と同じ手法はとれない。そこで、本章では、基質が酵素分子へ結合する段階での制御を考え、基質結合部位を標的とした。

すなわち、基質結合部位の溝の両側に2つの His 残基を導入することにより、Cu イオンの解離・結合で開閉する「扉」をつけるのである (Cu 非存在下では、「扉」はなくなり、基質はクレフトに進入できるため、酵素活性は「オン」になる)。このような His-Cu-His の架橋が形成される条件として、2つの His 残基はともに溶媒側に露出していること、および2つの His 間の距離が 1 nm 程度であることが望ましい。基質結合クレフトを形成する2つのペプチド鎖 (Ser<sup>128</sup>~Gly<sup>132</sup>, Gly<sup>100</sup>~Ser<sup>104</sup>) おいて、それ



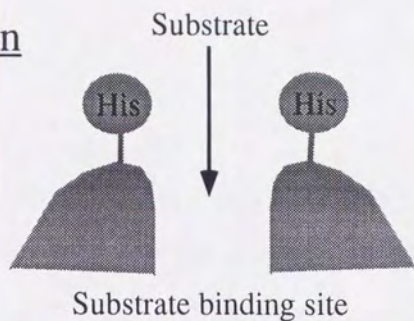
らの条件を満たす残基を類縁酵素の subtilisin Carlsberg の立体構造 (PDB ID コード: 2SEC) をもとにして、コンピューター・グラフィクスを用いて、アミノ酸残基置換、及び、置換導入した側鎖のMMやMDによるシミュレーションをおこない、検索したところ、S3部位を構成する Ser<sup>102</sup>と Gly<sup>131</sup>が適当な候補として見つかった。

Fig-VI-1に「メタル・スイッチ」の機能模式図を示す。Cuイオン存在時には、Cuイオンは溝の両側の His 残基と配位結合して基質結合部位の入口を閉じ、基質と酵素との結合を阻害する。Cuイオンの非存在時には、この「扉」は開き、基質は酵素と結合して、活性が発揮される。

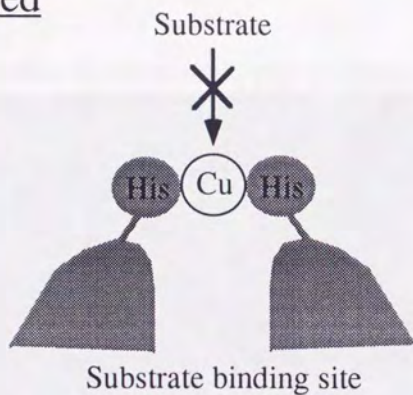
Fig-VI-2に subtilisin Carlsberg の立体構造をもとにして Ser<sup>102</sup>と Gly<sup>131</sup> (subtilisin では Ser<sup>101</sup> と Gly<sup>128</sup>) とを His 残基に置換した時の構造を示す。(図中の His 残基側鎖の位置は、シミュレーションにより得た「可能性の高い」位置を表す。

シミュレーションによれば、導入された2つの His 残基側鎖はともに溶媒側に露出していて、溶媒側からのCuイオンの接近が可能である。また、2つの His 残基間の距離は 0.55 nm 程度であり、Cuイオンと配位結合を形成することが十分期待できる。

Open



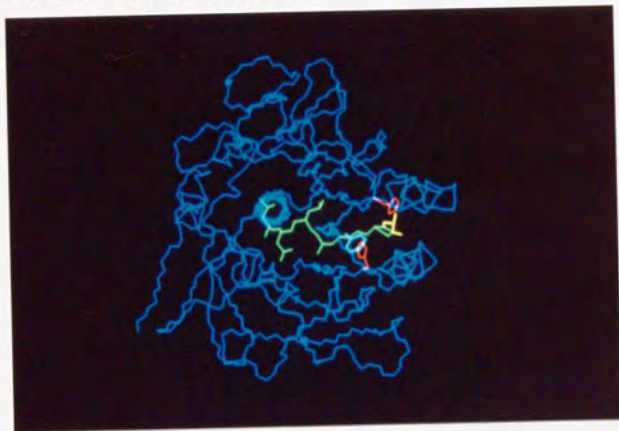
Closed



**Fig-VI-1.** Diagram of metal-switch.

With metal-ion, the "gate" of substrate binding site is "closed".  
And without metal-ion (by addition of EDTA, chelating reagent),  
the "gate" opens, so that the substrate can merge into the site.

A) Substrate binding site of subtilisin Carlsberg and substrate eglin-c (P2'-P5 ; green)  
Introduced His residues were in red.



B) Simulation of introduced His residues (red) by amino acid replacement.

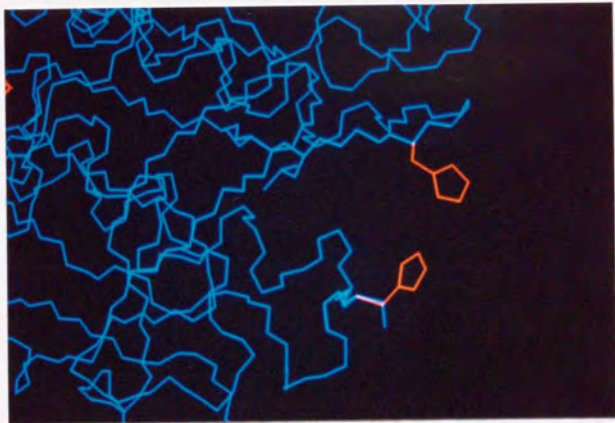


Fig-VI-2.

## 材料と方法

### 変異型酵素の調製

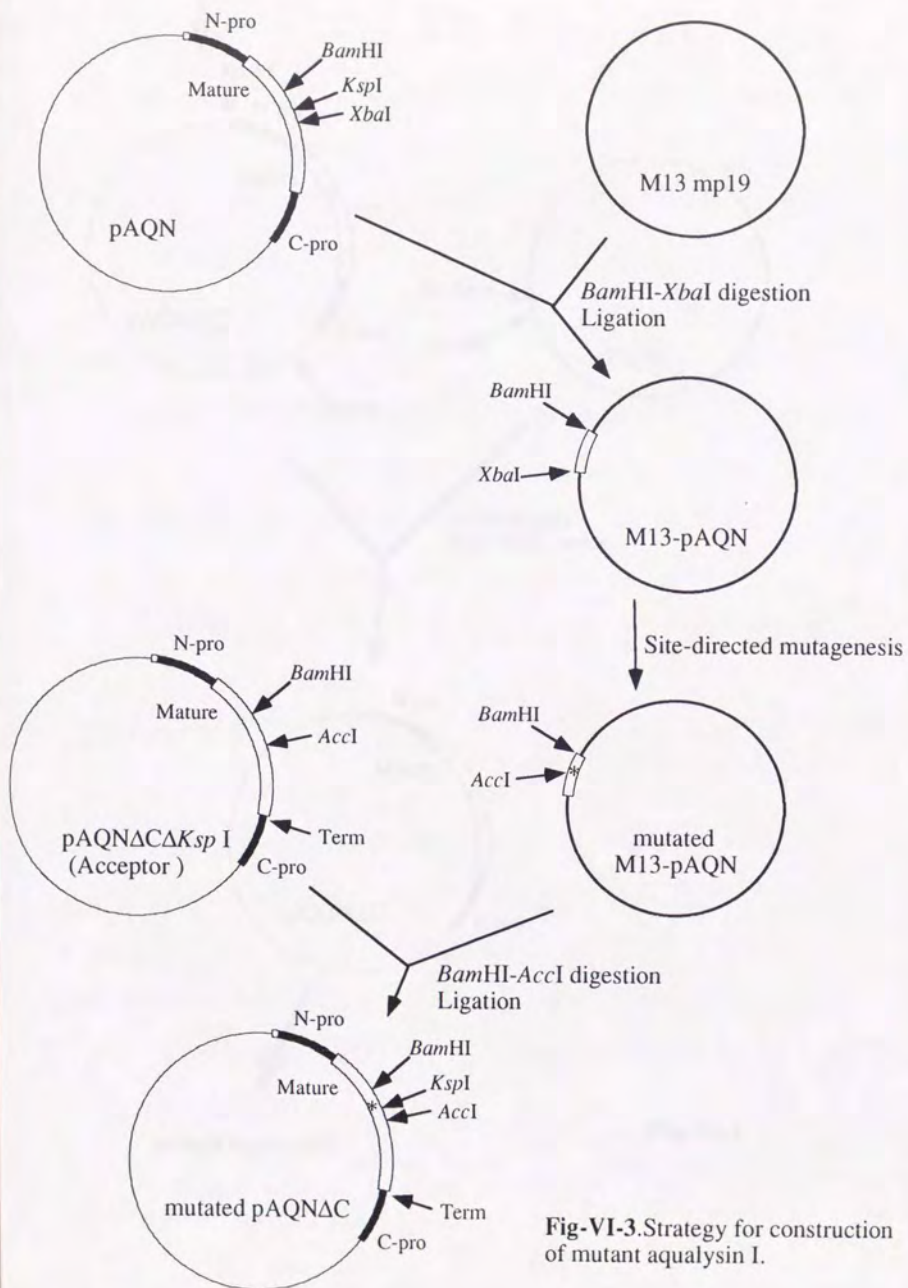
Aqualysin I の構成遺伝子を含むプラスミド pAQN より変異導入予定断片を含む *Bam*HI-*Xba*I 断片をファージ DNA (M13 mp19 RF DNA) に組み込んで得た U-ssDNA を鋳型として、2つの変異導入プライマー (Table-VI-1 参照) を用いて、2重変異を導入した (Fig-VI-3)。変異導入はすべて Bio-Rad のマニュアルに従って行った。2つの変異はいずれも制限酵素 *Nco*I の切断配列を導入するため、得られたファージ DNA の制限酵素 *Nco*I 切断片長により変異導入を確認し、DNA シークエンシングにより更に変異導入を確認した。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 断片を発現ベクター pAQN $\Delta$ C (aqualysin I の C-プロ領域を欠く発現ベクター) に組み込み、変異型酵素のプラスミドを得た。発現ベクター pAQN $\Delta$ C ではタンパクの発現量が少ないことが予想されたので、更に変異型酵素の全配列を含む *Eco*RI-*Hind*III 断片を切り出して、高発現ベクター pEXP8 に組み込み、この変異型酵素の発現ベクターとした。

