The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	好熱菌 Bacillus stearothermophilus 由来耐熱性中性プロテアーゼに関する研究
Author(s)	高木, 昌宏
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1761
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来耐熱性中性プロテアーゼに関する研究

1989年11月

高木昌宏

好熱菌（Bacillus stearothermophilus）由来耐熱性中性プロテアーゼに関する研究

大阪大学工学部醗酵工学科

高木 昌宏

目次

序論 1

第 1 章 Bacillus stearothermophilus CU21 株由来耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニングと形質発現 6

第1節 緒言 6

第2節 実験材料及び方法 7

第3節 結果 13

1.3.1. 好熱菌を宿主としたプロテアーゼ構造遺伝子のクローニング 13

1.3.2. 小型化によるプラスミドの安定化 15

1.3.3. 組み換えプラスミド保持株によるプロテアーゼ生産性 17

1.3.4. プロテアーゼ構造遺伝子クローン化の証明 18

第4節 考察 21

第5節 要約 22

第 2 章 中性プロテアーゼ遺伝子の構造解析 23

第1節 緒言 23

第2節 実験材料及び方法 24

第3節 結果 27

2.3.1 プロテアーゼ構造遺伝子の位置決定 27

2.3.2. プロテアーゼ遺伝子の塩基配列 28

2.3.3. 菌体外プロテアーゼのN末端アミノ酸配列 28

2.3.4. プロテアーゼ転写開始点の決定 30

第4節 考察 32

第5節 要約 36

第 3 章 中性プロテアーゼ分泌生産におけるプレ-プロ構造の役割 38

第1節 緒言 38

第2節 実験材料及び方法 39

第3節 結果 45

3.3.1. プロテアーゼ遺伝子のプロ構造領域内における
欠失と挿入の影響 45
3.3.2. 変異プラスミド保持株の生産するプロテアーゼの精製 48
3.3.3. プロテアーゼ分泌ベクターによるペニシリナーゼ生産 49
3.3.4. プロテアーゼ遺伝子のin vitro発現 50
第4節 考察 51
第5節 要約 53

第 4 章 蛋白質工学的手法による酵素熱安定性の改変 55
第1節 緒言 55
第2節 実験材料及び方法 56
第3節 結果 59
4.3.1. アミノ酸置換の設計 59
4.3.2. 変異の導入 63
4.3.3. 熱安定性の比較 65
第4節 考察 66
第5節 要約 68

第 5 章 変異酵素における基質特異性の変化
第1節 緒言 69
第2節 実験材料及び方法 69
第3節 結果 72
5.3.1. カゼインを基質とした比活性の比較 72
5.3.2. 可溶性還元リゾチーム、インスリンB鎖及び
インスリンA鎖を基質とした場合の比活性の比較 73
5.3.3. インスリンA鎖を基質とした場合の酵素基質特異性 74
5.3.4. 酵素反応特性の検討 75
第4節 考察 77
第5節 要約 78

総 括 と 展 望　80

参 考 文 献　85

本論文に関連する文献　92

謝 辞　93

序論

1973年 Cohen らは、初の遺伝子クローニング実験に成功した(1)。それ以降、遺伝子クローニング技術は、遺伝子工学の中心技術として医学、理学、農学 および工学の各分野に急速に広まり1970年代後半以後生命科学の進展に大きく寄与してきた。 遺伝子クローニングの技術は、遺伝子発現における種の障壁を越えての生理活性物質の生産に道を開き、 醗酵工業において従来まで蓄積された大量培養技術とあいまって、ヒト成長ホルモンやインスリンをはじめとする各種の付加価値の高い生化学物質の工業生産を可能にした。特定の遺伝子をクローニングすることは、その遺伝子の構造や機能そしてコードされているタンパク質の一次構造(アミノ酸配列)を解析するという基礎面において有効であるばかりでなく、通常培養が困難な植物や動物細胞由来の遺伝子産物を取り扱い易い原核生物を宿主として生産させ得ること、そして遺伝子増幅効果による目的タンパク質の飛躍的な生産性向上が期待できること、といった応用面においても利点を有していることから、現在も多くの遺伝子のクローニングが試みられている。

クローニングに際して、宿主菌として最も良く用いられてきたのは、グラム陰性菌の大腸菌である。 大腸菌は、遺伝的背景が整っている点や形質転換法など遺伝子の取り扱いが簡便であるといった利点を有する反面、パイロジェンのような発熱性リポ多糖を生産することや、内膜と外膜の二重の膜構造を有するために培地中に目的生産物を分泌しないで菌体内に不溶化してしまうといった欠点もある。 一方、従来の醗酵工業においては、アミラーゼ、プロテアーゼ等の工業的に有用な酵素の生産菌としてグラム陽性桿菌のBacillus属細菌がよく用いられている。

Bacillus 属細菌の特徴を以下に列挙すると(2)、

① 土壌中や堆肥の中によく見いだされるグラム陽性の桿菌で栄養分の枯渇に伴って内生胞子を生ずる。

② アミラーゼ、プロテアーゼをはじめ各種の有用酵素を分泌生産し、単一膜より成る単純な膜構造を持っているので分泌タンパク質は、細胞膜透過後、直接培地中へ放出される。

③ 好気的に生育する非感染性の土壌細菌で大腸菌のような発熱性リポ多糖を生産しない。

④ コンピテントセル法、あるいはプロトプラスト法により簡単に形質転換を行うことができる。

これらの特徴は、Bacillus 属細菌が有用酵素の生産菌としてのみならず、遺伝子操作実験における宿主菌としても有用であることを示している。特にタンパク質分泌能を利用した異種タンパク質分泌ベクターを作製することができれば、生産面においてタンパク質精製のステップを簡便なものにすると考えられる。現時点において、Bacillus 属細菌宿主-ベクター系のうち最も研究がよく進んでいるのは枯草菌(Bacillus subtilis) 宿主-ベクター系であるが、それでも主たるプラスミドベクターがpUB110に代表されるようにStaphylococcus aureus由来の高コピー数(1細胞内約40コピー)ベクターか、またはその派生プラスミドに限られており(3)、遺伝子バンクの作製やクローニングした遺伝子の安定な維持と発現の上で問題があった。そこで我々の研究室では、かねてより枯草菌を宿主として使用可能なプラスミドを、好熱菌 (Bacillus stearothermophilus)から分離し、高低両コピー数の派生プラスミドベクターを作製し(4)、また更に好熱菌宿主-ベクター系の研究開発も行ってきた(5)。宿主-ベクター系の充実、特に新たなプラスミドベクターが開発できたことは、多数の有用酵素遺伝子のクローニングが可能になったことは勿論のこと、Bacillus属細菌におけるプラスミド複製機構(6,7,8)、タンパク質分泌機構(9,10)さらには遺伝子発現制御機構の解明(11,12)に役立ち、種々の基礎的な知見を得ることができた。またプラスミドベクターのうちでも、特に低コピー数ベクターを利用することは、組み換え遺伝子の効率良い構築と、安定な維持発現に非常に有効な手段となった(13,14,15)。

Bacillus 属細菌のうちの、なかでも好熱性 Bacillus 属細菌の分泌酵素、及びその構造遺伝子を研究の対象とすれば、好熱性細菌の生産する酵素は一般に熱に対する安定性が高いので、その研究の過程において酵素熱安定化機構ならびに高温環境下における遺伝子発現の特徴に関する知見も得ることができると考えられる。また好熱菌宿主-ベクター系を用いて遺伝子組み換え体の培養を行えば、宿主菌が常温で生育しないため安全性が高いこと、雑菌汚染の頻度が低くなること、大量培養において冷却水量を軽減できることなどの利点を工業的に応用できる可能性も大きい(16)。

これら遺伝子クローニングの技術と並行してDNAを化学合成する技術も進歩して

きた。 すなわち、初期のジエステル法に始まり、1970年代のトリエステル法(17)、そして現在では主に自動合成装置に用いられているホスファイト法(18)によって合成されている。この方法は、活性な 3'-亜リン酸誘導体を5'-水酸基と反応させた後、酸化してリン酸トリエステルとする方法で、この方法によって長鎖のオリゴヌクレオチドを合成することが可能になった。 1982年にWinterとFershtらは、化学合成したDNAを用いてタンパク質の任意の位置で任意のアミノ酸置換を導入し、 B. stearothermophilus由来の酵素であるチロシンtRNA合成酵素の基質親和性を変化させ得ることを示した(19)。 翌 1983年 K. Ulmerは、タンパク質の分子構造とその機能との相関を背景として、一定の設計基準に基づいて分子の改変を行い、タンパク質機能を人為的に改良する技術を、タンパク質工学 (Protein engineering)という新たな学問領域として体系づけた(20)。

タンパク質工学の基本的手順としては、 ①目的遺伝子のクローニング ②塩基配列およびアミノ酸配列の決定 ③変異部位の決定 ④遺伝子構造の改変（部位特異的突然変異） ⑤タンパク質分子の物性改変の確認 があげられる(21)。

この手法を用いることにより、それまでの化学修飾等の手法と異なりタンパク質の構造と機能の相関をより直接的に証明することができるようになったと同時に、タンパク質機能をより良い方向へ改変し得るようになった。 タンパク質工学によって改変し得る酵素の特性としては、 ①熱安定性 ②酵素活性 ③基質特異性 ④プロテアーゼに対する耐性⑤最適ｐＨ ⑥非水溶媒中での安定性 と更には ⑦新しい機能の付加 などが考えられる。

しかしながら、遺伝子操作の技術としてのアミノ酸置換法は確立されているものの、その置換とタンパク質構造や機能との相関を予測することは現時点では困難であり、一定の設計基準にしたがって変異を導入すると言うよりはむしろ、試行錯誤の段階である。この原因として考えられるのは、構造－機能相関に関わるタンパク質構造の情報が不足していることが挙げられる。 プロテインデータバンク(Brookheaven National Laboratory) に登録されている立体構造が明らかになったタンパク質の数は約320個であるが、この数は、例えば大腸菌が約3500種類のタンパク質を合成することから考えると非常に少ないと言えよう。従って蛋白質工学はまだその発展の端緒についたばかりの学問領域であるが、部位特異的変異操作を中心とした遺伝子工学、基質との親和性や反応速度論に関わる酵素学、タンパク質の立体構

造決定に関わる生物物理学および、最新のコンピューターグラフィクスや構造予測等に関わる情報工学などさまざまの学問領域との協同のうえで今後一層発展する可能性を秘めていると言える。

本研究では、代表的な好熱性 Bacillus属細菌である B. stearothermophilus由来の耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子を材料として酵素構造遺伝子の特徴解明並びに酵素機能のうち特に熱安定性の蛋白質工学的改変を試みること、そしてその過程において必要な基礎的知見を得ることを目的とした。研究の対象としてもちいたプロテアーゼは、活性の評価が簡便なこと、熱安定性が高いこと、菌体外に分泌されること、および酵素学的に研究が進んでいること、などの利点を有している工業的にも有用な酵素で、医薬品、食品工業において広く利用されている。

以下にその研究の概要を述べる。

まず第1章においては、好熱菌（Bacillus stearothermophilus）宿主ベクター系を用いて耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニングを試み、好熱菌(B. stearothermophilus)および枯草菌(B. subtilis)の両宿主において、同プロテアーゼの菌体外分泌発現を行わせた。またそれぞれの宿主由来のクローニング株の生産する酵素を精製し、その諸性質を検討することによりクローニングした遺伝子がプロテアーゼ構造遺伝子であることの証明を行った。

第2章では、クローニングした構造遺伝子の全塩基配列を決定し、 コードするアミノ酸配列を明らかにした。また、組み換え体の生産するプロテアーゼを精製しアミノ末端のアミノ酸配列を決定し菌体外に酵素が分泌される際に取り除かれる前駆体領域の一次構造を明らかにした。また、コドンの使用頻度を、他の塩基配列が報告されている常温菌由来のプロテアーゼ遺伝子と比較して、高温環境下での遺伝子発現の特徴について調べた。さらに、プロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域をS1-マッピング法により決定し、他のBacillus属細菌のプロモーター配列との比較によりプロテアーゼ遺伝子の発現機構について考察を行った。

第3章では、プロテアーゼ前駆体タンパク質のN末端領域に存在するペプチド領域（プレ-プロ構造領域）の役割について、プレ-プロ構造内にアミノ酸の挿入および欠失を導入することによりプロテアーゼ分泌能の変化を解析した。次に、プロテアーゼ構造遺伝子の前駆体領域を利用してN末端からの長さの異なった3種類の分泌ベクターを作製し、分泌装置下流に、異種タンパク質（ペニシリナーゼ）をコー

ドする遺伝子の成熟タンパク質領域をフレームの合うかたちで挿入してタンパク質分泌生産能についての解析を行った。

第４章において、一定の判断基準に従った熱安定性向上を目的としたタンパク質の分子設計を試みた。活性を失うことなく熱安定性を増大させるために以下の基準を設定した。①起源の異なる同種酵素についてアミノ酸配列を比較し活性発現に必須の領域を限定し、そのアミノ酸残基は置換しない。②耐熱性酵素に特徴的なアミノ酸置換の出現頻度を統計的に処理したデータを利用し、熱安定性に寄与する度合の高いアミノ酸置換を選択する。③本酵素タンパク質と８５％の相同性を有するB. thermoproteolyticus由来の耐熱性プロテアーゼの三次元構造のデータを参考にする。これらの基準に沿って変異部位と置換するアミノ酸残基とを決定した。三種類のアミノ酸置換を行いまた二重、三重変異体も作製し、計画的に熱安定性を向上させたり、また逆に低下させたりすることができた。

第５章では、前章で作製した変異酵素のうち熱安定性の向上した酵素（M1:Gly 144→Ala)について、その酵素比活性を異なった基質を用いて測定し、酵素活性とアミノ酸置換との関係について調べた。更に合成オリゴペプチドを基質として使用することにより、ミカエリス-メンテン定数(Km)及びターンオーバー数(kcat)を、変異酵素M1と野生型酵素WTのそれぞれについて測定し、アミノ酸置換が基質との親和性ではなく触媒活性に影響していることを明らかにした。