タンパク質の発現は、大腸菌 (*E.coli* MV1184) を宿主として、アンピシリン存在下 (100  $\mu$ g/ml) において LB 培地 (Yeast Extract 0.5%, Bacto tryptone 1.0%, NaCl 0.5%, Glucose 0.2%) を用い、37 $^{\circ}$ C で一晩培養して行わせた。

菌体からの精製は、菌体の熱処理溶液 (EPPS 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 1%, pH 8.5) への懸濁、超音波破碎、70 $^{\circ}$ C 処理 (約50時間)、

**Table-VI-1.** Oligonucleotide sequences of mutagenic primers

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



**Fig-VI-3.** Strategy for construction of mutant aqualysin I.

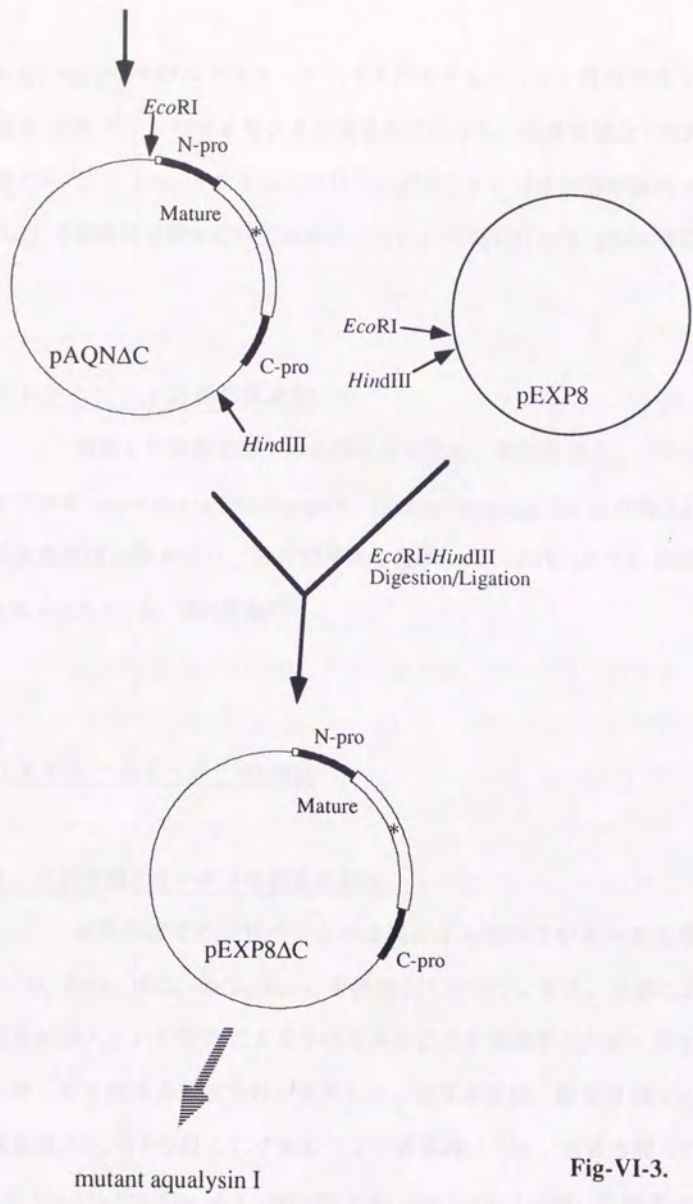


Fig-VI-3.

Butyl-toyoppearl 650 カラム・クロマトグラフィー（リン酸緩衝液 20 mM、  
硫酸 25% でタンパクをカラムに吸着させたのち、低濃度硫酸で段階的に溶  
出させた）、mono-S カラム・クロマトグラフィー（リン酸緩衝液 10 mM、  
NaCl で塩濃度勾配をかけて溶出させた）、の順で行った（第IV章参照）。

### テトラペプチド基質の反応性

調製した変異型酵素の活性をみるため、標準基質としてテトラペプ  
チド基質  $\text{suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$ （Sigma Chemical Co. より購入）を用い  
て反応速度定数を求め、野生型酵素と比較した（40°C, pH 7.5, HEPES 100  
mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM、第II章参照）。

### 「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

変異型酵素の活性が、どの金属により阻害されるかを5種の金属  
 $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  を添加して調べた。また、金属による活性  
阻害が導入された変異によるものであることを検証するため、野生型酵素  
に対しても同様の測定を行い比較した。活性測定は、酵素溶液(40  $\mu\text{l}$ )と金  
属溶液(40  $\mu\text{l}$ )とを混合して室温で15分間おいた後、基質溶液(200  $\mu\text{l}$ :  
 $\text{suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$ , HEPES 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM)を加えて、40°C  
において基質分解活性を追跡した。



### 2. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (1)

変異型酵素の活性に対して阻害作用を示す3種の2価金属  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  を用いて、活性制御の切り替えを調べた。測定は、酵素溶液 (100  $\mu\text{l}$ ) と金属溶液 (100  $\mu\text{l}$ : 5 mM) とを混合して室温で15分間おいた後、80  $\mu\text{l}$ ずつ分取して、一方にはEDTA溶液 (20  $\mu\text{l}$ :100 mM) を、他方には mili-Q 水 (20  $\mu\text{l}$ ) を加えて更に15分間室温に置いた後、それぞれ基質溶液 (200  $\mu\text{l}$ ) を加えて、40℃において基質分解活性を追跡した。コントロールとして、金属の代わりに mili-Q 水を用いて同様に測定した。

### 3. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (2)

HEPES 緩衝液と沈澱を形成しにくく、変異型酵素に対して大きな阻害作用を示す Zn を用いて、経時的に酵素活性の切り替えを調べた (40℃、pH 7.5、HEPES 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM)。測定は、基質溶液(200  $\mu\text{l}$ )に酵素溶液(20  $\mu\text{l}$ )を加えて反応を開始させた後、 $\text{ZnCl}_2$  (5 mM, 20  $\mu\text{l}$ ) を添加し、ある時間をおいた後、EDTA(10 mM, 20  $\mu\text{l}$ )、 $\text{ZnCl}_2$ (5 mM, 60  $\mu\text{l}$ )、EDTA(10 mM, 60  $\mu\text{l}$ )を順に添加し、基質  $\text{succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$  の分解活性を追跡した。

## 2 価金属の阻害活性の測定

### 1. 阻害様式の検証

モデル上では、金属結合部位（導入した2つの His 残基）は基質結合部位に位置しており、金属イオンは基質と基質結合部位をめぐって競争的に作用するはずである。そこで、阻害定数の大きさ、および、阻害様式を検証するため、基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を用いて、CuSO<sub>4</sub> の共存 (0.2 mM) ・非共存下において反応速度定数を求めた (40℃, pH 7.5, HEPES 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 μM)。 (Cu イオンは Good buffer と沈澱をつくり易いため、HEPES 緩衝液の濃度は低く設定してある)。

### 2. 阻害定数の測定

金属による活性阻害は基質に対して競争的であると推定される。しかも、酵素・金属の結合は基質の場合に比べて強いことが上述の測定から推定される。そこで、SSI と同様の測定方法を用いて (第III章参照)、CuSO<sub>4</sub> と ZnCl<sub>2</sub> の阻害定数を測定した。測定は、一定濃度の酵素溶液 (40 μl) と濃度の異なる金属溶液 (40 μl) とを混合して 40℃ で 15 分間置いた後、基質溶液 (200 μl: suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.5 at 40℃) を加えて、その残存活性を 40℃ で測定し阻害定数を求めた。

### P 3 特異性の測定

変異を導入した2つの残基はS3部位の残基である(第IV章参照)。従って、変異はP 3 特異性に影響を及ぼしている可能性がある。そこで、P 3 部位の異なる2種のトリペプチド基質 suc-Phe-Ala-Ala-pNA (液相法で合成したもの。第II章参照)、suc-Ala-Ala-Ala-pNA (Sigma Chemical Co., より購入)を用いて反応速度定数を40℃、pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)にて測定し、P 3 特異性を調べた。

## 結果と考察

### テトラペプチド基質の反応性

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-VI-2 に示した (40°C, pH 7.5, HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)。

この変異型酵素の反応速度定数は、野生型酵素とほぼ同じであり  $k_{cat}$  及び  $K_M$  値の差は小さかった。この変異導入が活性に与える影響は大きいことがわかった。

**Table-VI-2.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA by wild/mutant aqualysin I.

Enzyme	$k_{\text{cat}}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
wild	33	1.2	28
mutant	25	1.5	16

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)

## 「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

5種の2価金属  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  の阻害効果を野生型酵素と比較し Table-VI-3 に示した。

変異型酵素の活性は、3種の金属 Cu, Zn, Ni の添加により低下した。活性の低下は Cu, Zn において大きく(金属 2.5 mM 存在下で、Cu では16%、Zn では10%に低下した)、Niではあまり低下しなかった(45 mMで50%の低下)。野生型酵素の活性は、これらの金属の添加によりやや低下したものの、その低下は小さく、変異型酵素における活性の低下は導入した変異によるものであることが確認された。

また、Ca, Mg および EDTA による活性の低下はほとんどなく、導入した金属結合部位は Cu, Zn 等の金属と静電的結合ではなく配位結合で結合していることを示唆した。

### 2. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (1)

変異型酵素に対して阻害活性を示した3種の金属 Cu, Zn, Ni を用いて、金属キレーター試薬 EDTA の添加による活性回復効果を調べた (Table-VI-4)。

金属 (2.5 mM) の添加により活性が低下した酵素に、EDTA (20 mM) を添加すると、活性は完全に回復した。

従って、金属による活性阻害効果は“可逆的”であり、活性回復はほぼ完全であったことから、導入した変異は「スイッチ」として機能することがわかった。

**Table-VI-3.** Inhibition activity of divalent cation toward wild/mutant aqualysin I.

Metal	concentration [mM]	Relative activity [%]	
		mutant	wild
control	---	100	100
CuSO <sub>4</sub>	0.25	28	75
	2.5	16	74
	25	0.38	---
ZnCl <sub>2</sub>	0.25	55	88
	2.5	9.7	91
NiCl <sub>2</sub>	2.5	59	97
	15	63	100
	45	69	---
	450	50	---
CaCl <sub>2</sub>	10	85	---
	50	83	92
MgCl <sub>2</sub>	10	109	---
	50	117	103
EDTA	10	109	---
	50	104	113

**Table-VI-4.** Inhibition and repair of proteolytic activity of mutant aqualysin I by addition of metal-ion and EDTA.

	Metal [mM]	EDTA [mM]	Relative activity [%]
control	---	20	114
	---	0	100
CuSO <sub>4</sub>	2.5	20	105
	2.5	0	7.8
ZnCl <sub>2</sub>	2.5	20	112
	2.5	0	13.2
NiCl <sub>2</sub>	2.5	20	132
	2.5	0	42

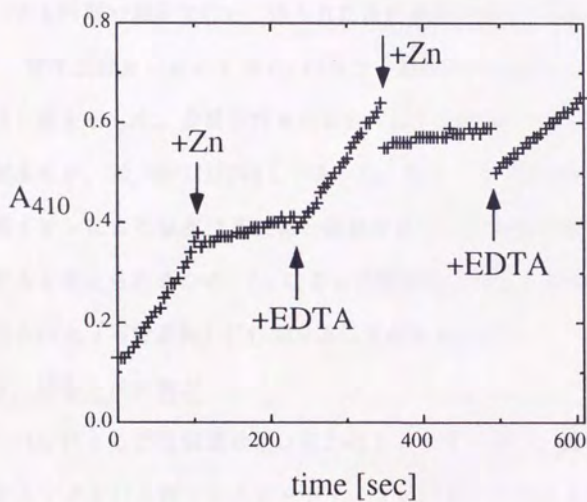


### 3. 金属イオン/EDTAによる活性制御の測定 (2)

Zn 及び EDTA の添加による変異型酵素活性の経時変化を Fig-VI-4 に示した。Zn 添加による酵素活性の低下と、EDTA 添加による活性の回復が、繰り返し行われた。試薬の投与により反応溶液中の酵素及び基質濃度は低下するため、EDTA 添加後のみかけの酵素活性は低下したが、濃度を補正すると酵素活性はほぼ完全に回復していた。



Fig-VI-4. Time course of the activity of the mutant enzyme. The activity was measured at 30°C in a reaction mixture containing 100 μM substrate and 100 μM enzyme. The reaction was stopped by the addition of 1 M NaOH. The activity was measured after the addition of Zn and EDTA. The activity was measured after the addition of Zn and EDTA.



**Fig-VI-4.** Metal-switching assay.

Protolytic activity was chased at A<sub>410</sub>, at 40°C, pH 7.5 (HEPES 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM) after mixture of 20 µl of enzyme solution and 200 µl of substrate solution (suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA), and addition of ZnCl<sub>2</sub> (5 mM, 20 µl), EDTA (10 mM, 20 µl), ZnCl<sub>2</sub> (5 mM, 60 µl), and EDTA (10 mM, 60 µl) were followed.

## 2 価金属の阻害活性の測定

### 1. 阻害様式の検証

変異導入部位は基質結合部位であるため、金属による活性阻害は基質に対して競争的であるはずである。そこで、2 価金属の 1 つ Cu ( $\text{CuSO}_4$ ) を用いて、競争阻害型の測定を行った。あらかじめ金属 (0 mM または 0.2 mM) を混合して置いた基質を用いて、基質  $\text{suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$  の反応速度定数を求めた ( $40^\circ\text{C}$ , pH 7.5, HEPES 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  20  $\mu\text{M}$ )。野生型酵素においても同様の測定を行い、得られた反応速度定数を Table-VI-5 に示した。

野生型酵素においては Cu の存在・非存在に関係なく、反応速度定数は同じ値を示した。変異型酵素においては、Cu の存在により  $V_{\max}$  値の低下が起きたが、 $K_M$  値はほぼ同じであった。見かけ上は非競争阻害であるが、金属イオンによる阻害は基質結合部位をめぐって基質に対して競争的に作用すると考えられるため、Cu による活性阻害は S S I と同様に酵素に対して見かけ上「不可逆的」に作用することがわかった。

### 2. 阻害定数の測定

Cu による活性阻害効果は見かけ上、「不可逆的」競争阻害であった。そこでタンパク性プロテアーゼ・インヒビター S S I と同じ測定方法を用いて、2 種の 2 価金属 Cu, Zn の阻害定数を求めた (第 III 章参照)。

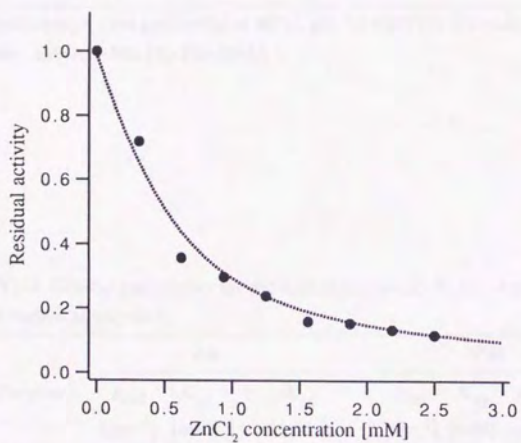
基質  $\text{suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}$  を用い (Table-VI-2 参照)、 $40^\circ\text{C}$ , pH 7.5 にて求めた阻害定数の値を Table-VI-6 に示した。また、Zn を用いた場合の阻害曲線を Fig-VI-5 に示した。

Zn, Cu の阻害定数は 100  $\mu\text{M}$  程度で、トリペプチド基質の  $K_M$  値と同程度の結合の強さを示した。

**Table-VI-5.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA by wild/mutant aqualysin I, with/without CuSO<sub>4</sub>.

CuSO <sub>4</sub> [mM]	mutant			wild type		
	<i>k</i> <sub>cat</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	<i>K</i> <sub>M</sub> [mM]	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>M</sub> [sec <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	<i>k</i> <sub>cat</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	<i>K</i> <sub>M</sub> [mM]	<i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>M</sub> [sec <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
0	3.52	0.31	1.12 x 10 <sup>4</sup>	15.8	0.41	3.85 x 10 <sup>4</sup>
0.2	1.05	0.22	4.83 x 10 <sup>3</sup>	15.3	0.40	3.85 x 10 <sup>4</sup>

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 μM)



**Fig-VI-5.** Residual activity plotted against Zn concentration. Markers are measured values, and dot line represents for theoretical value calculated from the parameters.

**Table-VI-6.** Inhibition constant of divalent cation (Cu, Zn) toward mutant aqualysin I.

Metal	$K_i$ [M]
ZnCl <sub>2</sub>	1.1 x10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub>	9.5 x10 <sup>-5</sup>

Proteolytic assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)  
(substrate : suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA)

**Table-VI-7.** Kinetic parameters for the hydrolysis of suc-X-Ala-Ala-pNA (X=Ala, Phe) by wild/mutant aqualysin I.

Enzyme	Ala			Phe		
	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [sec <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$k_{cat}/K_M$ [sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
wild	1.2	1.1	1.1	11	0.044	250
mutant	0.43	4.7	0.01	3.0	0.089	33

Assays were performed at 40°C, pH 7.5 (HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)

### P 3 特異性の測定

P 3 部位の異なる 2 種の基質  $\text{suc}\cdot\text{X}\cdot\text{Ala}\cdot\text{Ala}\cdot\text{pNA}$  ( $\text{X} = \text{Ala}, \text{Phe}$ ) に対する反応速度定数を Table-VI-7 に示した。

この変異型酵素の S 3 部位は Phe 嗜好型であり、野生型酵素と同じ性質を示した。変異の導入による P 3 特異性への影響は小さかった。

### His 残基を利用した活性制御の他の実例

Trypsin 型酵素の chymotrypsin において活性中心の His 残基を利用した活性の制御が、1つ実例としてある (Higaki *et al.* 1990)。この例では、類縁酵素の一次配列の相同性と chymotrypsin 自身の立体構造を用いてモデリングしている。活性制御機構は、活性中心の近傍に導入された1つの His 残基と、活性中心の His 残基とを Cu イオンにより配位結合させることにより、活性中心の His 残基の側鎖の向きを変更させ、触媒能の低下をもたらすことによる。His 残基を導入した部位は、立体構造でのモデリングにより選定しているが、結果的には、類縁の金属結合タンパクにおける「金属結合モチーフ」と同じ一次構をとっていた。この変異型 chymotrypsin でも、Cu, Zn, Ni 等の金属による活性の低下、EDTA による活性の回復がみられ、金属の結合は Cu, Zn, Ni の順に大きい。