最後に、本研究で明らかとなった結果を総括して、今後解決すべき問題点とともにプロテアーゼを中心にして、①酵素生産と②酵素改変の二つの視点から今後の研究の展望についてまとめた。

第１章　Bacillus stearothermophilus CU21株由来耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニングと形質発現

第１節 緒言

好熱菌(Bacillus stearothermophilus)宿主-ベクター系が Imanakaらによって既に構築されている(5)。　好熱性細菌の生産する酵素は一般に熱安定性が高く酵素工学的にも応用範囲が広いと考えられており(16)、また好熱性細菌の特徴である増殖速度の速い点や、タンパク質分泌能が高い点などを遺伝子操作における宿主菌として最大限に生かすためには、好熱菌由来の菌体外酵素遺伝子を好熱菌を宿主としてセルフクローニングすることが望ましいと言える。　しかし細菌の生産する酵素の多くは誘導酵素であり染色体上には酵素構造遺伝子のみならず種々の制御遺伝子も存在しており、たとえば枯草菌（Bacillus subtilis)の菌体外中性プロテアーゼの場合には、酵素構造遺伝子である nprE(22) 以外にも、nprR1(23), nprR2(23), papM(24),degQ(25),および degU(26)などの各種制御遺伝子の存在が報告されている。 従って遺伝子クローニングに際してはクローニングした遺伝子が酵素生産に関係した制御遺伝子ではなく構造遺伝子であることを証明することが重要なステップとなる。　実際、組み換えプラスミドを常温菌の宿主に移入した場合、その形質転換体が元株(B. stearothermophilus)と同じ性質の熱安定性酵素を生産すれば、クローニングした遺伝子が酵素構造遺伝子であると証明することができる。

ここでは、醸造工業、洗剤、消化剤、消炎酵素剤、および食品工業において広く用いられている代表的な酵素であるプロテアーゼについて、好熱菌宿主-ベクター系をもちいてセルフクローニングしクローニングした遺伝子を好熱菌（B. stearothermophilus)ならびに常温菌である枯草菌（B. subtilis）の両宿主内で発現させ、それぞれの場合について酵素の諸性質を明らかにしてクローニングした遺伝子が酵素構造遺伝子であることを証明した。

第2節 実験材料及び方法

使用菌株とプラスミド

使用した菌株とプラスミドを表 1-1 に示した。

表 1-1 使用菌株およびプラスミド

菌株	特性	由来
B.stearothermophilus		
CU21	Sm^r, Npr^+	(5)
MO-3	Sm^r, Npr^-	CU21株のNTG処理
B. subtilis		
MI113	arg-15 trpC2 hsrM hsmM	(4)
MI114	trpC2 leuC7 hsrM hsmM	(4)
MT-1	arg-15 trpC2 hsrM hsmM Npr^-	MI113株のNTG処理
MT-2	trpC2 leuC7 hsrM hsmM Npr^-	MT-1株DNAによるMI114株の形質転換

プラスミド	特性	由来
pTB90	6.7MDa Km^r Tc^r	(5)

Sm^r: ストレプトマイシン耐性

NTG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン

耐熱性中性プロテアーゼを生産する B. stearothermophilus CU21株を遺伝子供与菌として使用し、このCU21株をNTG 処理して得たプロテアーゼ非生産株 B. stearothermophilus MO-3株をショットガンクローニングの宿主菌として使用した。B.subtilis MI113株をNTG処理して得たプロテアーゼ非生産株が MT-1 株である。このMT-1株は、コンピテントセル法による形質転換ができなかったために、MT-1株の染色体DNAによりB. subtilis MI114株をコンピテントセル法で形質転換して得たプロテアーゼ非生産株が、B. subtilis MT-2株である。このMT-2株は、プラスミド

DNAで形質転換が可能であった。

培地

B. stearothermophilus及びB. subtilis用の完全培地としてL培地（バクトトリプトン 10g，酵母エキス 5g，NaCl 5g/l，NaOHにてpH7.3に調整)を用いた。 L培地にさらに0.25%(w/v)のグルコースを含むものを LG 培地とした。 B. subtilisの最少培地として Spizizen's minimal medium (K_2HPO_4 1.4%，KH_2PO_4 0.6%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.2%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%，クエン酸ナトリウム 0.1%，グルコース 0.5%)を用い、必要に応じてアミノ酸20μg/ml、核酸塩基10μg/mlを添加した。

固形培地として用いる場合には、寒天をB. stearothermophilusでは 2 %、 B. subtilisでは 1.5 % 加えた。プラスミド保持株の培養には、カナマイシン(Km)(5 μg/ml)またはテトラサイクリン(Tc)(25 μg/ml)を添加した。 また、B. stearothermophilusの形質転換を行う場合、LG培地に0.15M スクロースを加えたものをLGS培地として用いた。0.33M スクロース，0.02M $MgCl_2$(別殺菌)，0.02M マレイン酸溶液（pH6.5)を SMM 緩衝液とした。 SMMLG培地は、2倍濃度のSMM緩衝液とLG培地を等量混合することにより調製した。プロトプラストの再生には RGA 寒天培地と RGTA 寒天培地(上層用軟寒天)を用いた。 RGA寒天培地は、(1) 700mlの 2.86% 寒天,1.43% トリプトン，0.71% 酵母エキス，0.71% NaCl，(2) 200mlの 1M スクロース,(3) 50mlの 7% K_2HPO_4，3% KH_2PO_4，(4) 20mlの 25% グルコース，(5) 10mlの 1% カザミノ酸，(6) 10mlの 2M $MgCl_2$，(7) 10mlの 2% 牛血清アルブミン(BSA)[濾過滅菌]をそれぞれ滅菌後、混合して調製した。 RGTA寒天培地の場合には、(1)の寒天濃度を、0.875%とした。

プロテアーゼ生産用の培地としては、YPC培地(酵母エキス 20g，K_2HPO_4 1.4g，KH_2PO_4 0.6g/l，$CaCl_2$ 2mM)を使用した。

変異株の取得

B. stearothermophilus CU21株を 48°C にて対数中期(OD_{660}=0.4)まで振盪培養し、集菌後新鮮なL培地に懸濁した。次にNTGを終濃度20μg/mlになるように添加し48°C 15分間振盪した後、再度集菌洗浄した。 菌体をL培地に懸濁後、48°C 3時間振盪し、NTG処理菌体とした。

B. subtilisの場合37°Cで培養し、トリス-マレイン酸緩衝液(50mM トリス塩基，マレイン酸にてpH6.5に調整)に懸濁しNTGを終濃度100μg/mlになるように添加し37°C 30分間振盪した。それ以外は、B. stearothermophilusの場合と同様である(27)。

DNAの調製

DNAは、TE緩衝液(10mM トリス塩酸塩，0.1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)，pH7.5)に溶解した。またDNAの染色には臭化エチジウム(EtBr) 1% 溶液を使用した。

染色体DNAの調製は WarrickとLederbergの方法を改変して次のように行った。L培地で B.stearothermophilusの場合は 55°C， B. subtilisの場合では 37°C で一晩培養した100ml培養液を遠心集菌後、緩衝液(10mM トリス塩酸塩，1mM EDTA(pH 8.5))で洗浄した。次に 1mg/ml(B. stearothermophilus) 又は 5mg/ml(B. subtilis)のリゾチームを含む 50mMトリス塩酸塩，50mM EDTA，15% スクロース(pH 8.5)液 3mlに懸濁し、氷中(B. stearothermophilus) または 37°C(B. subtilis)で30分放置した。 その後、50mM トリス塩酸塩，50mM EDTA，1% Sarkosyl (pH8.5)液3mlを加えてDNA粗標品として塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配超遠心により精製しTE緩衝液に溶解した(27)。

プラスミドDNAの調製は、BirnboimとDoly(28)のアルカリ抽出法を一部変更して以下のように行った。 薬剤を含むL培地 (5ml)中で55°Cにて約 16h 培養した B. stearothermophilus 培養液(B. subtilisは37 °C培養液) 1 mlをエッペンドルフ遠心管に移して遠心集菌し、得られた菌体を 100μlの 25mM Tris-HCl(pH 7.4)，10mM EDTA，50mM グルコース，2 mg/ml リゾチーム溶液に懸濁し、氷中30分間静置した (B. subtilisの場合はリゾチーム5 mg/mlを含む上述の溶液に懸濁し、37°C 30分 保持した)。 次に 0.1 N NaOH-1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液 200μlを加えて混合した。氷中で5分間保った後 3M 酢酸カリウム(pH 4.8)を 150μl 加えて混合し、氷中15分以上静置後、10,000 × g，5min 遠心分離を行った。遠心上澄液約0.4mlを別のエッペンドルフ遠心管に移し、フェノール:クロロホルム(1:1)溶液を400μl 加えて混合し、水層を抽出した。そこに 2 倍量のエタノールを添加混合して室温にて2分放置した後遠心分離(10,000 × g，5min)によってDNA沈澱を集め、70%のエタノールでリンスの後真空乾燥した。これを100μg/ml RNaseA を含む

35μlのTE緩衝液(10mM トリス塩酸塩，0.1mM EDTA (pH 7.5))に溶かし、37°Cで 30分保温した。 プラスミドDNAを大量調製する場合には、アルカリ抽出法をスケールアップし、得られたDNA 画分を塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配超遠心にかけて精製した後、TE緩衝液に懸濁し4°Cで保存した。

B. stearothermophilus の形質転換

プラスミドによるB. stearothermophilus の形質転換は、Imanakaらの方法(5)に従ってプロトプラスト法により行った。

1．プロトプラストの調製

B. stearothermophilus CU21をＬ培地中55°Cで一夜前培養し、その0.5mlを50mlのＬＧＳ培地に植菌し55°Cにて振盪培養を行った。OD_{660}の値が 0.4付近になった時点で遠心集菌し(8,000 × g，5分，4 °C)、2.5mlの SMMLG培地に懸濁した。SMMLG 培地に溶解したリゾチーム溶液を終濃度 1μg/mlとなるように加え、48 °Cで約20分穏やかに振盪した。プロトプラスト化の進行状況は、適宜顕微鏡観察により追跡した。生じたプロトプラストを 4,000 × g，7分 (4°C)の遠心により回収し、2.5mlの SMMLG 培地で洗浄後、再度遠心分離した。これに2.5mlの SMMLG 培地を加えてプロトプラスト懸濁液とした。

2．ポリエチレングリコール処理

約１μg のプラスミドDNAを含む50μlのTE緩衝液に等量の2倍濃度 SMM緩衝液を加えた。 これに0.5mlのプロトプラスト懸濁液(48°Cで保温)を添加後、1.5mlの 40%ポリエチレングリコール6000(PEG)を含む SMM 緩衝液(48°C)を加えて、48°Cで 2分間ゆっくり振盪した。 これに 5mlの SMMLG 培地 (48°C) を加えてPEGを希釈し、4,000×g,10分間 (4°C) の遠心によりプロトプラストを回収した。 沈澱を 0.01% BSAを含む SMMLG 培地 1ml に再懸濁し、48 °C 1.5時間のゆるやかな振盪培養を行った。

3．プロトプラストの再生

プロトプラスト試料を 0.01% BSA を含む SMMLG 培地(48°C)で適当に希釈後、その 0.1ml と 50°Cで保温した RGTA 寒天培地 1mlをRGA 寒天培地に重層した。形質転換株を選択する場合には、RGA，RGTA共に Km 25μg/mlを添加した。また再生は48°Cで 3-5日間行った。

枯草菌（B. subtilis）形質転換法

枯草菌（B. subtilis）の形質転換は、AnagnostopoulosとSpizizenの方法に従ってコンピテントセル法により行った(29)。 5mlの L 培地中で、37°C一晩前培養した培養液1mlを TFI培地(K_2HPO_4 14g, KH_2PO_4 6g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, クエン酸ナトリウム 1g, グルコース 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 要求アミノ酸各 50mg, カザミノ酸 0.2g/l) 20ml に植菌して、37°Cで振盪培養した。 対数増殖期をはずれてから1時間後(植菌後約3.5時間後)に、培養液4mlをTFII培地(要求アミノ酸各 5mg, カザミノ酸0.1g/l, 他はTFIに同じ)36mlに植菌し、1.5時間培養することでコンピテント細胞を得た。コンピテント細胞1mlとDNA(約 1 μg)を混合し、30分間培養した後、5000×g, 5分間 遠心して集菌した。これに 3ml の L培地を加え、37°Cで2時間培養した。この培養液をTc(25μg/ml)を含む L 寒天培地に塗布することによって形質転換体を得た。

プロテアーゼ検定法

・プレート法

B. stearothermophilus及びB. subtilisは、菌体外にプロテアーゼを分泌するため、乳製カゼイン(1%)含有寒天培地上でコロニーを形成させると、その周辺にカゼインの部分分解物(パラカゼイン)の白い円形のハローを生ずる。このハローの有無、大小をプロテアーゼ生産の目安とした。

・活性測定法

2mM $CaCl_2$を含むL-broth中B. stearothermophilusでは55°C、B. subtilisでは37°Cにて対数後期まで培養後、一定時間ごとサンプリングし培養液を遠心(8000×g, 10分)し、上澄液を酵素緩衝液(50mMトリス塩酸塩, 5mM $CaCl_2$, pH7.5)で4°C 2日間透析しプロテアーゼ活性測定に使用した。また菌体は乾燥菌体重量測定に使用した。

プロテアーゼ活性は、Hagihara(30)らの方法に基づいてカゼイン加水分解活性により検定した。酵素緩衝液で透析した酵素標品1mlと基質(酵素緩衝液に溶かした 2%カゼイン) 1mlとを混合撹拌後 37°C 20分間保温した。 その後2mlの反応停止液(0.1M トリクロロ酢酸, 0.22M 酢酸ナトリウム, 0.33M 酢酸)を加えて激しく撹拌