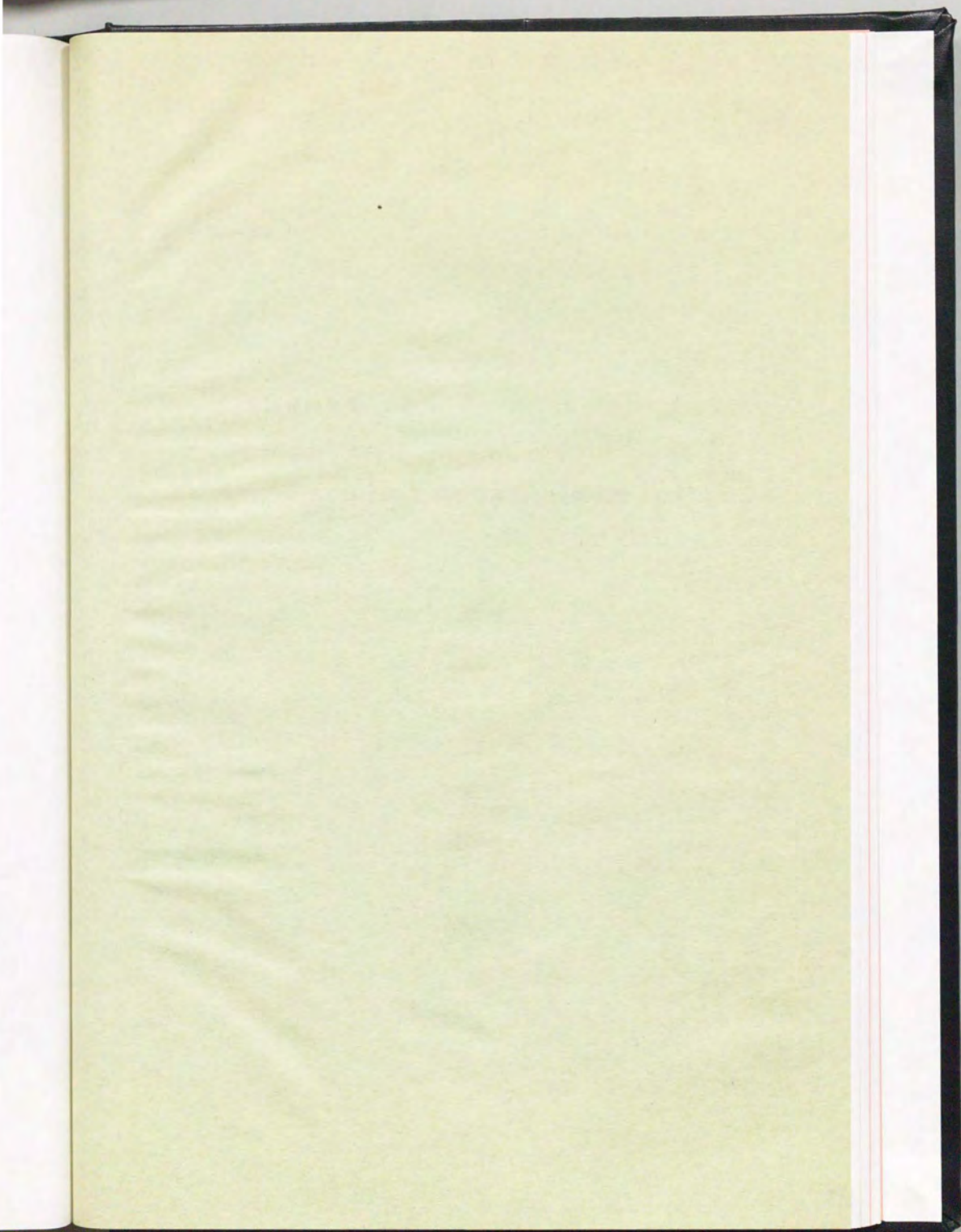


## まとめ

基質結合部位に導入した2つの His 残基は、金属結合部位として機能して Cu や Zn 等の2価金属と結合した。金属との結合により活性は不可逆的に阻害されたが、金属キレーター試薬 EDTA の添加によりその活性は回復した。

このような「メタル・スイッチ」を aqualysin I に導入することに成功した。この「メタル・スイッチ」の特徴は、純粹に立体構造をもとにモデリングすることにより、もともとそのような機能のない部位へ新しい機能を導入したことであり、類縁酵素においても、そのような金属結合部位は存在していなかった。

今回の標的は基質結合部位に限定したが、その理由は subtilisin 型のセリン・プロテアーゼでは、活性中心付近に「金属結合モチーフ」がなく、しかも、活性中心の His 残基の近傍において、もう1つの His 残基を導入する適当な部位が見いだせなかったという消極的理由による。それ以上により積極的な理由は、「可能性への挑戦」である。



## 第VII章

### S-S結合の欠失

と

#### Aqualysin I の活性型自己分解産物 AQN<sup>#</sup>

## 背景

Aqualysin Iは分子内に2対のS-S結合を有する(Cys<sup>67</sup>-Cys<sup>99</sup>, Cys<sup>163</sup>-Cys<sup>194</sup>間に形成されている; Kwon *et al.* 1988)。一次構造の確定している subtilisin 型酵素のうちで分子内にS-S結合を有するのは aqualysin I と proteinase K のみである (proteinase K では Cys<sup>34</sup>-Cys<sup>123</sup>, Cys<sup>178</sup>-Cys<sup>249</sup>)。これら2つの酵素は異なる位置にS-S結合を有する。Proteinase K はややN, C末端よりであり、(推定される) aqualysin Iの位置は基質結合部位(S1, S2部位)近傍である (Fig-VII-1)。

分子内に形成されたS-S結合はタンパク質分子を安定化させることが知られている (Matsumura *et al.* 1989)。一次構造の比較からわかる subtilisin 型酵素における aqualysin Iの特徴はS-S結合の存在である。既に第I章でみたように、subtilisin 型酵素との比較において aqualysin Iは高い熱安定性を有し、加えて、S-S結合を有するもう1つの酵素 proteinase K とともに高い塩酸グアニジン耐性を示した。これらから考えて、aqualysin IにおけるS-S結合の安定化への寄与は、熱力学的な研究のよい対象となりうる。類縁酵素の subtilisin においては、分子内にS-S結合を導入することにより、酵素の安定化を向上させる試みがなされている (Mitchinson *et al.* 1989, Wells *et al.* 1986, Katz *et al.* 1986, Pantoliano *et al.* 1987)。

また、proteinase Kと比較して aqualysin IにおけるS-S結合は、2対の結合がそれぞれサブサイトS1, S2部位の近傍に位置しているため、基質との相互作用に対して影響を及ぼしている可能性がある。つまり、S-S結合により構造のゆらぎが抑えられ、酵素・基質結合時における誘導適合 (induced fit) が起きにくくなる可能性である。

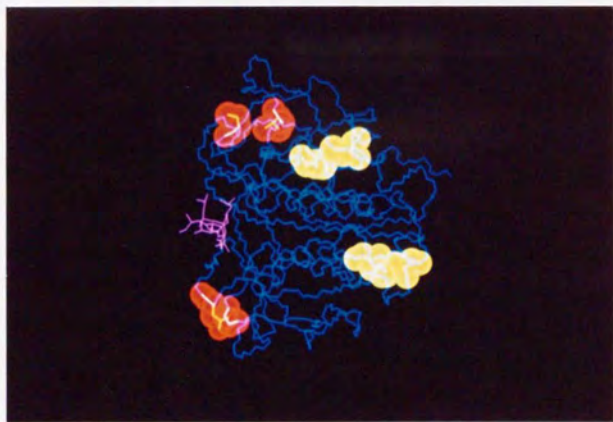
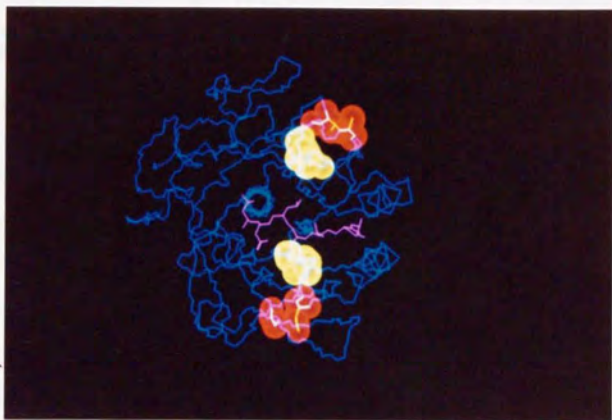


Fig-VII-1. Disulfide bonds of proteinase K( yellow), and deduced position for aqualysin I (red).

以上の2つの動機から、aqualysin Iにおいて、2対あるS-S結合をそれぞれ1対ずつ、または2対とも欠失した変異型酵素を調製し、安定性と構造のゆらぎの解析に用いることを試みた。

### 変異型酵素 AQN $\Delta$ SS の調製

分子内にある4つのCys残基を、S-S結合を形成する2残基ごとの組合せでそれぞれ別のアミノ酸に置換した(2重変異が2つと4重変異が1つ)計3種の変異型酵素を調製した。表記を簡単にするため、次のように変異型酵素の名称を定めた。

名称	変異
AQN $\Delta$ SS-1	Cys <sup>67</sup> $\rightarrow$ Asn, Cys <sup>99</sup> $\rightarrow$ Ala
AQN $\Delta$ SS-2	Cys <sup>163</sup> $\rightarrow$ Ser, Cys <sup>194</sup> $\rightarrow$ Glu
AQN $\Delta$ SS-1,2	Cys <sup>67</sup> $\rightarrow$ Asn, Cys <sup>99</sup> $\rightarrow$ Ala Cys <sup>163</sup> $\rightarrow$ Ser, Cys <sup>194</sup> $\rightarrow$ Glu

これら3種の変異型酵素の発現ベクター(pAQN)の調製、DNA配列上における変異導入の確認、及び、大腸菌(*E.coli* MV1184)におけるタンパクの発現は寺田氏(日本タバコ)の協力を得て行われた後の培養菌体を出発点として、変異型酵素の精製をおこなった。

精製は、まず、菌体を熱処理溶液(Tris $\cdot$ HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 9.0)に懸濁して超音波破碎した後、70 $^{\circ}$ Cで3時間保温して酵素の成熟化をおこなわせた。この熱処理溶液を遠心により不溶画分を除去した後、限外濾過(PC cassette system, 200 kDa用 membrane 使用)で大腸菌の膜画分等の巨大分子を取り除いて、更に、再び限外濾過(5 kDa用 membrane 使用)で脱塩・濃縮をした。この溶液を濾過(0.22  $\mu$ m milipore filter)した後、リン酸緩衝液(Na phosphate 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6.0)で平衡化しておいた

S-SepharoseHP 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。得られた活性画分を、mono-S カラム (FPLC system, Pharmacia) に吸着・溶出させ、更に、高純度化・濃縮を行い、精製標品とした。