して室温にて30分間静置後、Whatman Filterpaper No.1 直径7.0cmで濾過して、波長275nmにおける濾液の吸光を測定した。

プロテアーゼ活性単位の定義は、37°Cにおいて1分間に1μgのチロシンに相当する可溶性物質を生成させる酵素量を1unitとした。

・精製法

組み換えプラスミドを保持するB. stearothermophilusMO-3株を、カナマイシン(5μg/ml) を含むYPC培地中で48°C一晩培養し、培養液を遠心(8000×g, 10分)し、80%飽和となるように酵素精製用硫酸アンモニウムを上澄液に加えた。生じた沈澱を約20mlの酵素緩衝液に懸濁し同緩衝液に対して透析した。透析後のサンプルを上記緩衝液で平衡化したDEAE-SephadexA25カラム(2 × 80cm)に通した結果、殆どの活性はvoid volume中に存在した。活性のある画分を濃縮しDEAE-SephadexA50カラム(0.9 × 50cm)に通してさらに精製した。タンパク加水分解活性のある画分を酵素標品として、その後の解析に使用した。

組み換えプラスミドを保持するB. subtilisMT-2株の生産するプロテアーゼについても培養温度が42°Cであることを除き上記と同じ方法により酵素標品を得た。

ＳＤＳ-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

酵素の分子量決定には、WeberとOsborn(31)の方法による連続SDSゲルを用いた。ゲル濃度は、7.5%(w/v)ポリアクリルアミドとした。また、酵素タンパク質純度検定には、Laemmliの不連続SDSゲル(32)も用いた。 この場合、分離用ゲル濃度は12.5%(w/v)とした。 電気泳動後、25%(w/v)のTCAで固定し、0.5% クーマジーブリリアントブルーＲで 40 分間染色し、脱色液(25%メタノール, 10%酢酸)で脱色した。分子量マーカーとしては、チトクロームC; 12,500,トリプシンインヒビター; 21,500,牛血清アルブミン(BSA); 68,000, Eschericia coli RNAポリメラーゼ各サブユニット(β';165,000, β;155,000, α;39,000)を用いた。

プロテアーゼの熱安定性測定

酵素緩衝液に溶解したプロテアーゼ(約150 units/ml)を試験管に入れ、65°Cの湯浴中に入れる。一定時間ごとにサンプリングし氷冷水により冷却し残存活性を37°C

で測定した。

最適ｐＨ

緩衝液として0.1Mのリン酸緩衝液pH6.0-8.0を使用した。それぞれのpHに調整したリン酸緩衝液でプロテアーゼ酵素液を希釈(1:100〔v/v〕)し、基質のカゼイン溶液と混合し、各々のpHにおけるプロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ阻害剤の影響

酵素液(30μl)にそれぞれの阻害剤を含む3mlの酵素緩衝液を加え室温で15分間静置した。その後37°Cにおけるカゼイン加水分解活性を測定した。

試薬

カナマイシンとストレプトマイシンは、明治製菓(株)より、アガロース、各種制限酵素、T4DNAリガーゼは、宝酒造(株)より購入した。 DEAE-SephadexA25及びA50は、Pharmacia Fine Chemicalより、バクトトリプトン、酵母エキス、カザミノ酸は、Difco Laboratoriesより、テトラサイクリン、リゾチーム、トリス塩基は、Sigma Chemicalsより、Filter Paper No.1は、Whatmanよりそれぞれ購入した。
その他の試薬は、すべて和光純薬工業(株)より購入した。

第3節　結果

1．3．1．　好熱菌を宿主としたプロテアーゼ構造遺伝子のクローニング

B. stearothermophilus CU21株の染色体DNA（約2μg）と、ベクターであるpTB90(約1μg)を各々制限酵素HindⅢで切断後混合しT4リガーゼ処理した。そのDNAで中性プロテアーゼ欠損株である B. stearothermophilus M0-3株をプロトプラスト法で形質転換し、カナマイシン耐性を示す形質転換体をレプリカ法によって5μg/mlのカナマイシン、1%の乳製カゼインを含むLC寒天培地に移し、55°Cにて一晩培養した(図1-1)。 約100,000株のコロニーについてプレート法でプロテアーゼ生産性を調べた結果、1株のプロテアーゼ生産性を示す株が存在した。 この株は、カナマイシン(5

μg/ml)、テトラサイクリン(25μg/ml)、ストレプトマイシン(250μg/ml)に耐性を示し、カゼイン含有プレート上でB. stearothermophilusCU21(pTB90)よりも大きなハローを形成した。 そこでこのプロテアーゼ生産性を示す株よりプラスミドを抽出しpNP13(Km^r Tc^r Npr$^+$)と命名した。

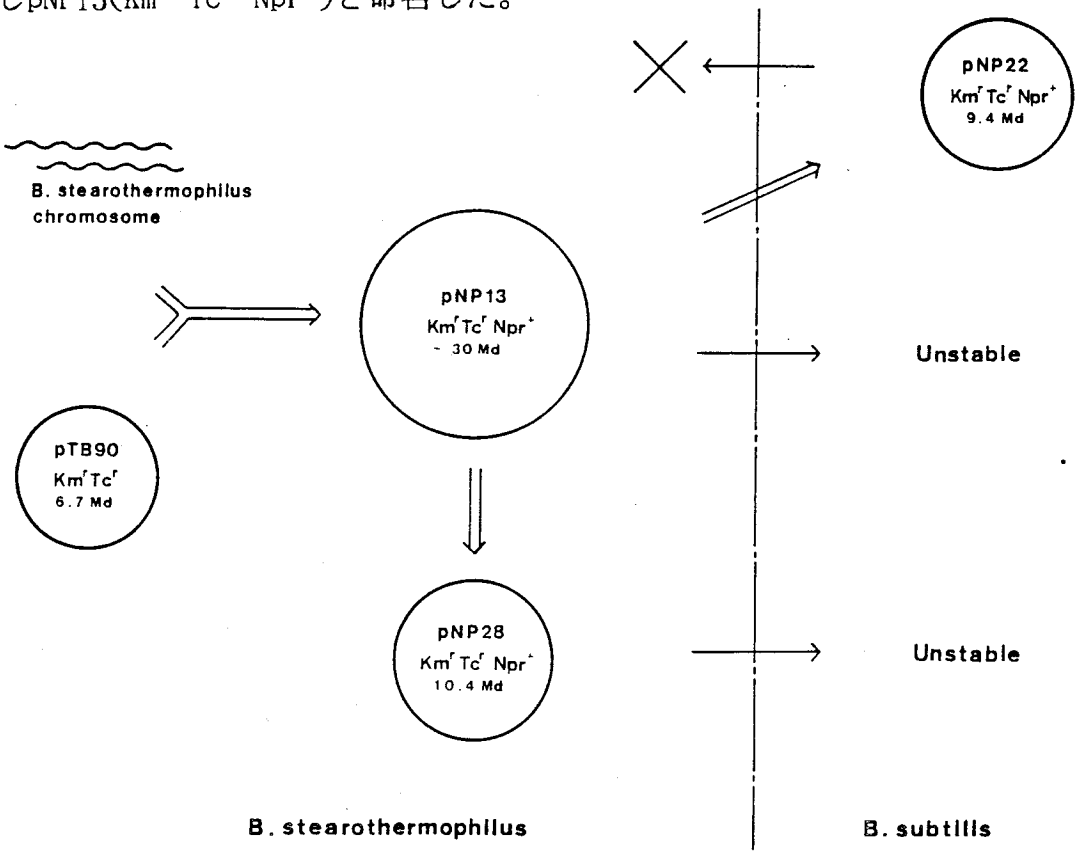


図1-1. ショットガン法による中性プロテアーゼのクローニングと小型化.

プラスミドpNP13を大量調製しB. stearothermophilusMO-3を再度形質転換した結果、多数のカナマイシ耐性、テトラサイリン耐性、およびプロテアーゼ生産性を示す形質転換体が得られた。このことより、プラスミドpNP13上にプロテアーゼ生産性に関与する遺伝子がクローニングされていると考えられたが、約5%の形質転換体は、プロテアーゼ生産性を示さなかった。 従ってpNP13は、宿主菌内で安定に維持されていないことが判った。

pNP13を各種制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動で解析するとpNP13は、ベクターであるpTB90より明らかに分子量が大きくHindⅢ切断部位が 7個所、EcoRI切断部位が12個所存在した(図1-2)。 推定されるpNP13の分子量は約30MDaであった。

1．3．2．　小型化によるプラスミドの安定化

プラスミドpNP13は、分子量が大きく宿主菌内でのプロテアーゼ形質発現が不安定なので、枯草菌(B. subtilis)と好熱菌(B. stearothermophilus)を宿主としてプラスミドの小型化を行った(図1-2)。 pNP13をEcoRIで分解後T4リガーゼ処理したDNAでB. subtilis MT-2株(Npr^-)をコンピテントセル法にて形質転換し、得られた形質転換株(Km^r Tc^r Npr^+)から新たな組み換えプラスミドpNP22(9.4MDa)を取得した。 pNP22は、pNP13由来の2つのEcoRI断片(6.5MDa, 2.9MDa)を保持しており、また EcoRIとHindⅢの二重消化により3 断片に分かれることがアガロースゲル電気泳動により判った(図1-2)。

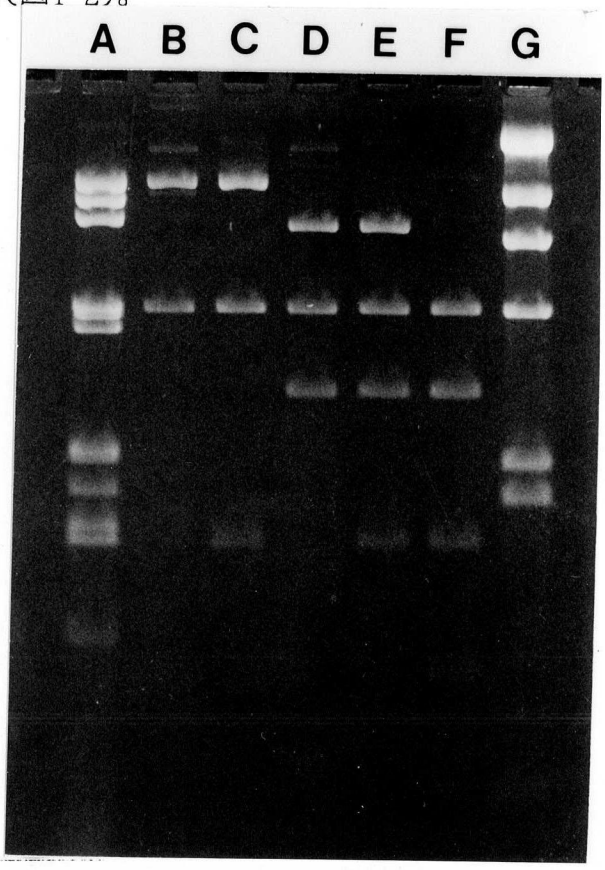


図1-2. 組み換えプラスミドの制限酵素切断後のアガロースゲル電気泳動.
レーンA, pNP13 EcoRI 処理; レーンB, pNP22 EcoRI 処理; レーンC, pNP28 EcoRI 処理; レーンD, pNP22 EcoRI, HindⅢ 処理; レーンE, pNP28 EcoRI, HindⅢ 処理; レーンF, pTB90 EcoRI, HindⅢ 処理; レーンG, λ DNA HindⅢ.

以上のことよりpNP22では、pTB90の 1MDa EcoRI-HindⅢ断片が、pNP13の 4.5MDa EcoRI-HindⅢ断片に入れ代わったことが判明した。 pNP22はB. subtilis内で安定に維持されたが、1MDa EcoRI断片を保持していないためB. stearothermophilus MO-3株に移入することができなかった。 そこで次に、B. stearothermophilus内でのプ

ラスミドの安定化を試みた。 先と同様にpNP13をEcoRIで分解後T4DNAリガーゼ処理したDNAでB. stearothermophilus MO-3株をプロトプラスト法により形質転換しKm^r Tc^r Npr$^+$を示す株を選択した。 その中から組み換えプラスミドpNP28(10.4MDa)を取得した。pNP28を各種制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動を行った結果、pNP28は3つのEcoRI断片(6.5MDa, 2.9MDa, 1.0MDa)から成り(図1-2;レーンC)、またEcoRIとHindⅢの二重消化によりpNP22の場合と同様4.5MDaの断片を得ることができた(図1-2; レーンE)。

これらの結果からB. subtilis内で安定なプラスミドpNP22(9.4MDa)及びB. stearothermophilus内で安定なプラスミドpNP28(10.4MDa)を得た。また両プラスミドはともにpTB90由来の各断片の他に、B. stearothermophilus CU21株染色体DNA由来と考えられる 4.5MDaのEcoRI-HindⅢ断片を保持しており、この断片上にプロテアーゼ構造遺伝子が存在していると考えられた(図1-3)。

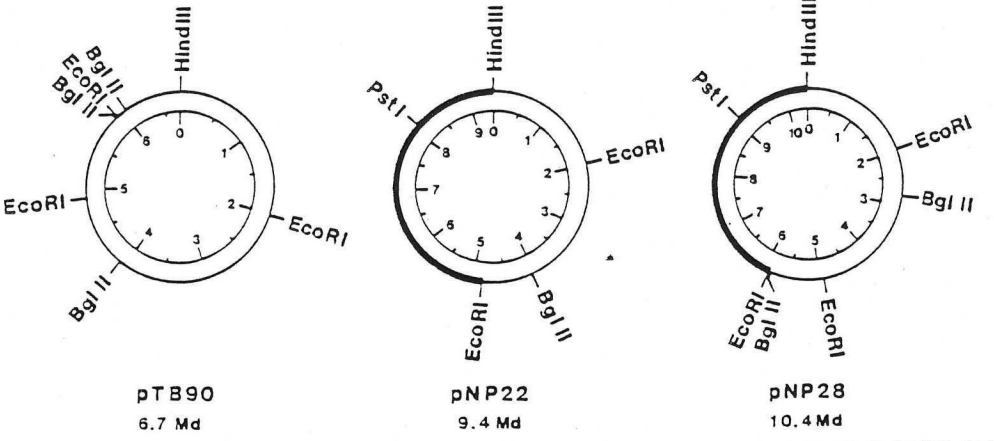


図1-3. 組み換えプラスミド pTB90, pNP22, 及びpNP28 の制限酵素切断点地図.
円内の数字は分子量(MDa)を示し、また黒く太い線はB. stearothermophilus染色体DNA由来の 4.5MDa EcoRI-HindⅢ 断片を示している。

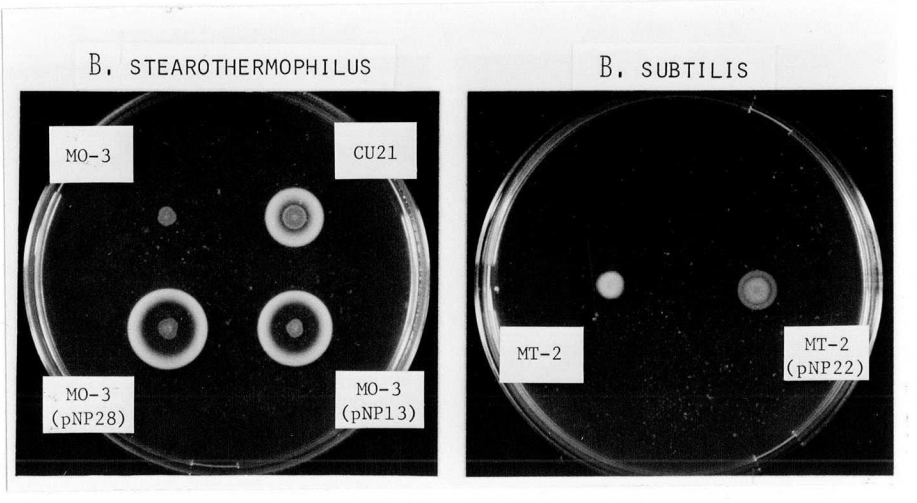


図1-4. LC寒天培地上における菌体外プロテアーゼ生産性の比較.

1. 3. 3. 組み換えプラスミド保持株によるプロテアーゼ生産性

B. stearothermophilus CU21株、MO-3株、及びMO-3株のpNP13, pNP28保持株、更にB. subtilis MT-2株とそのpNP22保持株をそれぞれLC寒天培地上で生育させて、コロニー周辺のハローの大きさを比較した(図1-4)。 ハローの直径を比較することによりおおよそのプロテアーゼ生産性を比較できるが、より定量的に比較するために乾燥菌体重量あたりのプロテアーゼ活性を測定した(表1-2)。

表1-2

菌株	温度(°C)	各培養時間後のプロテアーゼ活性 (U/mg of cell dry cell) 6 時間	9 時間	12 時間
B. stearothermophilus				
CU21	55	19	17	17
MO-3	55	5.9	10	5.0
MO-3(pNP13)	55	190	280	280
MO-3(pNP28)	55	210	290	310
B. subtilis				
MT-2	37	4.2	7.0	6.2
MT-2(pNP22)	37	90	210	180

親株のB. stearothermophilus CU21株は約20(units/mg dry cell)のプロテアーゼを生産しB. stearothermophilus MO-3株は、5-10(units/mg dry cell)であった。組み換えプラスミドpNP13及びpNP28保持株では、200-300(units/mg dry cell)の活性を示しその値は親株の約10-15倍であった。 またB. subtilis MT-2株のpNP22保持株も約200(units/mg dry cell)のプロテアーゼを生産している。 これらの実験結果から4.5MDa EcoRI-HindⅢ 断片上にはプロテアーゼ生産に関する遺伝子が存在し、その遺伝子は、B. stearothermophilusとB. subtilis両宿主菌内で発現していることが明らかになった。

1．3．4．　プロテアーゼ構造遺伝子クローン化の証明

EcoRI-HindⅢ（4.5MDa)断片上にプロテアーゼ生産に関与する制御遺伝子等ではなく、プロテアーゼ構造遺伝子が存在することを示すために、組み換えプラスミドpNP28を保持するB. stearothermophilus MO-3株、及びpNP22を保持する B. subtilis MT-2株の生産するプロテアーゼを精製し、酵素の諸性質について比較検討した。

(1)分子量

B. stearothermophilus MO-3(pNP28)及びB. subtilis MT-2(pNP22)の生産するプロテアーゼの分子量を、SDS-PAGEによって調べた(図1-5)。

両プロテアーゼはともに電気泳動的に単一のバンドを示し推定分子量は36,000であった。

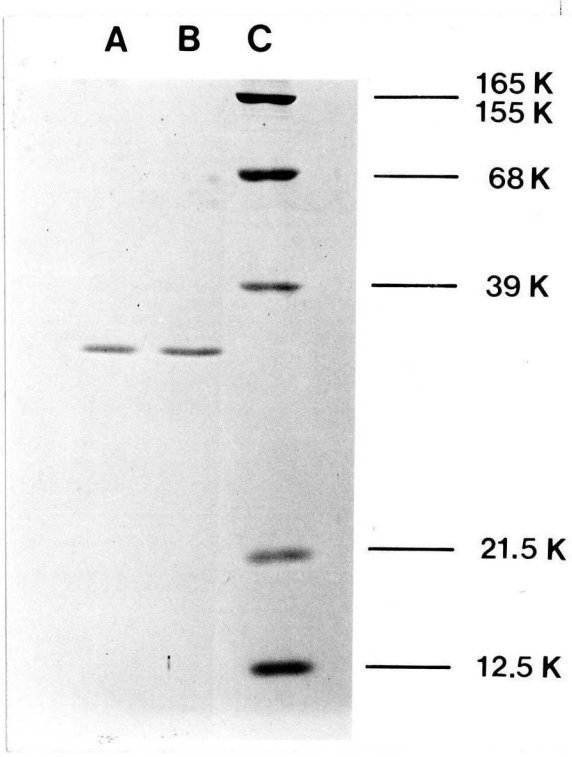


図1-5．精製したプロテアーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動．
レーンA，B. stearothermophilus MO-3(pNP28)；レーンB，B. subtilis MT-2(pNP22)；
レーンC，分子量マーカー．

(2)熱安定性

プロテアーゼの65°Cにおける熱安定性を比較した(図1-6)。

B. stearothermophilus MO-3(pNP28)の生産するプロテアーゼ(A)も、B. subti-

lis MT-2(pNP22)の生産するプロテアーゼ(B)も、65°C 30分の熱処理後も約80%の残存活性を有し、共に非常に熱安定性の高いプロテアーゼであった。 ちなみに B. subtilis MI113の生産するプロテアーゼは同一条件下で約15分後には、残存活性が20%以下になることが判った。

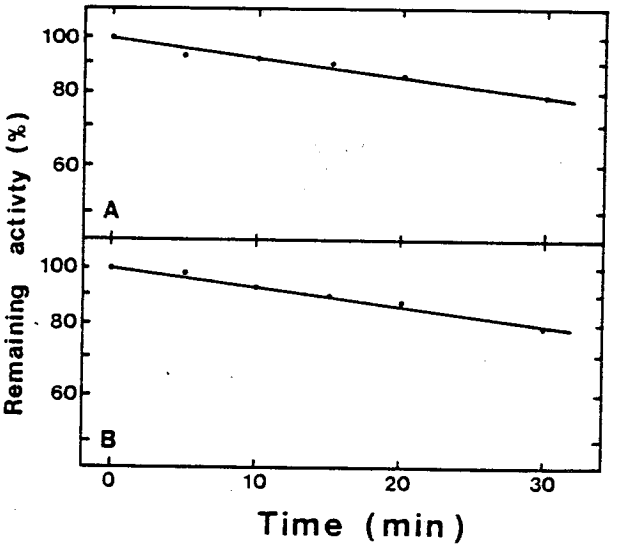


図1-6. 中性プロテアーゼの熱失活曲線. (A) B. stearothermophilus MO-3(pNP28)由来のプロテアーゼ; (B) B. subtilis MT-2(pNP22)由来のプロテアーゼ.

(3) 最適pH

B. stearothermophilus MO-3(pNP28)の生産するプロテアーゼ(A)とB. subtilis MT-2(pNP22)の生産するプロテアーゼ(B)の最適pHを比較した(図1-7)。両プロテアーゼ共に同一のpH特性を示し最適pHは中性の7.0付近にある中性プロテアーゼであった。

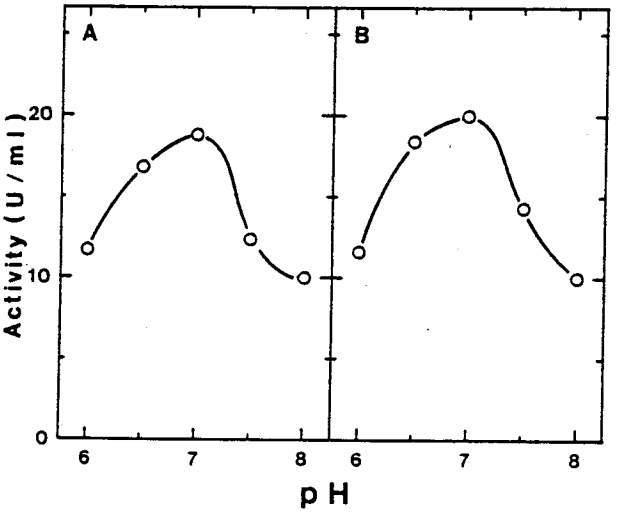


図1-7. 中性プロテアーゼのpH特性. 0.1Mリン酸緩衝液をそれぞれのpHに合わせて活性を測定した. (A)B. stearothermophilus MO-3(pNP28)由来のプロテアーゼ; (B)B. subtilis MT-2(pNP22)由来のプロテアーゼ.

(4) 各種プロテアーゼ阻害剤の影響

プロテアーゼの阻害剤であるキレート剤エチレンジアミン四酢酸(EDTA)，ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)，フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)の3種類の薬剤についてその活性に対する影響を調べた(表1-3)。

表1-3

酵素起源	阻害剤	濃度(mM)	活性(%)
B. stearothermophilus			
MO-3(pNP28)	添加せず	0	100
	EDTA	1	19
	EDTA	5	11
	EDTA	10	2
	DFP	1	90
	DFP	5	86
	PMSF	1	92
	PMSF	5	88
B. subtilis			
MO-3(pNP22)	添加せず	0	100
	EDTA	1	13
	EDTA	5	7
	EDTA	10	4
	DFP	1	98
	DFP	5	97
	PMSF	1	97
	PMSF	5	98

表1-3の結果より、B. stearothermophilus MO-3(pNP28)の生産するプロテアーゼ

もB. subtilis MT-2(pNP22)の生産するプロテアーゼも共にキレート剤 EDTA によって強く阻害される金属プロテアーゼであると考えられた。

以上(1)-(4) の諸性質において組み換えプラスミドの宿主菌が好熱菌(B. stearothermophilus)と常温菌 (B. subtilis) というように異なっているにもかかわらず同一の性質をもつ耐熱性中性プロテアーゼを生産していた。従って4.5MDaの EcoRI-HindⅢ断片上には、プロテアーゼ構造遺伝子が存在すると結論した。

第4節　考察

ベクタープラスミドとしてpTB90を、供与DNAとしてB. stearothermophilus CU21染色体DNAを用いて、ショットガン法により中性プロテアーゼ構造遺伝子をクローニングすることができた。 組み換えプラスミドpNP28とpNP22は共に4.5MDaの B. stearothermophilus染色体DNA由来のEcoRI-HindⅢ断片を保持しており、それぞれ B. stearothermophilus MO-3とBacilus subtilis MT-2株を宿主として安定に維持された。 しかし、B. stearothermophilus内で安定であったpNP28もB. subtilis内では不安定でありまたB. subtilis内で安定なpNP22でB. stearothermophilusを形質転換することが不可能であった。それ故、同一のプラスミドを用いて両宿主内での遺伝子発現量を比較することはできなかったが、両プラスミド上のプロテアーゼ構造遺伝子はそれぞれの宿主内で効率良く発現し、培養液中に多量のプロテアーゼ活性が認められた。また、生産された酵素の分子量、熱安定性、pH特性、及び阻害剤に対する特性が全く同じであることよりプロテアーゼ構造遺伝子がクローニングされたこと、そしてB. stearothermophilusとB. subtilisで遺伝子発現（転写・翻訳）やタンパク質分泌機構が共通していることが明らかとなった。 酵素生産のパターンは、培養9時間目以降に酵素活性のピークが現れるので、増殖連動型ではなく胞子形成連動型と考えるべきであろう。

Bacillus属細菌の幾種類かは、菌体外中性プロテアーゼを生産する事が知られているが(33)、それらの多くは、活性の発現に亜鉛イオン(Zn^{2+})を必要とし、またタンパク質構造の安定化の為にカルシウムイオン(Ca^{2+})を必要としている。 今回クローニングしたB. stearothermophilus CU21株由来の中性プロテアーゼも、同様の

性質を示した。 例えば本プロテアーゼは、カルシウムイオン非存在下では著しく不安定になるため培養、精製並びに活性測定など、総ての系においてカルシウムイオンを2-5mM添加した。 また亜鉛イオンの重要性についても予備的に解析を行った。

EDTA(5mM)をふくむ緩衝液で酵素標品を懸濁した後4°Cにて一晩透析し、次にEDTAを含まない酵素緩衝液で透析することによりEDTAを除去した。その酵素標品について、亜鉛イオンを含む緩衝液中で活性を測定するとEDTA処理した後と比べ活性が約50%回復した。 更に詳細に検討する必要はあるが、本プロテアーゼが他の常温Bacillus属のものよりはるかに耐熱性の中性プロテアーゼを生産し、さらに活性中心に亜鉛イオンを持つことより、 同じ好熱性Bacillus属細菌であるB. thermo-proteolyticusの生産するサーモライシン(34)と類似の酵素であると予想される。