#### 活性型自己分解産物 AQN<sup>+</sup> の検出

こうして得た 3 種の S S 結合欠失型酵素において、40℃、pH 7.5 において基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA を用いて活性測定をしたところ (第 II 章参照)、3 種全ての変異型酵素において、測定中に酵素活性の急激な低下が観測された。そこで、残りの精製標品を SDS-PAGE で再び泳動して純度を確認したところ、本来の 28 kDa のバンドの他に 22 kDa 付近にもバンドが出現しているのが確認された。この 22 kDa をバンドを有するタンパクの由来を調べるため、酵素標品に対し、一部を DFP 処理して失活させ、一部は活性のあるまま再び mono S カラムを用いて吸着・溶出させたところ、28 kDa よりも高塩濃度側において溶出してくる、タンパク分解活性をもつタンパクが、この 22 kDa のバンドに対応することがわかった。また、この 22 kDa の位置にバンドを有するタンパクは、28 kDa の aqualysin I 由来であり、28 kDa→22 kDa へと一方向的・不可逆的に移行した。28 kDa→22 kDa の移行は、aqualysin I の活性に依存していて、DFP 投与により 28 kDa を失活させることにより移行はなくなった。また、移行の速さは、リン酸緩衝液 (Na phosphate 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6.0) 中、室温において、酵素濃度が数  $\mu$ M の条件において、1 時間で約半分が 22 kDa に移行した。

この 22 kDa にバンドを有する aqualysin I の自己分解産物は、3 種の変



異型酵素に共通して安定であり、それ以上の自己分解は認められなかったため、mono S カラムを用いて精製し、その性質を調べた。

#### 活性型自己分解産物 AQN<sup>#</sup> の性質

Aqualysin I の自己分解産物 AQN<sup>#</sup> にはタンパク分解活性があり、DFP により失活するセリン酵素であった。そこで、変異型酵素の1つ AQN<sup>#</sup>ΔSS-1 の自己分解産物 AQN<sup>#</sup>ΔSS-1 を用いて、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と、野生型 SSI の阻害定数を測定した(第II、III章参照)。

求めた反応速度定数を、野生型 aqualysin I と比較して以下に示した。

酵素	SSI	suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA		
	$K_i$	$k_{cat}$	$K_M$	$k_{cat}/K_M$
	[ $\times 10^{10}$ M]	[ $\text{sec}^{-1}$ ]	[mM]	[ $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ]
野生型 aqualysin I	3.0	33	1.2	28
AQN <sup>#</sup> ΔSS-1	7.9	3.7	2.3	1.6

テトラペプチド基質の反応速度定数を比較すると、AQN<sup>#</sup>ΔSS-1 の活性は野生型に比べて低いながらも ( $k_{cat}$  値で 1/10) 保持されていた。また、ミカエリス定数や SSI の阻害定数を比べると、野生型酵素とほとんど差はなく、この自己分解産物において基質結合部位、および、活性中心はほぼ完全に保持されていることが推定された。

現段階では、この自己分解がどの部位で起きているかは不明であり、活性低下の原因や、なぜSS結合欠失により自己分解が加速したのかを考える具体的な根拠はない。しかし、aqualysin Iにおいて、SS結合が安定性に寄与しているのは確かなようである。



第VIII章

活性中心の改変

## 背景と目的

subtilisin 型、 および trypsin 型のセリン・プロテアーゼは、 古くは「charge relay system」、最近では「catalytic triad」と呼ばれる3つのアミノ酸残基 (Ser, His, Asp) から構成される触媒中心により活性を発揮している。ペプチドの加水分解過程において直接アシル化されるSer残基だけでなく、His 残基や Asp 残基も大きな役割を果たしている。

subtilisin 型のプロテアーゼでは、活性中心残基のうちの2残基HisとAsp残基は、基質結合部位のS2部位に面していて、これらの残基が基質特異性に影響を与えている可能性がある。

subtilisin BPN' を用いた実験報告では、活性中心のHis残基をAla残基に置換し、基質のHis残基 (P2部位に位置する) を利用して、再びセリン・プロテアーゼの活性を回復させることに成功しているが (Carter et al. 1987, 1991)、この実験結果は、基質のアミノ酸残基を利用した活性中心の再構成が可能であることの他に、活性中心の His 残基がP2特異性に関与できる位置に存在していることを示唆している。

トリペプチド基質を用いた基質特異性の解析 (第II章参照) によると、aqualysin I を含めて subtilisin 型酵素は、大きな側鎖を有するアミノ酸残基を好まないというP2特異性を示していたが、このことはS2部位の「ポケット」の空間の体積と対応していると考えられる。

そこで、S2部位の空間を拡大し、P2特異性を改変することを目標にそえて、活性中心を構成するHis残基をS2部位から取り除き、他の部位に新しく活性中心を組むことを企画した。

## モデリング

類縁酵素 subtilisin Carlsberg および proteinase K の立体構造をモデルとして用いて、活性中心の Ser 残基に隣接する残基すべてに対してアミノ酸残基置換のシミュレーションをおこない、既存の Ser 残基と共に新しい活性中心を構成する候補残基を選定した。モデルとして2つの subtilisin 型酵素を用いたが、subtilisin Carlsberg と proteinase K とでは、活性中心近傍の残基の立体配置が異なっていたため、それぞれの酵素において適当と思われる残基の組合せを選び、aqualysin I において対応する残基を置換した。

選定したアミノ酸残基置換の候補を次に示した。

候補	置換
候補-1	Ala <sup>154</sup> → His, Ser <sup>128</sup> → Asp
候補-2	Ser <sup>128</sup> → His, Ala <sup>154</sup> → Asp
候補-3	Ser <sup>128</sup> → His, Val <sup>74</sup> → Asp

この残基置換の候補に対して、それぞれ活性中心の His 残基を Ala 残基に置換する変異を更に加えた計6種の変異型酵素を調製することにした。

6種の変異型酵素の略号を次のように定めた。

略号	変異
AQN_cat-1	(候補-1) と同じ
AQN_cat-2	(候補-1) + (His <sup>70</sup> → Ala)
AQN_cat-3	(候補-2) と同じ
AQN_cat-4	(候補-2) + (His <sup>70</sup> → Ala)
AQN_cat-5	(候補-3) と同じ
AQN_cat-6	(候補-3) + (His <sup>70</sup> → Ala)

## 変異型酵素の調製

### 1. 変異の導入と発現ベクターの調製 (手順を Fig-VIII-1 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 BamHI-XbaI 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-VIII-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 BamHI-XbaI 断片を、ベクター pAQN $\Delta$ 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。

6 種の変異型酵素のうち、最終的に 4 種の変異型酵素 (AQN\_cat-1, 2, 4, 5) の発現ベクターを得、タンパク質の発現に用いた。

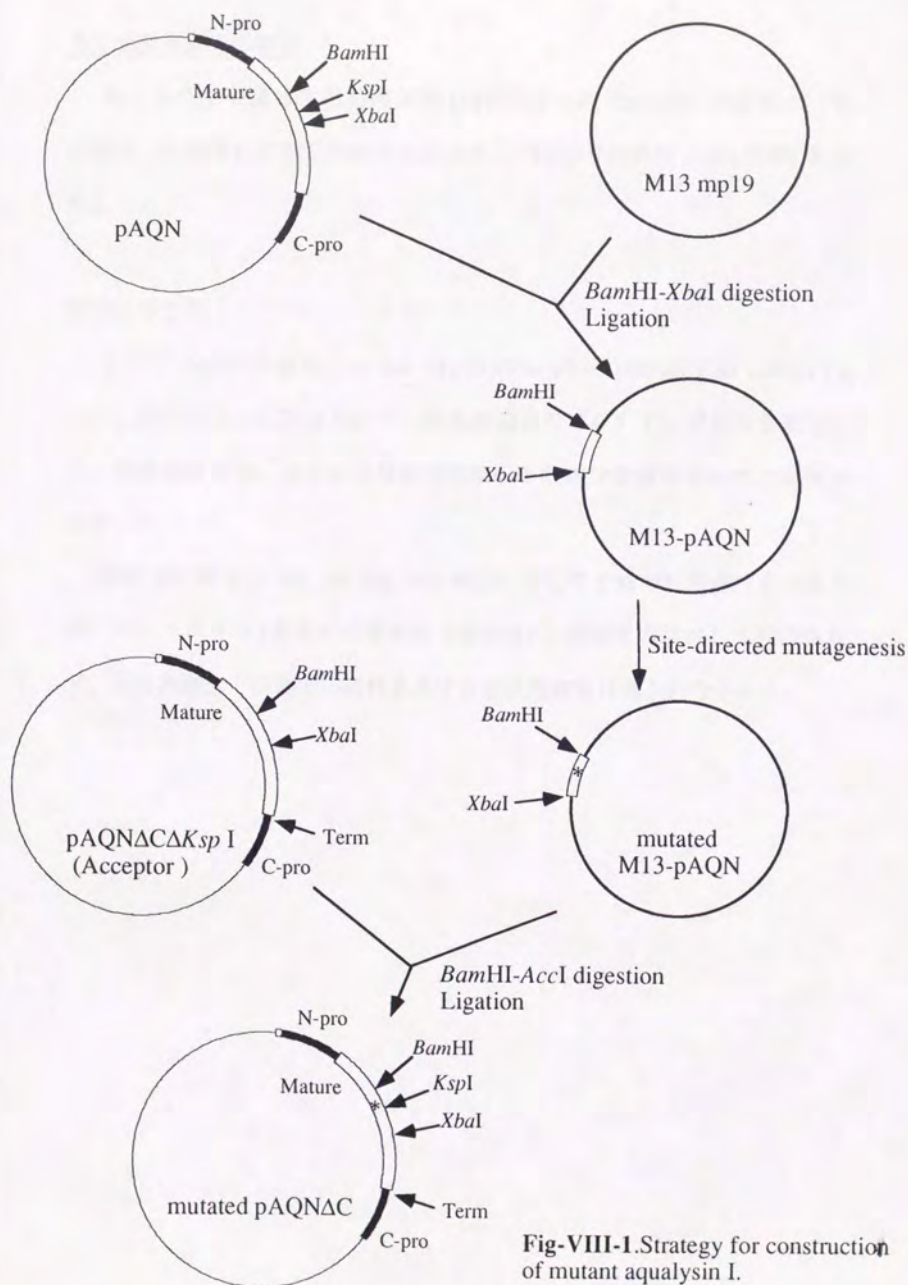
### 2. 変異型酵素の生産・発現

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換した。菌は 37℃、アンピシリン存在下 (100  $\mu$ 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  $A_{660}$  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、3 時間培養してから遠心 (5 k rpm, 10 min) により集菌した。