第5節　要約

1. B. stearothermophilus CU21染色体DNAを供与体、プラスミドpTB90をベクターとしたショットガンクローニング法により中性プロテアーゼ構造遺伝子をクローニングした。 クローニングしたB. stearothermophilus染色体由来の遺伝子領域の大きさは4.5MDa(EcoRI-HindⅢ)であった。
2. 組み換えプラスミドを保持するB. stearothermophilusと B. subtilis株をそれぞれ培養しプロテアーゼ生産性を検討した結果、乾燥菌体当たり組み換えプラスミド保持株は親株の約15倍のプロテアーゼを生産していることが判り遺伝子増幅効果が認められた。
3. B. stearothermophilusとB. subtilisを宿主とした組み換え体をそれぞれ培養し、その上澄液からプロテアーゼを精製した。 両宿主由来の酵素は全く同一の手法によって精製できその特性を調べた結果、共に分子量36,000、 至適pH7.0、65°C 30分の熱処理後も約80%の残存活性を有する耐熱性中性プロテアーゼであった。このことよりクローニングした断片上にはプロテアーゼ生産にかかわる制御因子ではなく構造遺伝子がコードされていることが証明できた。
4. 本プロテアーゼはキレート剤EDTAにより強く阻害される金属プロテアーゼであ

第２章　中性プロテアーゼ遺伝子の構造解析

第１節　緒言

構造遺伝子の塩基配列を決定するということは、 遺伝子のコードする蛋白質のアミノ酸配列を明らかにする上で重要であるばかりでなく、遺伝子発現の特徴(プロモーター配列、コドン使用頻度)を解析するうえでも貴重な情報を得ることができる。また特に分泌酵素のように前駆体タンパク質が膜を透過する際にプロセッシングを受けるような場合も、遺伝子構造からアミノ酸配列を導けば酵素Ｎ末端配列の情報と併せて前駆体領域の限定を行うことができる。Bacillus属細菌は特に多数の酵素を分泌する事で知られており、分泌機構の解明は異種タンパク質分泌生産の上でも非常に重要であるため、塩基配列決定のもたらす情報は価値があると言える。

また、菌体外へ分泌されている領域(成熟タンパク質領域)のアミノ酸配列を他の菌株由来のプロテアーゼと比較して酵素耐熱性の原因や、 活性発現必須領域を限定することもできる。 本研究では、以下の４点の目標を設定しプロテアーゼ遺伝子及び酵素自体の基本的な構造を明らかにすることを目的とした。

（１） プロテアーゼ遺伝子の全塩基配列を決定し、そこから判るアミノ酸配列およびコドン使用頻度を明らかにすること。

（２） 菌体外に分泌されているプロテアーゼを精製してＮ末端のアミノ酸配列を決定し、先で述べた塩基配列と考え合わせて前駆体領域を明らかにすること。

（３） プロテアーゼ遺伝子由来のｍＲＮＡを抽出してS1-マッピング法により転写開始点及びプロモーター配列を明らかにすること。

（４） 成熟プロテアーゼのアミノ酸配列を他の菌株由来のものと比較して活性発現必須領域や亜鉛やカルシウムイオンの結合部位を明らかにすること。

これらの目的達成の過程で得られる基礎的知見は、プロテアーゼの分泌機構解明並びに酵素特性の蛋白質工学的改良を行う上でも非常に重要である。

第2節　実験材料及び方法

使用菌株、プラスミド及びファージ

実験に使用した菌株、プラスミド及びファージを表2-1に示した。

表2-1

菌株	特性	由来
B. stearothermophilus	Sm^r	
CU21		(5)
B. subtilis	trpC2 leuC7 hsdR hsdM Npr^-	
MT-2		(35)
Escherichia coli K-12	[Δ(lac-pro) thi rpsL endA sbcB15 hspR4	
JM105	/F' traD36 $proA^+B^+$ $lacI^q$ ZΔM15]	(36)

プラスミド及びファージ	特性	由来
pNP22	9.4MDa Km^r Tc^r $nprT^{+(a)}$	(5)
pNP28	10.4MDa Km^r Tc^r $nprT^+$	(5)
PhageM13 mp10		(36)
PhageM13 mp11		(36)

(a) nprT ; B. stearothermophilus 由来中性プロテアーゼ構造遺伝子

B. stearothermophilus CU21株は、好熱菌の野生株、B. subtilis MT-2株は、前章で得たプロテアーゼ非生産株である。 E. coli JM105株は、ファージM13の宿主として用いた。

組み換えプラスミドpNP22及びpNP28は、第1章で作製したB. stearothermophilus由来中性プロテアーゼ構造遺伝子をクローニングした組み換えプラスミドである。

培地

使用した培地は、第1章、第2節で示した L培地及びYPC培地である。プラスミド保持株の培養時には培地にカナマイシン(5 μg/ml)を添加した。

DNA塩基配列決定

DNAの塩基配列は、Maxam-Gilbert法(37)とdideoxy法(36)を併用した。 使用した配列決定用のゲルの濃度は、ポリアクリルアミド 20%, 8%, 及び 6%ゲルである。

菌体外プロテアーゼの精製

B. stearothermophilus CU21(pNP28)をYPC培地を用いて培養して、第1章で述べた方法に従って精製を行った。2度目のDEAE-SephadexA50カラムクロマトグラフィーの後に自己消化を防ぐ目的のためトリクロロ酢酸を終濃度2%になるように加え酵素を失活させた。失活した酵素タンパク質を遠心(15,000 × g, 30分)により沈澱させ0.8mlの98%ギ酸に懸濁した。脱塩と精製を兼ねて逆相の液体クロマトグラフィーを行い、280nmにおけるピーク画分を回収してアミノ酸配列の分析に使用した。

N末端アミノ酸配列の決定

エドマン分解法によってプロテアーゼN末端のアミノ酸配列を決定した。分解にはアプライド・バイオシステム社製モデル470A気相式アミノ酸シークエンサーを使用した。フェニルチオヒダントイン誘導体となったアミノ酸を液体クロマトグラフィーにより解析した(38)。

プロテアーゼmRNAの調製

プロテアーゼ構造遺伝子(nprT)由来のmRNA画分は、B. stearothermophilus CU21(pNP28)から取得した。菌体をカナマイシン(5μg/ml)と塩化カルシウム(2mM)を含むL培地中で48°C, 18時間培養し、菌体を遠心(8,000 × g, 10分)により回収して緩衝液(0.01M トリス塩酸塩, pH8.0)にて3度洗浄した。200μg/mlのリゾチウムを含む同緩衝液に沈澱した菌を懸濁して、0°C 10分間静置することにより溶菌させた。その後、フェノール処理を2回、クロロホルム処理を1回行うことによりタンパク質を除去し、核酸の画分を取得した。 その画分をエタノール沈澱してRNase-free DNaseI(30μg/ml)により37°C, 30分間処理してDNAを除いた。 得られたRNA画分をフェノー

ルとクロロホルムで処理してエタノールにより濃縮した(39)。

DNAプローブの調製

プロテアーゼ構造遺伝子領域26 base-pair(bp) と5'上流領域とを含む241 bpのMboI断片を抽出してアルカリフォスファターゼ処理により両5'末端を[γ-^{32}P]-ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼによりラベルした。更にラベルの入った断片をHhaIで処理して、その結果生じる223 bpの断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離抽出した。このDNA断片は一方の5'末端のみラベルされており、次に述べるS1-マッピング法の際のプローブとして用いた。

S1-ヌクレアーゼマッピング法

S1-ヌクレアーゼマッピング法は、GilmanとChamberlinの方法(40)を改良して行った。ラベルの入ったDNAプローブ(約100,000 cpm)とRNA画分(約200μg)を混合し、エタノールにより沈澱させて、30 μlのハイブリダイゼーション用緩衝液(80% ホルムアミド, 40mM PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)], 1mM EDTA, 0.4M NaCl[pH6.4])に懸濁した。 この懸濁液を72°C 15分間保温してすぐに59°C(この温度はDNAプローブのGC含量によって決まる)に下げ、18時間保温した。氷冷したS1-ヌクレアーゼ緩衝液(0.28 M NaCl, 0.05M 酢酸ナトリウム(pH4.6),4.5mM $ZnSO_4$, 20μg/ml 一本鎖DNAキャリアー)300μlを加えて撹拌した後に、S1-ヌクレアーゼ(400 U/ml)で37°C 30分間処理した。 反応生成物をエタノール沈澱して塩基配列決定用8%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により解析した。

アミノ酸配列のホモロジー検索

アミノ酸配列のホモロジー検索はパーソナルコンピューターNEC PC-8801を用いてNovotnyの方法(41)に従ったドットマトリクス法により行った。

試薬

制限酵素、T4DNAリガーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、アルカリフォスファターゼ、M13シークエンスキット、RNase-free DNaseI及び S1-ヌクレアーゼは、宝酒造(株)より購入した。 [γ-^{32}P]-ATP並びに[α-^{32}P]-CTPは、New England Nuclear

Corp.より購入した。他の試薬類は、第1章、第2節で述べた通りである。

第3節　結果

2. 3. 1 プロテアーゼ構造遺伝子の位置決定

第1章でB. stearothermophilus CU21由来耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子が、pNP22及びpNP28の4.5MDaEcoRI-HindⅢ断片上にクローニングできたことを述べた。pNP22の制限酵素切断点を解析した結果、ベクター側には存在しないMluI切断点が3ケ所4.5MDa挿入断片内に存在した。そこでプラスミドpNP22をMluIで分解後、T4リガーゼで処理したDNAでB. subtilis MT-2株を形質転換して3種類の欠失プラスミドを作製した(図2-1)。

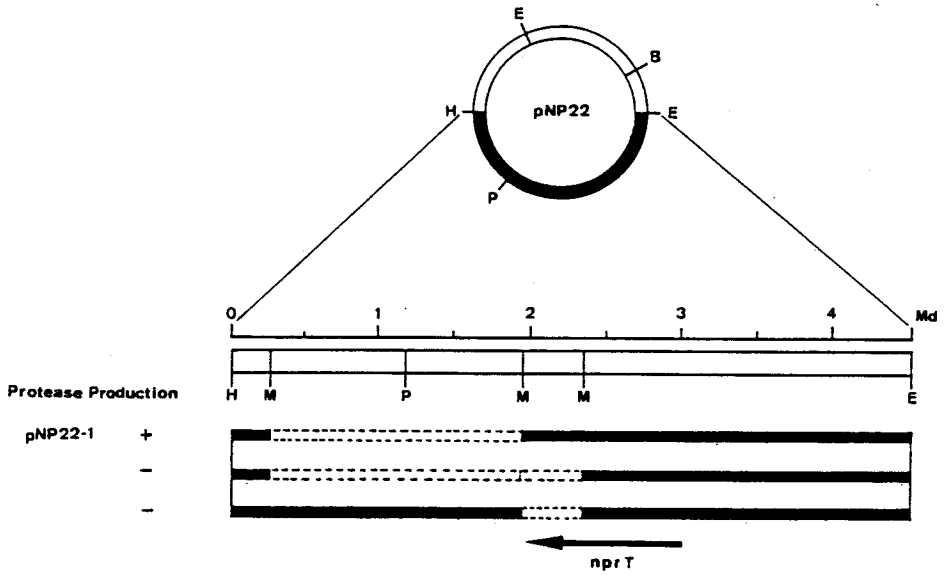


図2-1. プラスミドpNP22及びその派生プラスミドの構造. 白抜き部分はベクターであるpTB90由来の領域, 黒塗り部分は中性プロテアーゼ構造遺伝子を含むB. stearothermophilus CU21染色体DNA由来の領域を示し, 破線で囲まれた領域は欠失したMluI断片を示している. BglⅡ, EcoRI, HindⅢ, MluI, 及びPstI 切断点はそれぞれB, E, H, M, 及びPでそれぞれ示している. nprT の位置と方向を図の下に矢印で示した.