**Table-VIII-1.** Oligonucleotide sequences of mutagenic primers

mutation	Res.enz.	Oligonucleotide sequences
H70A	---	GAC TGC AAC GGC GCT GGT ACC CAT GTG GCG
V74D	---	CAC GGG ACC CAT GAC GCG GGA ACG ATC
S128H	---	GTT GCC AAC ATG CAC TTA GGA GGC GGA
S128D	---	GTT GCC AAC ATG GAC TTA GGA GGC GGA
A154H	<i>SphI</i>	GTC TAC GCT GTG CAT GCG GGG AAC GAC
A154D	<i>SalI</i>	GTC TAC GCT GTC GAT GCG GGG AAC GAC





**Fig-VIII-1.** Strategy for construction of mutant aqualysin I.

### 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,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, NaCl 1%, pH8.5) に懸濁して超音波破碎したのち、70℃で熱処理 (100 時間) をした。

#### 粗活性の測定

テトラペプチド基質 suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (HEPES 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7.5 at 40℃) を用いて、熱処理溶液のプロテアーゼ活性を測定した。熱処理溶液は、遠心により菌体由来の不溶画分を取り除いた上清画分を用いた。

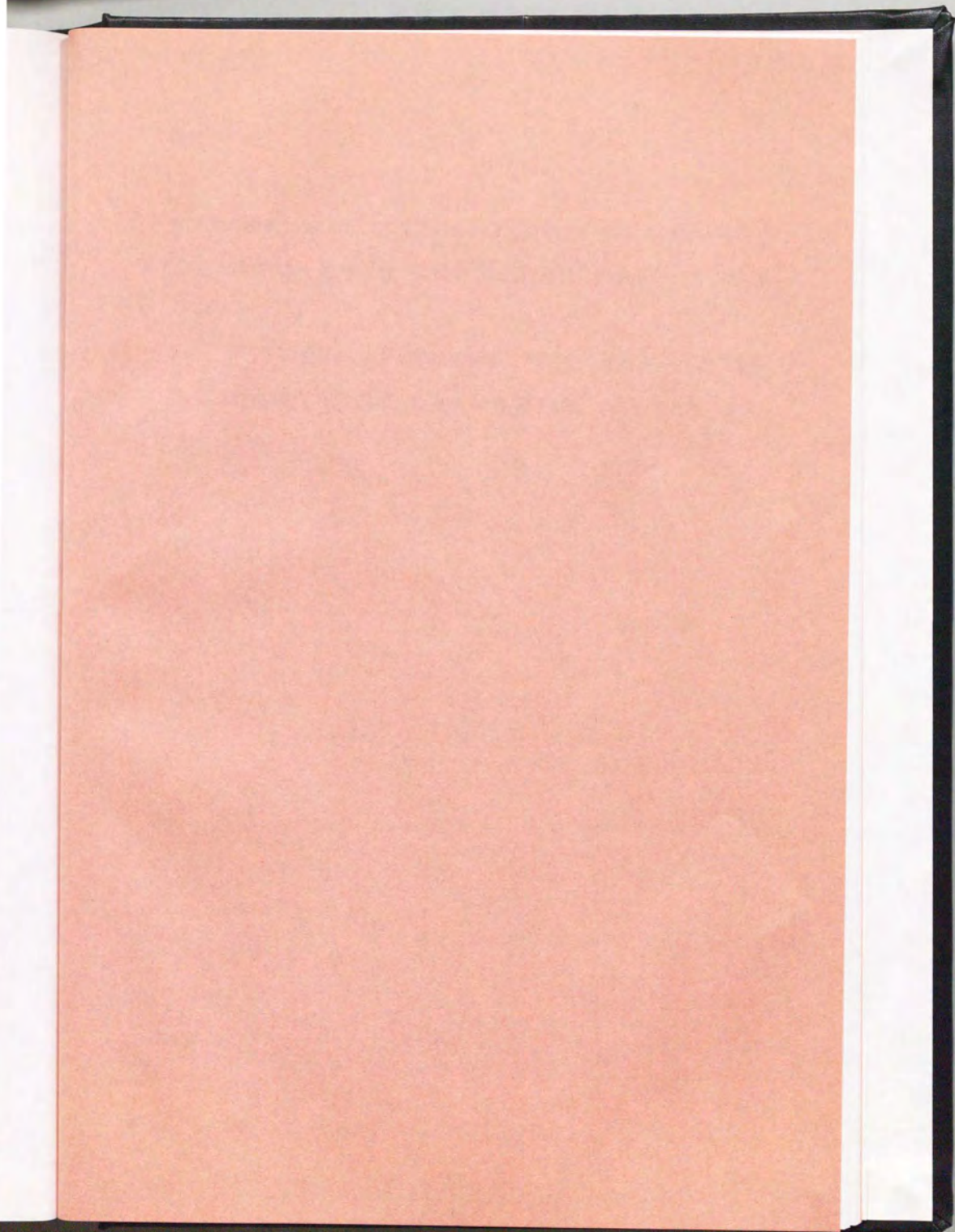
熱処理時間 2, 5, 10, 20, 50, 100 時間に対してそれぞれ粗活性を求めたが、コントロール (基質の非酵素的分解速度) と同程度の活性しか検出されず、野生型酵素と同程度の活性を有する変異型酵素は得られなかった。

## まとめ

aqualysin I の活性発現には、タンパク質の folding が野生型酵素と同様に進行すると仮定した場合、成熟体酵素が活性を有していることと、前駆体として生産された酵素が成熟化することが必要である。酵素の成熟化には、酵素活性が要求されるため (Lee *et al.* 1988)、調製した4種の変異型酵素は結局、folding がうまく進行していないか、活性を有していないと推定される (熱処理溶液の SDS-PAGE はおこなっていないため、タンパク質がきちんと生産されているかは未確認である)。いずれの理由にせよ、「活性型」の変異型酵素は得られておらず、活性中心の改変の試みは失敗に終わった。

## *References*

- Carter,P., Abrahmsén,L., Wells,J.A., (1991) *Biochemistry*, **30**, 6142-6148
- Carter,P., Wells,J.A., (1987) *Science*, **237**, 394-399
- Higaki,J.N., Haymore,B.L., Chen,S., Fletterick,R.J., Craik,C.S.,  
(1990) *Biochemistry*, **29**, 8582-8586
- Katz,B.A., Kossiakoff,A., (1986) *J.Biol.Chem.*, **261**, 6564-6570
- Matsumura,M., Matthews,B., (1989) *Science*, **243**, 792-794
- Mitchinson,C., Wells,J.A., (1989) *Biochemistry*, **28**, 4807-4815
- Patoliano,M.W., Ladner,R.C., Bryan,P.N., Rollence,M.L., Wood,J.F., Poulos,T.L.,  
(1987) *Biochemistry*, **26**, 2077-2082



## 謝辞

本論文の研究において、私個人のわがままを許し、学習と研究の場を与えてくださった太田 隆久 教授、並びに松沢 洋 助教授にこの場を借りてお礼を申し上げます。

また、データの解析において種々の示唆を与えてくれた小出 昌平 博士と、DNA 操作技術を指導してくれた李 泳春 博士に、この場でお礼を申し上げます。

## 論文内容要旨

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

### 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

微生物由来のセリンプロテアーゼの中には subtilisin に代表される、分子量3万程度の一団の酵素があり、いずれも広い基質特異性を有することが知られている。これらの酵素には主として動物由来の trypsin 型酵素と同様に詳細な立体構造の解析がなされているものが多く、触媒反応機構の解析を始めとして、広くタンパク質工学の対象として扱われ、多くの研究がなされている。

本研究では、高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* YT-1 の生産する subtilisin 型酵素アクアライシン I (aqualysin I) を材料として用いて、基質特異性の解析とタンパク質工学的手法による基質特異性の改変、そして活性の制御スイッチの導入をおこなった。耐熱性の本酵素において基質特異性の改変を行うことは、産業面・研究面の両方において有用なことであり、広い応用が期待できる。

#### 第1部 基質特異性の解析

##### (1) トリペプチド基質による P1・P2・P3 特異性の解析

aqualysin I は、基質における切断部位より N 末端側の 3 残基 (P1~P3 残基) を主に認識して基質を加水分解する。そこで、切断部位の C 末端側にある P1' 部位に発色団 (*p*-nitroaniline) を有するトリペプチド基質を用いて、野生型 aqualysin I の疎水性アミノ酸残基に対する基質特異性を解析した (40°C, pH7.5)。S1 部位は、Phe や Ala 残基嗜好性を示し、Val や Leu 残基では触媒効率率は低かった。S2 部位は、Ala 残基嗜好型で非分岐型の Ala や Ile 残基を好み、分岐型の Leu や Val 残基を好まなかった。S3 部位は、Phe 嗜好型であり、疎水性の高い Phe や Ile 残基を好んだ。それぞれのサブサイトにおける特異性は、類縁酵素の proteinase K, subtilisin BPN' とほぼ同一であった。

##### (2) P1 変異型 SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) による P1 特異性の解析

P1 部位を Ala, Leu, Phe, Arg, Asp 残基に置換した変異型 SSI、および野生型 (Met) SSI を用いて阻害定数を測定した。本酵素は subtilisin と同様に SSI と強く結合する。類縁酵素と同様に、疎水性アミノ酸残基を P1 部位に有する場合の特異性は低く、野生型 SSI と同じ程度の阻害定数値を示したが、電荷を有するアミノ酸としては塩基性アミノ酸残基 Arg を好んだ。

これらの測定の結果は、aqualysin I のサブサイト (S1~S3 部位) 毎の基質特異性は類縁酵素の subtilisin, proteinase K と類似していることを示し、基質結合部位のサブサイト S1~S3 部位とその周辺の立体構造の相同性を示唆した。