各々のプラスミド保持株のプロテアーゼ生産性をプレート上のハローにより検定した結果、0.4MDaのMluI断片はプロテアーゼ生産に必須であり、他方1.8MDaのMluI断片は除去後もプロテアーゼ生産性に影響が無かった。この結果から、プロテアーゼ構造遺伝子(nprT)は、0.4MDaのMluI断片を含む領域に存在していると考えられた。

そこでプロテアーゼ生産性を示した 1.8MDa MluI断片を欠失したプラスミドを小型プラスミドpNP22-1と命名し以後の実験に使用した。

2. 3. 2. プロテアーゼ遺伝子の塩基配列

プロテアーゼ構造遺伝子(nprT)とその近傍領域の塩基配列を決定した(図2-2)。塩基配列上の番号は後で述べる転写開始点を+1として塩基数を数えたものである。+49番からの開始コドン(ATG)で始まり+1693番の終止コドン(TAA)で終わる1,644塩基(548アミノ酸残基)から成るオープンリーディングフレームが存在した。開始コドン(ATG)の9塩基上流にはAGAAAGGGG(+31 - +39)の9塩基から成る配列が存在し、この配列はB. stearothermophilus(42)並びにB. subtilis(43)の16SリボゾームRNAの3'末端と相補性を有していた。 従ってこの領域は、nprTのリボゾーム結合部位(Shine-Dalgarno配列)として機能し得ると考えられた。最も安定なペアリングをしたときの自由エネルギー量変化は-24Kcal(約-100kJ)/molであった(44)。

オープンリーディングフレームにコードされているタンパク質のN末端領域は、N末端側にリジン、アルギニンといった塩基性のアミノ酸残基が存在しその後ろに疎水性アミノ酸残基の長く続く領域が存在し(図2-2;下線部)、これは分泌タンパク質の前駆体に存在するシグナル配列の典型的な構造を呈していた。リボゾーム結合領域やシグナル配列が存在することはこのオープンリーディングフレームが菌体外プロテアーゼをコードしている可能性を示唆するものである。しかしオープンリーディングフレームから推測される酵素タンパクの分子量は59,514であり、第一章第三節でのべたプロテアーゼの分子量36,000とはシグナル配列の存在 (分子量2,500 - 4,000)を考慮に入れてもなお大きく異なっていた。

2. 3. 3. 菌体外プロテアーゼのN末端アミノ酸配列

B. stearothermophilus CU21(pNP28)をYPC培地を用いて培養し、その上澄液からプロテアーゼを精製した後、ペプチドシークエンサーを用いた14サイクルのエドマン分解によりN末端アミノ酸14残基を決定した。 その結果N末端アミノ酸残基の配列は、 Val-Ala-Gly-Ala-Ser-Thr-Val-Gly-Val-Gly-Arg-Gly-Val-Leuであり、 この14残基のアミノ酸配列はオープンリーディングフレームの230番目のアミノ酸残

-100

GATCAGGAAGCATTGCGCTATGGACGAAGTGAGCCTCCTTTCGTTCTCGGGATATAGCCCGAAAACAACCACGCGAGGAAAAACGAAAGTCCCGG

+1

CCGTGCACGGAGGCGTGTCATTGCCGTTCATTTTCCCAATACAATAAGGATGACTATTTTGGTAAAATTCAGAATGTGAGGAATCATCAAATACATATTCAAGAAAGGGCAAGAGGAGA

-35 region -10 region SD

100

ATGAACAAACGGGCGATGCTCGGGGCGATCGGGCTGGCGTTCGGCCTGCTGGCGGCGCCGATCGGCGCTTCGGCGAAGGGGGAATCGATCGTCTGGAACGAACAATGGAAGACGCCCGTCA

MetAsnLysArgAlaMetLeuGlyAlaIleGlyLeuAlaPheGlyLeuLeuAlaAlaProIleGlyAlaSerAlaLysGlyGluSerIleValTrpAsnGluGlnTrpLysThrProSer

1 40

200

TTCGTGTCCGGTTCGTTGCTAAACGGAGGGGAACAAGCGCTGGAAGAGCTCGTTTATCAATACGTCGATCGGGAAAACGGCACATTCCGCCTCGGCGGACGCGCCCGCGACCGTTTGGCG

PheValSerGlySerLeuLeuAsnGlyGlyGluGlnAlaLeuGluGluLeuValTyrGlnTyrValAspArgGluAsnGlyThrPheArgLeuGlyGlyArgAlaArgAspArgLeuAla

80

300 400

CTGATCGGCAAACAGACTGACGAACTTGGCCATACCGTGATGCGGTTTGAACAGCGGCATCACGGTATACCGGTTTACGGCACCATGCTGGCTGCCCATGTGAAAGATGGCGAGCTGATC

LeuIleGlyLysGlnThrAspGluLeuGlyHisThrValMetArgPheGluGlnArgHisHisGlyIleProValTyrGlyThrMetLeuAlaAlaHisValLysAspGlyGluLeuIle

120

500

GCGCTGTCGGGGTCTTTAATTCCCAATTTAGACGGCCAGCCGCGGTTGAAAAAGGCGAAAACGGTCACCGTCCAACAGGCGGAAGCTATTGCCGAGCAAGACGTAACGGAGACAGTGACG

AlaLeuSerGlySerLeuIleProAsnLeuAspGlyGlnProArgLeuLysLysAlaLysThrValThrValGlnGlnAlaGluAlaIleAlaGluGlnAspValThrGluThrValThr

160

600

AAGGAGCGGCCGACAACCGAAAACGGCGAGCGGACGCGGCTCGTCATTTACCCGACTGATGGCACGGCCCGCCTCGCTTATGAAGTGAACGTCCGCTTTTTAACACCGGTTCCCGGCAAC

LysGluArgProThrThrGluAsnGlyGluArgThrArgLeuValIleTyrProThrAspGlyThrAlaArgLeuAlaTyrGluValAsnValArgPheLeuThrProValProGlyAsn

200

700

TGGGTGTATATCATTGATGCAACCGATGGGGCCATTTTGAATAAGTTCAACCAAATCGACAGCCGCCAGCCCGGCGGCGGGCAGCCGGTCGCCGGCGCGTCGACGGTCGGCGTGGGCCGG

TrpValTyrIleIleAspAlaThrAspGlyAlaIleLeuAsnLysPheAsnGlnIleAspSerArgGlnProGlyGlyGlyGlnProValAlaGlyAlaSerThrValGlyValGlyArg

240

800

GGTGTGTTGGGGGATCAGAAATATATCAATACGACGTATTCCTCGTATTACGGCTACTACTATTTGCAAGACAATACGCGCGGCAGCGGCATTTTTACGTATGACGGACGAAACCGCACC

GlyValLeuGlyAspGlnLysTyrIleAsnThrThrTyrSerSerTyrTyrGlyTyrTyrTyrLeuGlnAspAsnThrArgGlySerGlyIlePheThrTyrAspGlyArgAsnArgThr

280

900 1000

GTTTTGCCCGGCAGCTTGTGGACCGATGGCGACAACCAATTTACCGCCAGCTATGACGCGGCGGCCGTGGACGCCCATTATTACGCCGGCGTCGTGTATGATTACTACAAAAATGTGCAC

ValLeuProGlySerLeuTrpThrAspGlyAspAsnGlnPheThrAlaSerTyrAspAlaAlaAlaValAspAlaHisTyrTyrAlaGlyValValTyrAspTyrTyrLysAsnValHis

320

1100

GGCCGGCTGAGCTATGACGGCAGCAACGCCGCCATCCGTTCGACCGTCCATTATGGCCGCGGCTACAACAACGCGTTTTGGAACGGTTCGCAAATGGTGTACGGCGATGGCGACGGACAG

GlyArgLeuSerTyrAspGlySerAsnAlaAlaIleArgSerThrValHisTyrGlyArgGlyTyrAsnAsnAlaPheTrpAsnGlySerGlnMetValTyrGlyAspGlyAspGlyGln

360

1200

ACGTTTTTGCCGTTTTCCGGCGGCATTGACGTCGTGGGGCATGAGTTGACCCATGCGGTGACGGATTATACGGCCGGGCTTGTTTACCAAAACGAATCTGGCGCCATCAATGAAGCGATG

ThrPheLeuProPheSerGlyGlyIleAspValValGlyHisGluLeuThrHisAlaValThrAspTyrThrAlaGlyLeuValTyrGlnAsnGluSerGlyAlaIleAsnGluAlaMet

400

1300

TCCGATATTTTCGGCACGCTCGTGGAGTTCTACGCCAACCGCAACCCGGACTGGGAGATTGGCGAAGACATTTACACGCCTGGGGTCGCCGGCGATGCGCTCCGCTCGATGTCCGACCCG

SerAspIlePheGlyThrLeuValGluPheTyrAlaAsnArgAsnProAspTrpGluIleGlyGluAspIleTyrThrProGlyValAlaGlyAspAlaLeuArgSerMetSerAspPro

440

1400

GCGAAATACGGCGATCCGGATCATTATTCCAAACGGTACACCGGCACGCAAGACAACGGCGGCGTCCATACAAACAGCGGCATCATCAATAAAGCGGCGTACTTGCTCAGCCAAGGCGGC

AlaLysTyrGlyAspProAspHisTyrSerLysArgTyrThrGlyThrGlnAspAsnGlyGlyValHisThrAsnSerGlyIleIleAsnLysAlaAlaTyrLeuLeuSerGlnGlyGly

480

1500 1600

GTCCATTATGGCGTGAGCGTCAACGGCATCGGCCGCGACAAAATGGGGAAAATTTTCTACCGGGCGCTTGTCTACTATTTGACGCCGACGTCGAACTTCAGCCAGCTGCGTGCCGCCTGC

ValHisTyrGlyValSerValAsnGlyIleGlyArgAspLysMetGlyLysIlePheTyrArgAlaLeuValTyrTyrLeuThrProThrSerAsnPheSerGlnLeuArgAlaAlaCys

520

1700

GTGCAAGCGGCCGCTGATTTGTACGGGTCGACAAGCCAAGAAGTCAACTCGGTGAAACAGGCGTTCAATGCGGTTGGAGTGTATTAAGACGATGAGGTCGTACGCGT

ValGlnAlaAlaAlaAspLeuTyrGlySerThrSerGlnGluValAsnSerValLysGlnAlaPheAsnAlaValGlyValTyr***

548

図2-2. 耐熱性中性プロテアーゼ(nprT)の塩基配列及びそのコードするアミノ酸配列. 塩基配列は転写開始点を+1として数えた. 塩基配列の下にアミノ酸配列を示し, エドマン分解によって明らかになった菌体外領域のN末端アミノ酸残基は, アミノ酸配列の下の矢印で示した. SD配列, 及びプロモーター配列と考えられる領域に下線を記した.

基(Val;GTC +736 - +738)からの配列と完全に一致した(一致したアミノ酸残基は図2-2中の残基の下に矢印を付けた。)。 従ってオープンリーディングフレームの230番目以降の配列が成熟酵素に相当することが判り、また別途行った酵素タンパク質のアミノ酸分析のデータも塩基配列からのものとよく一致した(データは示していない)。

以上の結果から、このオープンリーディングフレームが中性プロテアーゼをコードしていることが明らかとなった。 塩基配列に基づいて計算によって求めたプロテアーゼの分子量は、34,579であり精製した酵素のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で求めた分子量の値36,000とほぼ一致していると言える。

しかし、プロテアーゼ前駆体のN末端領域に存在する229アミノ酸残基のペプチド領域は、通常のシグナル配列(25 - 40アミノ酸残基)よりもはるかに長いものであり、本プロテアーゼの前駆体N末端領域には、B. subtilisやB. amyloliquefaciens由来のプロテアーゼで報告されているプレ-プロ構造が存在すると考えられた(45,46,47,48)。

2. 3. 4. プロテアーゼ転写開始点の決定

オープンリーディングフレームの5'上流約 1 kilo base pair(kbp)の領域にわたる塩基配列を決定し、種々存在する枯草菌RNAポリメラーゼσ-ファクター(σ^{43}, σ^{37}, σ^{32}, σ^{29}及びσ^{28})によって認識され得るコンセンサス配列を検索したが、これらのRNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列は存在しなかった。

そこでプロテアーゼ構造遺伝子由来のmRNAを抽出し、S1-マッピング法により転写開始点の決定を行った。プロテアーゼmRNAを含むRNA画分と、DNAプローブ(223 bpのHhaI-MboI断片、MboI部位が^{32}Pでラベルされている)とをハイブリダイズして、その結果生じたヘテロ二重鎖をS1-ヌクレアーゼで処理して、別途DNAプローブをMaxam-Gilbert法における塩基特異的な化学分解(A+G, T+C)したものと同時に塩基配列決定用のポリアクリルアミドゲル(8 %)で解析した(図2-3)。

2箇所の転写開始点が存在したが、薄いバンドを形成した方(図中細い矢印)は微量の転写産物しか存在しなかったため、翻訳開始点から数えて49塩基上流のグアニン(G)から主に転写が始まっていると考え(図中太い矢印)、その位置の塩基の番号を+1とした。転写開始点から推察できるプロモーター配列は、-35領域(TTTTCC;-41

- -36)並びに-10領域(TATTTT;-17 - -12)であり、両者の間隔は18bpであった。このプロモーター配列は、σ因子既知のRNAポリメラーゼによって認識されるプロモーターのコンセンサス配列とは相同性がなく、報告のある中では、唯一枯草菌(B. subtilis)の胞子形成に関する遺伝子であるspo0B遺伝子のプロモーター配列(-35領域 ; TTTTCT, -10領域 ; TATAAT)(49)と相同性が高かった。

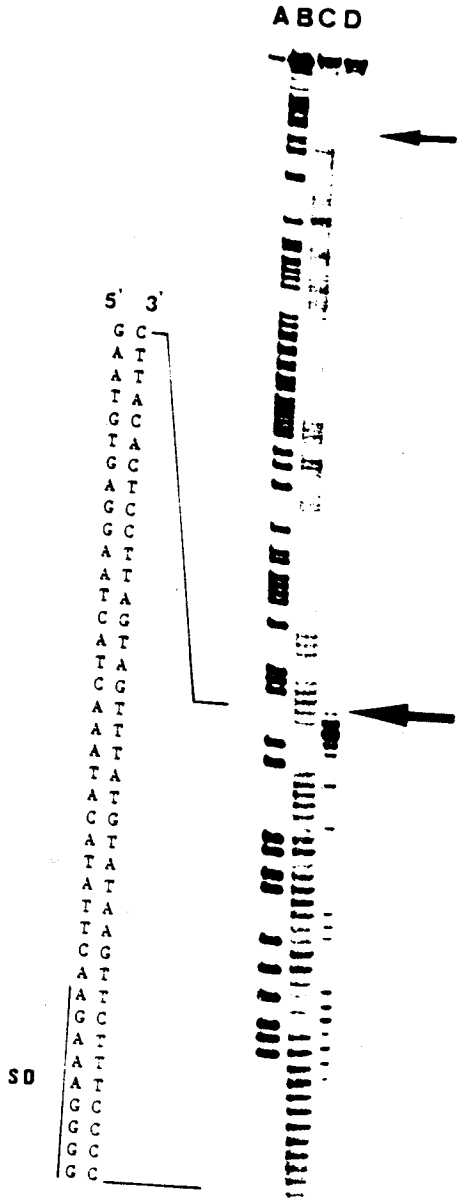


図2-3. nprT 転写開始点のS1ヌクレアーゼマッピングによる同定.
B. stearothermophilus CU21(pNP28)のmRNA画分とDNAプローブをハイブリダイズした後S1ヌクレアーゼで処理し, 8% 塩基配列決定用ゲルで解析した. DNAプローブの一部分をMaxam-Gilbert法における塩基特異的化学分解(プリン[A+G]及びピリミジン[T+C])を行いマーカーとした。レーンA, DNAプローブ; レーンB, A+G; レーンC, T+C (すべての長さの塩基についてバンドを出すために反応時間を延ばした); レーンD, S1ヌクレアーゼ分解後.

第4節　考察

B. stearothermophilus CU21由来中性プロテアーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し1,644塩基(548アミノ酸残基)から成るオープンリーディングフレームがプロテアーゼをコードしていることが明らかになった。また精製した菌体外プロテアーゼのN末端配列を決定し、前駆体領域はN末端側229アミノ酸残基に及ぶ長いペプチド領域であった。この配列は一般の分泌酵素に見られるシグナル配列よりも遥かに長く、他のBacillus属細菌(B. subtilis, B. amyloliquefaciens)のプロテアーゼで報告されているプレ-プロ構造と同様の構造を本プロテアーゼ前駆体も、形成していると考えられる。しかしその構造の生物学的意義についてはまだ解明されていない。酵素の活性中心部位などを解析するために、ここで明らかになったプロテアーゼのアミノ酸配列を他のプロテアーゼと比較した。同じ好熱性Bacillus属細菌であるB. thermoproteolyticusの生産する耐熱性中性プロテアーゼであるサーモライシンは、酵素学的にも良く研究されており成熟タンパク質のアミノ酸配列や3次構造が既に決定されている。そこで本プロテアーゼの成熟酵素領域と、サーモライシンのアミノ酸配列(34)の相同性をドットマトリクス法によって調べたのが図2-4(A)である。両プロテアーゼは、非常に相同性が高くアミノ酸残基の85%が一致した。

このことは両プロテアーゼが共に同様な活性発現機構そして高次構造をとっていることを示唆している。しかし相同性が高いが為に、活性発現に重要な役割を為す領域を限定できなかった。そこで次に、熱安定性の低いプロテアーゼであるB. subtilis由来の中性プロテアーゼのアミノ酸配列との相同性を全領域にわたって調べた(図2-4(B))。サーモライシンの場合と異なり、成熟タンパク質領域に僅かに相同領域が存在するのみで、プレ-プロ構造には相同性が殆ど無い。全体的に見ても相同性は非常に低く、成熟蛋白領域に限れば約30%であった。他方、共に熱安定性の低いプロテアーゼであるB. subtilis由来(22)とB. amyloliquefaciens(46)由来の中性プロテアーゼの間の相同性は82%と非常に高かった。ところが、このように菌株よってその生産するプロテアーゼの熱安定性やアミノ酸配列が異なっているにもかかわらず4種類のプロテアーゼ(B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. thermoproteolyticus, B. stearothermophilus由来)の総てに共通の17アミノ酸残基の相同領域が存在した(図2-5(A))。

特に、この相同領域内のヒスチジン残基は、サーモライシンにおいてプロテアー

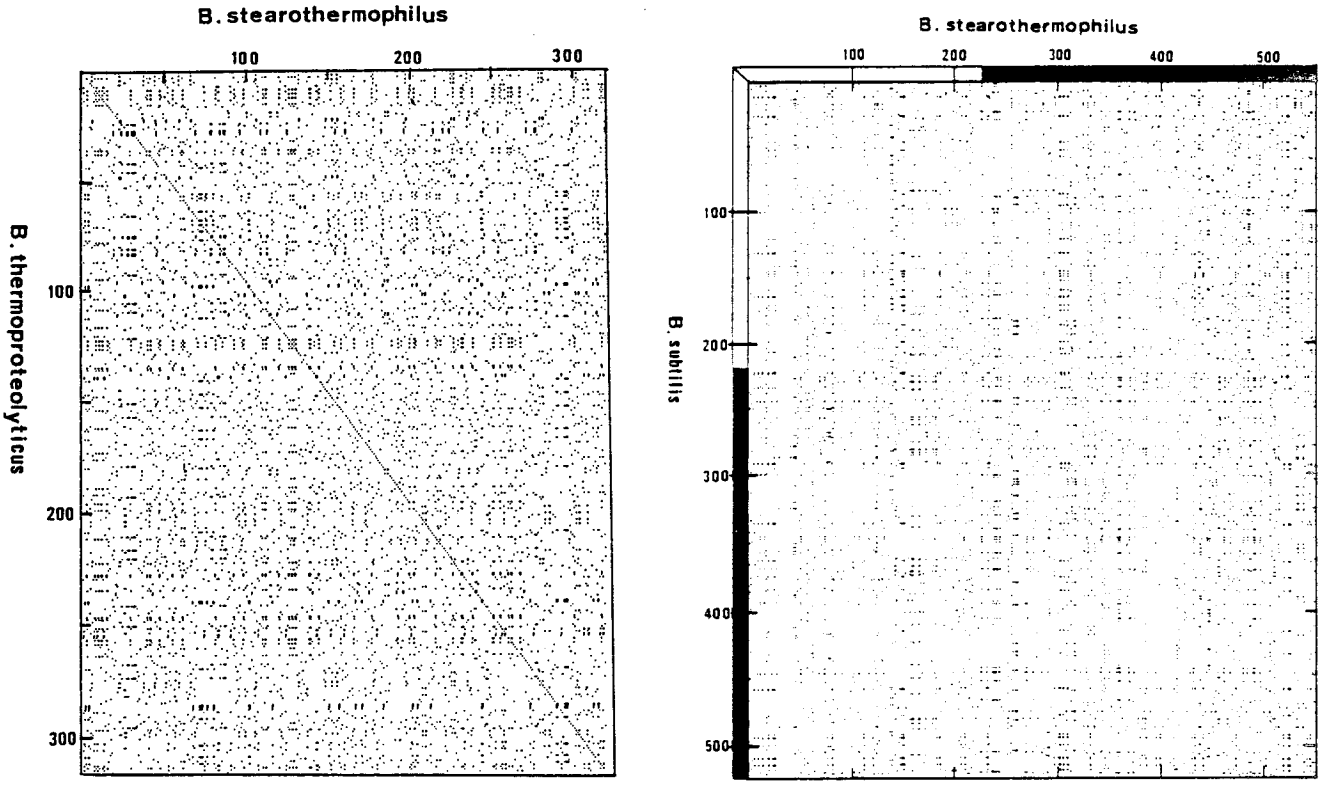


図2-4. コンピューターによるアミノ酸配列相同領域の解析.
(A)B. stearothermophilus CU21由来中性プロテアーゼ(横軸)とB. thermoproteolyticus由来中性プロテアーゼ(サーモライシン, 縦軸)について菌体外成熟領域について比較した. 数字は成熟領域のアミノ酸残基数を示している.
(B)B. stearothermophilus CU21由来中性プロテアーゼ(横軸)とB. subtilis由来中性プロテアーゼ(縦軸)について全コード領域についてアミノ酸配列を比較した. 数字は前駆体タンパク質のアミノ酸残基数に対応し, 白抜き部分はプレ-プロ構造領域を黒塗り部分は成熟領域を示している.

A

	458																		474
Bacillus stearothermophilus	Asp-	Asn-	Gly-	Gly-	Val-	His-	Thr-	Asn-	Ser-	Gly-	Ile-	Ile-	Asn-	Lys-	Ala-	Ala-	Tyr		
Bacillus amyloliquefaciens	Asp-	Tyr-	Gly-	Gly-	Val-	His-	Thr-	Asn-	Ser-	Gly-	Ile-	Pro-	Asn-	Lys-	Ala-	Ala-	Tyr		
Bacillus subtilis	Asp-	Tyr-	Gly-	Gly-	Val-	His-	Thr-	Asn-	Ser-	Gly-	Ile-	Pro-	Asn-	Lys-	Ala-	Ala-	Tyr		
Bacillus thermoproteolyticus	Asp-	Asn-	Gly-	Gly-	Val-	His	-Ile-	Asn-	Ser-	Gly-	Ile-	Ile-	Asn-	Lys-	Ala-	Ala-	Tyr		

B

Bacillus stearothermophilus	GAC	AAC	GGC	GGC	GTC	CAT	ACA	AAC	AGC	GGC	ATC	ATC	AAT	AAA	GCG	GCG	TAC
Bacillus amyloliquefaciens	GAC	TAC	GGC	GGC	GTG	CAT	ACA	AAC	AGC	GGA	ATC	CCG	AAC	AAA	GCC	GCT	TAC
Bacillus subtilis	GAT	TAT	GGC	GGT	GTA	CAC	ACA	AAC	AGC	GGA	ATT	CCA	AAC	AAA	GCC	GCT	TAC

図2-5. B. stearothermophilus, B. amyloliquefaciens, B. subtilis, 及びB. thermoproteolyticus 由来中性プロテアーゼにおける保存性の高い領域.
(A)保存領域のアミノ酸配列. 番号は, B. stearothermophilus中性プロテアーゼの翻訳開始点よりのアミノ酸残基数. サーモライシンで活性中心と考えられている残基(His)を四角で囲んでいる. (B)保存領域の塩基配列. コドンの三番目の残基がG又はCの場合ヌクレオチドの上にドット(・)を記した.

ゼの活性中心であることが報告されている残基である(50)。 従って、他のプロテアーゼにおいてもアミノ酸配列や耐熱性など、酵素特性が異なっていても、この領域が同様の立体構造を形成する活性中心部位であると考えられる。

次に、S1-ヌクレアーゼマッピングによって決定された本中性プロテアーゼ(nprT)のプロモーター領域を、他のBacillus属細菌で報告されているプロモーター配列と比較した(表2-2)。

表2-2

遺伝子または遺伝子産物	-35領域	-10領域	σ因子	参考文献
B. subtilis				
増殖連動型	TTGACA	TATAAT	σ^{43}	(43)
spoVG, spoVC, サチライシン	AGG-TT	GG-ATTG-T	σ^{37}	(48,51,52,52,53)
spoVG, spoVC	AAATC	TA-TG-TT-TA	σ^{32}	(54)
spoVG, spoVC	TT-AAA	CATATT	σ^{29}	(54)
胞子形成連動型	CTAAA	CCGATAT	σ^{28}	(40)
spo0B	TTTTCT	TATAAT	未知	(49)
ファージSP01	T-AGGAGA--A	TTT-TTT	σ^{gp28}	(55)
ファージSP01	CGTTAGA	GATATT	$\sigma^{gp33-34}$	(54)
B. stearothermophilus				
nprT	TTTTCC	TATTTT	未知	
B. thuringiensis				
crystal protein	AGTT-CA	ATAA-A	未知	(56)
B. megaterium				
proteinC	CTAGTAACAA	CGCAAACAT	未知	(57)

表2-2から判るように、B. stearothermophilus 由来のnprTのプロモーター配列の-10領域は、B. subtilis増殖連動型の遺伝子を転写するRNAポリメラーゼのシグ

マ因子(σ^{43})で認識されるプロモーターの-10領域と類似している。 しかし-35領域の配列が、かなり異なっており全体としてはやはり、枯草菌(B. subtilis) spo0B遺伝子のプロモーター配列との相同性が高く、spo0Bと同種のRNAポリメラーゼで転写されていると考えられる。 第1章第3節の培養結果でも述べた、本中性プロテアーゼ遺伝子の発現が胞子形成連動型であるという仮説が、プロモーター配列の情報を得ることにより証明されたと言える。

遺伝子のGC含量は、その構造を論ずる上で重要な指標である(58)。 特に構造遺伝子中においては、トリプレットコドンの3番目の塩基は他の1番目、2番目の塩基と比べると、特定のアミノ酸をコードすると言うよりも遺伝子の構造安定性に関わっていると言える。 塩基配列の情報からプロテアーゼ遺伝子(nprT)のオープンリーディングフレーム領域のGC含量は58 mol%であったが、トリプレットコドンの3番目の塩基におけるGC含量は72 mol%と高くなる傾向を示した。 同様の値を常温菌(B. subtilis, B. amyloliquefaciens)、並びに好熱菌 (B. stearothermophilus, Thermus thermophilus)の酵素について比較した(表2-3)。

表2-3

菌株及び遺伝子産物	G+C含量(mol%)	第3塩基のG+C含量(mol%)	文献
B. stearothermophilus			
中性プロテアーゼ	58	72	
B. subtilis			
中性プロテアーゼ	44	42	(22)
サチライシン	46	41	(45)
B. amyloliquefaciens			
中性プロテアーゼ	46	49	(46)
アルカリプロテアーゼ	49	46	(46,47)
B. stearothermophilus			
α-アミラーゼ	50	57	(59)
チロシル-tRNA-シンセターゼ	54	70	(60)

T. thermophilus			
イソプロピルリンゴ酸			
脱水素酵素	70	89	(61)

中等度好熱菌B. stearothermophilusのGC含量は、常温Bacillus属細菌（B. subtilis, B. amyloliquefaciens)の同値より高くなっており、その傾向は特にトリプレットコドンの第3塩基において顕著になる。また高度好熱菌(T. thermophilus)では第3塩基のGC含量が89%にも達している。 これらの数値は、 先で述べたGC含量と遺伝子構造の安定性の関係を裏付けるもので、 菌の生育温度が高くなるにつれて、より強固な遺伝子構造が要求されるため水素結合がAT対より.も一本多く安定化に寄与する度合の高いGC対が遺伝子内、特に第3塩基に多く存在していることが判る。