#### 第2部 基質特異性の改変

subtilisin 型酵素間の立体構造の相同性、及び基質特異性の類似性を背景とし、これら類縁酵素の構造が本酵素の立体構造のモデルとして利用できることがわかった。そこで、S2・S3 部位の 2 つのサブサイトを標的として、P2・P3 特異性の改変をおこなった。

##### (1) P3 特異性の改変

P3 特異性は疎水性の高いアミノ酸残基 Phe に対して高い反応性 (高い  $k_{cat}$  値と低い  $K_M$  値) を示す Phe 嗜好型である。P1・P2 特異性は Ala 嗜好型であるため、P3 特異性を Ala 嗜好型へと改変すべ

ば、aqualysin I は P1-P3 特異性すべてにおいてAla嗜好型となつて "elastase" へと改変される。そこで、subtilisin 等の類縁酵素の立体構造をモデルとして、残基置換および置換導入した側鎖と基質との相互作用のシミュレーションを行った。その結果、基質結合部位の2つの残基 Ser<sup>102</sup>と Gly<sup>131</sup>においてアミノ酸残基置換により側鎖を置換すると、それぞれの部位に導入されたアミノ酸残基側鎖は P3 残基側鎖と同様に溶媒側を向き、側鎖間の相互作用が予測された。シミュレーションで得た予測に従い、Ser<sup>102</sup>を His, Lys, Glu残基に、Gly<sup>131</sup>を His, Lys, Asp にそれぞれ置換した計6種の変異型酵素を調製し、P3 特異性を解析したところ、His残基を導入した2種の変異型酵素 S102H と G131H は Ala 残基嗜好型へと改変された。Lys残基を導入した2種の酵素 S102K と G131K および Glu 残基を導入した S102E の計3種の変異型酵素においても Ala 残基嗜好性は上昇し、P3 特異性の改変に成功した。

#### (2) P2 特異性の改変

類縁酵素の S2 部位は底の浅いポケットを形成し、Ala残基嗜好型の P2 特異性を示す。この P2 特異性を側鎖の更に小さな Gly 残基嗜好型に改変することを企画した。シミュレーションにおいて S2 部位を形成しているアミノ酸残基の1つ Gly<sup>101</sup>を他のアミノ酸残基に置換すると、S2 空間は狭くなり、P2 特異性が Gly 残基嗜好型に改変されることが予測された。シミュレーションで得た予測に従い、この Gly 残基を Ala, Val, Leu 残基に置換した変異型酵素を調製したところ、Gly 残基 (P2) に対する反応性を保持したまま、導入残基が Gly→Ala→Val の順に Ala 残基に対する反応性が低下し、Gly 嗜好性が上昇した。

また、S2 部位にある Asn<sup>68</sup>を構造の類似した疎水性残基 Val に置換して S2 部位の疎水性環境を変えたところ、P2 特異性の Ala 嗜好性は更に高くなった。

### 第3部 「メタル・スイッチ」の導入

類縁酵素との基質特異性の類似、及び類縁酵素をモデルとした基質特異性の改変が本酵素において成功を収めたことにより、本酵素の基質結合部位の立体構造は類縁酵素と類似していることがわかった。本酵素を含めて subtilisin 型酵素には、可逆的な活性の制御因子は存在していない。そこで、モデル酵素の立体構造をもとに、本酵素の活性を制御する「スイッチ」を導入することを企画した。「スイッチ」のモデルとして、His-Cu-His 間の配位結合形成を利用し、基質が酵素へ結合する段階での制御を考えた。すなわち、基質結合部位の溝の両側に2つの His 残基を導入することにより、Cu の存在で閉じ、金属キレーター添加で開く「扉」を付けるというものである。導入した側鎖が溶媒側に向けて伸び、お互いの側鎖が 0.6nm 程度の距離にくることが予測された。基質結合部位 (S3 部位に存在する) の2残基 Ser<sup>102</sup>と Gly<sup>131</sup>とを His 残基に置換した2重変異型酵素を調製した。この変異型酵素は、Cu イオンの添加により活性が低下し、金属キレーター-EDTA の添加によりその活性を回復した。また、Cu の他に Zn, Ni においても活性の障害・回復が認められた。

以上のことから、好熱菌由来のセリンプロテアーゼ aqualysin I の基質特異性、及び基質結合部位の立体構造が、その由来を越えて広く subtilisin 型酵素間において相通的であることがわかった。上述した戦略・手法はすべて subtilisin 型酵素に共通して適応できるものであり、広い応用が期待される。



付録

反応速度定数  $V_{\max}$ ,  $K_M$  の求め方

方法:

最小自乗法による回帰計算 (Least square error calculation by Newton method)

反応様式:

Michaelis-Menten type

$$v = \frac{[S]V_{\max}}{[S]+K_M}$$

ただし、

$$V_{\max} = [E_0]k_{cat}$$

手順:

反応速度  $v$  を 2 変数  $K$  ( $K_M$  の代わり),  $V$  ( $V_{\max}$  の代わり) の関数 (非線形関数) として定義し、それを一次のマクローリン展開により展開する。但し、個々の反応速度  $v_i$  と基質濃度  $s_i$  ( $[S]$  のこと) は定数として扱う。

すなわち、反応式を

$$v_i = \frac{V \cdot s_i}{K + s_i} \equiv f_i(V, K)$$

と定義するとき、 $f_i$  を最適値  $K' = K + \Delta K$ ,  $V' = V + \Delta V$  に対して 1 次展開すると

$$f_i(K', V') \equiv f_i(K, V) + \Delta K \frac{\partial f_i}{\partial K} + \Delta V \frac{\partial f_i}{\partial V}$$

となる。但し、

$$\frac{\partial f_i}{\partial K} = \frac{-V \cdot s_i}{(K + s_i)^2}, \quad \frac{\partial f_i}{\partial V} = \frac{s_i}{K + s_i}$$

このとき、理論値と実測値との誤差  $d_i$  は

$$d_i \equiv v_i f_i(K', V') - v_i f_i(K, V) - \Delta K \frac{\partial f_i}{\partial K} - \Delta V \frac{\partial f_i}{\partial V}$$

に対し  $\Sigma d_i^2$  が最小になるように  $\Delta K$ ,  $\Delta V$  を求める。

結果を示すと

$$D \equiv \left( \Sigma \frac{\partial f_i^2}{\partial K} \right) \left( \Sigma \frac{\partial f_i^2}{\partial V} \right) - \left( \Sigma \frac{\partial f_i}{\partial K} \frac{\partial f_i}{\partial V} \right)^2$$

$$D_K \equiv \left( \Sigma \frac{\partial f_i^2}{\partial V} \right) \left[ \Sigma (v_i - f_i) \frac{\partial f_i}{\partial K} \right] - \left( \Sigma \frac{\partial f_i}{\partial K} \frac{\partial f_i}{\partial V} \right) \left[ \Sigma (v_i - f_i) \frac{\partial f_i}{\partial V} \right]$$

$$D_V \equiv \left( \Sigma \frac{\partial f_i^2}{\partial K} \right) \left[ \Sigma (v_i - f_i) \frac{\partial f_i}{\partial V} \right] - \left( \Sigma \frac{\partial f_i}{\partial K} \frac{\partial f_i}{\partial V} \right) \left[ \Sigma (v_i - f_i) \frac{\partial f_i}{\partial K} \right]$$

とおくとき

$$\Delta K = \frac{D_K}{D}, \quad \Delta V = \frac{D_V}{D}$$

として与えられる。

この操作を数回繰り返して  $K'$ ,  $V'$  を求める。

計算の初期値としては、実測値を用いて Michaelis-Menten 式に代入する。

すなわち

$$D_0 \equiv \left( \Sigma s_i \right) \left( \Sigma s_i v_i \right) - \left( \Sigma v_i \right) \left( \Sigma s_i^2 \right)$$

$$D_{K,0} \equiv \left( \Sigma s_i^2 \right) \left( \Sigma s_i v_i \right) - \left( \Sigma s_i \right) \left( \Sigma s_i^2 v_i \right)$$

$$D_{V,0} \equiv \left( \Sigma s_i v_i \right)^2 - \left( \Sigma v_i \right) \left( \Sigma s_i^2 v_i \right)$$

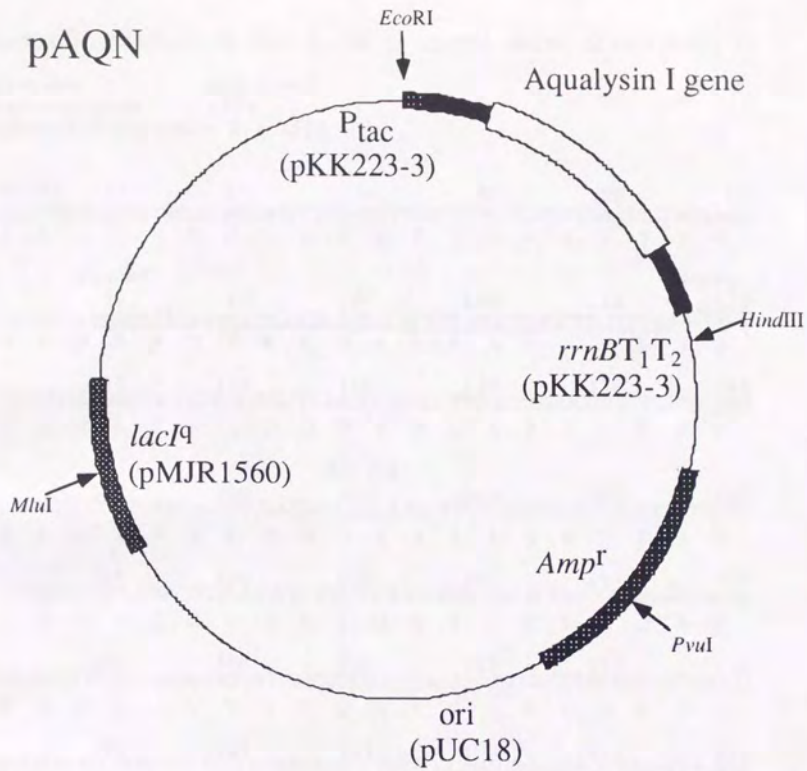
とおくとき、

$$K = \frac{D_{K,0}}{D_0}, \quad V = \frac{D_{V,0}}{D_0}$$

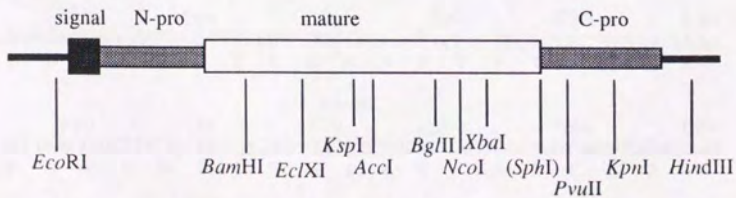
から求めることができる。

実際の計算には、これらの計算手順に従ったアルゴリズムをもととしたプログラムを turbo Pascal 上で作成し、反応速度定数を計算した。

pAQN



Aqualysin I gene



[ GENETYX : TRANSLATION INTO 1- OR 3- LETTER AMINO ACID FORMAT ]

Filename : A01-A.NUC  
Sequence Size : 1934  
Sequence Position : 1 - 1934

EcoRI 10 20 30 40 50 60  
GAATTCCTGCAGGTCGAGGCATCCTTAGGGTTAGCTTTGCCCTCGTGAAATCCACAAG  
E F L Q V E G I L R V S F A L V K S T K

signal N-pro  
70 80 90 100 110 120  
GAGCGTATGAGGAAGACTTATGGCTGATGGCGCTTTTCGCGGTGCTCGTTTTG <sup>GGTGGT</sup>  
E R M R K T Y W L M A L F A V L V L G G

130 140 150 160 170 180  
TGTCAGATGGCCCTCCCGCTCCGATCCAACCCCTACCTTGGCTGAGGCCCTTCTGGCCCAAG  
C Q M A S R S D P T P T L A E A F W P K

AccIII  
190 200 210 220 230 240  
GAGGCTCCCGTCTATGGCCCTGGATGATCCGGGAAAGCTATCCCGGGCCGGTACATGTGGTC  
E A P V Y G L D D P E A I P G R Y I V V

250 260 270 280 290 300  
TTTAAGAAGGGGAAGGGTCACTCTGTCTCCAAGGTGGCATCACAAACCTGCAGGCCACGG  
F K K G K G Q S L L Q G G I T T L Q A R

310 320 330 340 350 360  
CTGGCTCCTCAGGGGGTAGTGGTGACCCAGGCCCTACACGGGCGCCCTCCAGGGATTGCG  
L A P Q G V V V T Q A Y T G A L Q G F A

370 380 390 400 410 420  
GCGGAGATGGCGCCCCAGGCCTTAGAGGCCTTTAGGCAGAGTCCCGACGTGGAGTTCATA  
A E M A P Q A L E A F R Q S P D V E F I

mature  
430 440 450 460 470 480  
GAGGCGGACAAGGTGGTACGGGCCTGGGCTACCCAGAGCCCGGCTCCTTGGGGCCTGGAC  
E A D K V V R A W A T Q S P A P W G L D

490 500 510 520 530 540  
CGGATTGACCAGCGGGACCTTCCCCCTTTCCAACAGCTACACCTACACCGCTACGGGAAGG  
R I D Q R D L P L S N S Y T Y T A T G R

BamHI  
550 560 570 580 590 600  
GGGGTTAACGTCATGTGATTGACACCGGGATCCGCACGACCCACCGGGAGTTCGGCGGG  
G V N V Y V I D T G I R T T H R E F G G

610 620 630 640 650 660  
CGGGCCCGGGTAGGCTATGACGCCTTAGGGGGGAACGGCCAGGACTGCAACGGCCACGGG  
R A R V G Y D A L G G N G Q D C N G H G

PvuI  
670 680 690 700 710 720  
ACCCATGTGGCGGGAACGGATCGGCGGAGTACCTATGGGGTAGCCAAAGCGGTAACTCTC  
T H V A G T I G G V T Y G V A K A V N L

730 740 750 760 770 780  
TACGCTGTGCGGCTCTGGACTGCAACGGTTCGGGCTCCACCTCTGGGGTCATCGCTGGG  
Y A V R V L D C N G S G S T S G V I A G

EclXI  
790 800 810 820 830 840  
GTGGACTGGGTCACGCGGAACACCCGCAAGCCGGCCGTTGCCAACATGAGCTTAGGAGGC  
V D W V T R N H R R P A V A N M S L G G

KspI AccI  
850 860 870 880 890 900  
GGAGTCTCCACTGCCTGGACAACGCCGTGAAGAATCCATCGCCCGGGAGTGGTCTAC  
G V S T A L D N A V K N S I A A G V V Y

910 920 930 940 950 960  
GCTGTGGTTCGGGGGACGACAACGCCAACGCCCTGCAACTACTCCCCAGCCCGGGTGGCC  
A V A A G N D N A N A C N Y S P A R V A

970 980 990 1000 1010 1020  
GAGGCCCTTACCGTGGGCGCTACCACATCTTCCGACGCCCGTGCCAGCTTCTCCAACCTAC  
E A L T V G A T T S S D A R A S F S N Y

BglII  
1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GGTAGTTGGCTAGATCTCTTCGCCCCGTTGGGGCTTCCATTCCTCGGCGTGGTACACCTCG  
G S C V D L F A P G A S I P S A W Y T S

NcoI, BclI  
1090 1100 1110 1120 1130 1140  
GACACGGCCACCCAGACCCTTAACGGCACCTCCATGGCCACCCCCCATGTGGCCGGGGTG  
D T A T Q T L N G T S M A T P H V A G V

XbaI Eco417III  
1150 1160 1170 1180 1190 1200  
GCTGCTTGATCTAGAGCAAAATCCTTCGGCTACGCGGCCCTCTGTTGCTAGCGCTATC  
A A L Y L E Q N P S A T P A S V A S A I

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
CTCAACGGAGCCACTACGGGGCGGCTTTCGGGGATCGGATCGGGGTCCCCAACCGTCTC  
L N G A T T G R L S G I G S G S P N R L

(pAQN) C-pro PvuII  
1270 1280 1290 1300 1310 1320  
CTTTACTCCCTGCTCTCCTCGGGGAGTGGTCCACAGCCCCCTGTACAGCTGTAGCTAC  
L Y S L L S S G S G S T A P C T S C S Y

(pAQNAC105) C-pro SphI PvuII  
1270 1280 1290 1300 1310 1320  
CTTTACTCCCTGCTCTCCTCGGGGAGTGGTAAATGATAGGCATGCACAGCTGTAGCTAC  
L Y S L L S S G S G \* \* \* ? C T S C S Y

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
TACACGGGCAGCCTTTCGGGTCTGGTGACTATAACTTCCAACCCAACGGCACCTACTAC  
Y T G S L S G P G D Y N F Q P N G T Y Y

KpnI

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
TACAGCCCTGCAGGTACCATAGGGCTGGCTTAGGGGCCCCCGCGAACGGACTTTGAC  
Y S P A G T H R A W L R G P A G T D F D

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
CTCTACCTCTGGCGGTGGGACGGCTCCCGTTGGGTGACCGTGGCTAGCTCTACGGGGCCC  
L Y L W R W D G S R W V T V A S S T G P

1510 1520 1530 1540 1550 1560  
ACCTCGGAGAAAGTCTACGCTACAGCGGAACCTGCTGGCTACTACCTCTGGCGCATCTAC  
T S E E S L S Y S G T A G Y Y L W R I Y

1570 1580 1590 1600 1610 1620  
GCCTATAGCGGCTCGGGGATGTACGAGTTCGGCTCCAGCGCCCCTAGGCGAAGGAGTTC  
A Y S G S G M Y E F W L Q R P \* A K E F

1630 1640 1650 1660 1670 1680  
TTCCCTCCCTGGGAAGCGCCTGGGGGAGGTTTTCCTTTAGCGTCTCGGGAAAGGGCGA  
F L P W E A P G G G F P F S V L G K G R

1690 1700 1710 1720 1730 1740  
GGACCGCTTCCACCTGGAAGACCTGGCCCCCGCGCACGGTGAGGGCGATCCGGCCCC  
G P L P P G R P G P P G A R \* G R S G P

1750 1760 1770 1780 1790 1800  
CCACCTGGTGGCGCGCACCTCGCGGAGGTCCTCAAAGGAGTTCACCGGCACCCCGT  
P P G G G A P R G G G P Q R S S P A P R

1810 1820 1830 1840 1850 1860  
TCACCTCCAGGATCAGCTCGGGCACGCTCCCGCTCGAGGCCCTAAGCCCCGCCCGGT  
S P P G S R R A R L P P R G P \* A P P G

1870 1880 1890 1900 1910 1920  
GGGCGCCCCGCCCGGCACCACCTCCCCACCAGGACCCCGCCCGGGAGGCCAGC  
G P P R P A P P P P G P P P G G R P S

1930  
TCCCGGGCGAGCTC  
S R A S

*For Substrate Preparation*

Solubility of succinyl-Peptide-*p*-nitroanilide

Peptide	M.W.	solubility limit [mM]	for Prep. (mg/ 10 ml)
Phe-Ala-Ala	527.5	0.37	1.9
Phe-Nle-Ala	569.6	0.3	1.7
Phe-Leu-Ala	569.6	0.74	4.2
Phe-Val-Ala	555.6	0.36	2.0
Phe-Val-Leu	597.7	0.63	3.8
Ile-Val-Ala	521.6	1.1	5.7
Ala-Ala-Val	479.5	) 1.5	7.2
Ala-Ala-Ala	451.4	8.0	36.0
Ala-Pro-Ala	477.5	) 0.43	2.1
Ala-Ala-Pro-Phe	624.6	) 3.0	17.0

Buffer ; HEPES (-NaOH) 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.5 (40°C)