中性プロテアーゼの活性中心部位を含む17アミノ酸残基の保存性の高い領域において、コドン使用頻度、特にコドン第3塩基を比較した(図2-5)。 17箇所ある第3塩基の内で、その塩基が G又はC である場合にその塩基の上に印(・)を付けている。各菌株の場合についての G又はC の数は、 B. stearothermophilusの場合17箇所中13箇所(76.5 mol%), B. amyloliquefaciensの場合12箇所(70.6 mol%), B. subtilisの場合7箇所(41.1 mol%)であった。 常温菌であり、しかもB. subtilis由来の中性プロテアーゼと高いホモロジーを有しているプロテアーゼであるにも拘わらず、B. amyloliquefaciens由来のプロテアーゼの場合には、好熱菌(B. stearothermophilus)に近い第3塩基のGC含量値を示していることは興味深い。 また他方では、B. amyloliquefaciensは、常温菌であるにもかかわらず、B. stearothermophilusの生産する耐熱性α-アミラーゼと相同性の高い耐熱性α-アミラーゼを生産することで知られており、これらの事実を考慮に入れるとB. amyloliquefaciensは、進化上好熱菌(B. stearothermophilus)と常温菌(B. subtilis)の中間的な性質を持った菌であると考えられる。

第5節　要　約

1. B. stearothermophilus由来耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定し1,644塩基(548アミノ酸残基)のオープンリーディングフレームがプロテアーゼをコードしていることが明らかになった。
2. 菌体外プロテアーゼを精製しそのN末端領域のアミノ酸配列を決定した結果、オープンリーディングフレームの230番目のアミノ酸残基からの配列と一致し、プロテアーゼの前駆体は、229アミノ酸残基からなるプレ-プロ構造を形成していた。
3. 成熟酵素領域のアミノ酸配列は、B. thermoproteolyticus由来の耐熱性中性プロテアーゼであるサーモライシンと85%の相同性があり、又Bacillus属常温菌由来のプロテアーゼとの相同性は30%程度であった。 種々の酵素間で相同性が異なっていても活性中心付近の17アミノ酸残基はよく保存されていた。
4. S1-ヌクレアーゼマッピング法によって決定したプロテアーゼのプロモーター配列は、-35領域(TTTTCC), 及び-10領域(TATTTT)であった。 この配列はσ因子既知のプロモーター配列には無く、唯一B. subtilisの胞子形成に関与する遺伝子spo0Bのプロモーター配列と相同性が高かった。
5. プロテアーゼ遺伝子のコード領域のGC含量は58 mol%であったが、トリプレットコドン第3文字におけるGC含量は72 mol%と高くなる傾向を示し、高温環境での遺伝子構造安定性との関係が示唆された。

第３章　中性プロテアーゼ分泌生産におけるプレ-プロ構造の役割

第１節　緒言

分泌タンパク質の膜透過モデルの内で最も広く知られているのは、1975年にBlobelらが真核生物由来の分泌タンパク質について提唱したシグナル仮説であろう(62)。この仮説では、前駆体Ｎ末端領域に20-40アミノ酸残基のシグナル配列が存在していること、タンパク質の膜透過は翻訳と共役して膜結合型のリボゾームによって起こっていること、タンパク質の折りたたみやプロセッシングは膜透過中または透過後に起こっていることを分泌機構の基本概念としている。 従ってこの仮説では、分泌現象は前駆体タンパク質のコンフォメーション変化とは無関係に進んでいる事が前提となっており、シグナル配列は前駆体タンパク質と膜内に存在する分泌装置との相互認識に関与していると考えている。 その後、原核生物由来の分泌タンパク質の研究も進み、シグナル仮説で述べられている通りのシグナル配列の存在が原核生物においても明らかにされたが、その一方でシグナル仮説とは異なった観点の膜トリガー仮説がWicknerにより提唱された(63)。この仮説では分泌に関わる膜内の分泌装置等は想定せず、膜透過時の前駆体タンパク質のコンフォメーション変化を重視し、分泌タンパク質の膜透過は翻訳終了後に起こることを基本とし、シグナル配列が存在することによって前駆体タンパク質が膜透過に必要なコンフォメーションを構成できると考えている。

これらシグナル仮説と膜トリガー仮説の両仮説は、その後、特に分泌時の前駆体タンパク質コンフォメーションの重要性を中心に、分泌現象がタンパク質翻訳と共役しているか否かについて論争を巻き起こし、仮説にも修正や批判が加えられ、近年では大腸菌β-ラクタマーゼやマルトース結合タンパク質の分泌機構の研究により膜内の分泌装置の存在を裏付ける結果が得られ、また一方で分泌時のタンパク質コンフォメーション変化の重要性が明らかにされ(64,65)、両仮説の真偽は問えない様相を呈している。 このような情況の中、Randallらのように、シグナル仮説と膜トリガー仮説の折衷的なタンパク質分泌モデルを提唱している研究者もいる(66)。

原核生物のうちBacillus属細菌の生産する種々の分泌酵素についても塩基配列の決定がなされ前駆体のアミノ酸配列が明らかになりつつある。その結果N末端領域

にシグナル配列が存在することが明らかにされているが、 特にプロテアーゼの場合にはシグナル配列(プレ構造)と成熟タンパク質領域の間に長いペプチド領域(プロ構造)が存在しているという特徴が、第2章においても示されている。このプロ構造は、アルカリプロテアーゼの場合で77アミノ酸残基、中性プロテアーゼの場合では200アミノ酸残基の長さに及んでいる。プロ構造の役割に関しては種々の仮説が提唱され、例えば成熟タンパク質領域のプロテアーゼ活性をマスクするのではないか、あるいは膜に結合する際に膜に埋め込まれているのではないか等の役割が想定されている(46)。

第3章では、第2章で明らかになったB. stearothermophilus CU21由来中性プロテアーゼ前駆体構造のうち、特にプロ構造の役割に重点を置き、プロ構造領域をコードする遺伝子領域内にフレームの合う形で欠失、挿入変異を導入してプロテアーゼ分泌生産能力に対する影響を解析した。 また更にプロテアーゼ前駆体構造を利用した分泌ベクターを作製し、異種タンパク質分泌能についても考察を加えた。

第2節　実験材料及び方法

使用菌株及びプラスミド

使用菌株並びにプラスミドを表3-1に示す。

表3-1

菌株	特性	由来
B. subtilis MT-2	trpC2 leuC7 hsdR hsdM Npr$^-$	(35)
E. coliC600-1	leu6 thrl thil supE4 lacYl tonA21 hsdR hsdM Trp-	(27)

プラスミド	特性	由来
宿主 E. coli		

pBR322	Ap^r Tc^r,	(67)
pBRΔBP	Ap^r Tc^r, pBR322のBalI-PvuII間欠失	(68)
pBR-pre-pro	Ap^r, nprTプレ-プロ領域をpBRΔBPのSalI部位にクローニング	(68)
pPS363	Tc^r, penP分泌ベクター断片をpBR322にクローニング	(68)
pPC45X	Ap^r, penPカートリッジをpBR322のBamHI部位にクローニング	(68)
pPC44X	Ap^r, penPカートリッジをpBR322のBamHI部位にクローニング	(68)
pPC27L	Ap^r, penPカートリッジをpBR322のBamHI部位にクローニング	(9)
宿主 B. subtilis		
pNP22-2	Km^r $nprT^+$ pNP22-1由来欠失プラスミド	(69)
pNPΔ3	Km^r, nprT のプロ領域内に3アミノ酸残基の欠失	(68)
pNPΔ33	Km^r, nprT のプロ領域内に33アミノ酸残基の欠失	(68)
pNPI2	Km^r, nprT のプロ領域内に2アミノ酸残基の挿入	(68)
pPS-NP	Km^r, penP シグナル配列と前駆体欠失nprTとの融合	(68)
pNP48	Km^r, nprT N末端側48アミノ酸残基を利用した分泌ベクター	(68)
pNP89	Km^r, nprT N末端側89アミノ酸残基を利用した分泌ベクター	(68)
pNP235	Km^r, nprT N末端側235アミノ酸残基を利用した分泌ベクター	(68)
pPTB50	Tc^r, 構成性 $penP^+$	(9)

大腸菌(Escherichia coli)は、変異導入や分泌ベクター作製の際のDNAの取り扱いを簡便にする為の中間宿主として用いた。

培地

使用した培地は第1章第2節で示したL培地である。プラスミド保持株の培養にはE. coliの場合アンピシリン(Ap) 20μg/ml, B. subtilisの場合カナマイシン(Km)5μg/mlを加えた。プロテアーゼの生産時には、塩化カルシウム(終濃度2mM)を加えた。

形質転換

大腸菌(E. coli)の形質転換は、Imanakaらの方法に従った(27)。 塩化カルシウム($CaCl_2$)で処理したコンピテント細胞は、グリセロール(終濃度 15%(v/v))を加え、-80°Cで凍結保存したものを使用した。 枯草菌(B. subtilis)の形質転換は第1章

で述べた方法で行った。

DNA取り扱い法

プラスミドDNAの抽出精製、制限酵素による切断、及びT4リガーゼによるDNAの連結は、第1章で述べた方法で行った。 エキソヌクレアーゼBal31による処理は制限酵素処理したDNAを真空乾燥し、そこに緩衝液(20mM トリス塩酸塩, pH8.0, 600mM NaCl, 12mM $CaCl_2$, 12mM $MgCl_2$, 1mM EDTA) 400 μlと酵素約4unitsを加えて混合し37°Cで保温して一定時間おきに反応溶液から等量(50μl)を取ってフェノール抽出により酵素を失活させた。DNAの塩基配列決定は第2章第2節で述べたジデオキシ法(36)により行った。

プラスミドの構築

プロ構造へのフレームの合った欠失及び挿入変異の導入は以下の方法により行った。組み換えプラスミドpNP22-2由来の1.1 MDaSalI断片はプロテアーゼ構造遺伝子の5'上流領域とプレ-プロ構造領域とを含んでいる。そこでこのSalI断片をpBRΔBPにサブクローニングしてできたプラスミドがpBR・pre-proである(図 3-1)。 このpBR・pre-proを制限酵素BalIで切断して、その後更にBal31で処理し、ライゲーションしたDNAでE. coliを形質転換した。 形質転換体からプラスミドDNAを抽出し変異領域の塩基配列を決定してpBR・pre-proΔ3(His91-Val93間の3アミノ酸欠失)及びpBR・pre-proΔ33(Asp77-Met109間の33アミノ酸欠失)の2種類の欠失変異プラスミドを取得した。 挿入変異の作製は、SmaIリンカー(5'-CCCGGG-3')をBalIサイトに挿入することにより行い、この変異によって、Gly89とHis90の間に新たにGly-Proの挿入を導入した(pBR・pre-proI2)。 pNP22-2のプロ構造領域と各種の変異を導入したプロ領域とを、BstEⅡサイトを介して置換し、プロ構造領域内変異プラスミドpNPΔ3, pNPΔ33, 及びpNPI2を作製した。またBalI部位でプロテアーゼシグナル配列とペニシリナーゼシグナル配列とを入れ換えたプラスミドpPS-NPも作製した(図3-2)。

プロテアーゼシグナル配列と異なった長さのプロ構造領域を介して、異種タンパク質を菌体外生産させる目的の分泌ベクターは、以下の方法によって作製した。プラスミドpNP22-2を制限酵素SacIで処理した後、Bal31で消化して、その後、BamHIリンカーを挿入してクローニング部位を作製した。その結果N-末端領域48アミノ酸

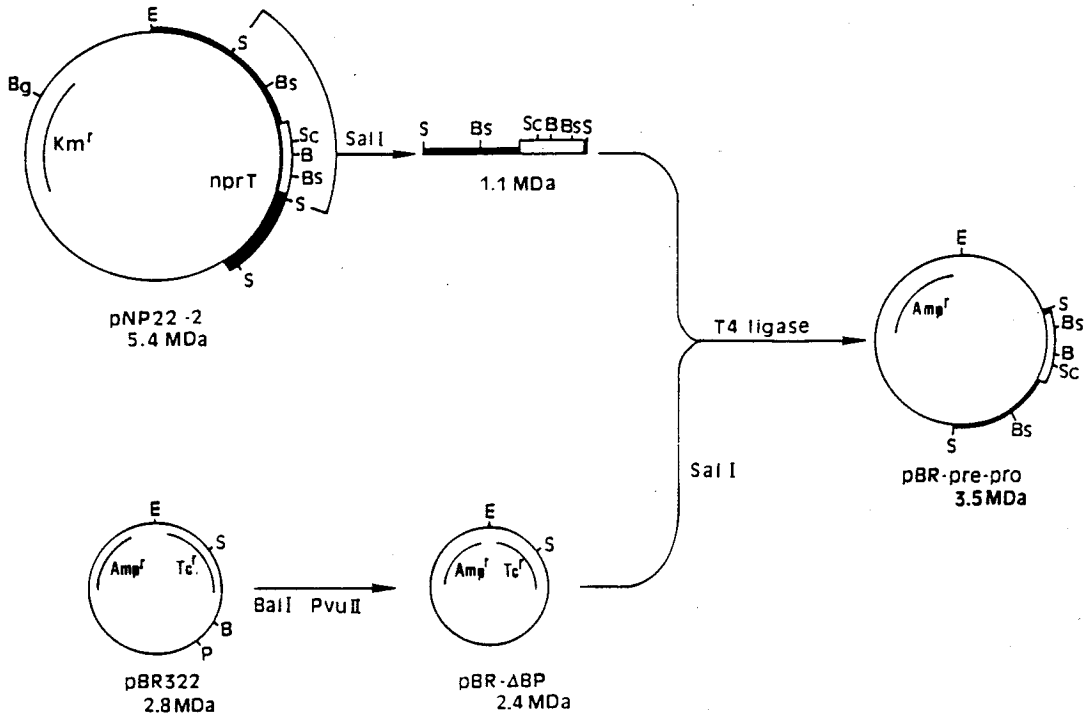


図3-1. nprT プレ-プロ構造領域のサブクローニング. □ 領域はプレ-プロ構造領域を, ■ 領域は成熟タンパク質領域を示している. 太い線はB. stearothermophilus染色体DNAゆらいの領域を示している. B, Bg, Bs, E, S, 及び Sc はそれぞれ制限酵素 BalI, BglII, BstEII, EcoRI, SalI, 及びSacI切断部位を示す.

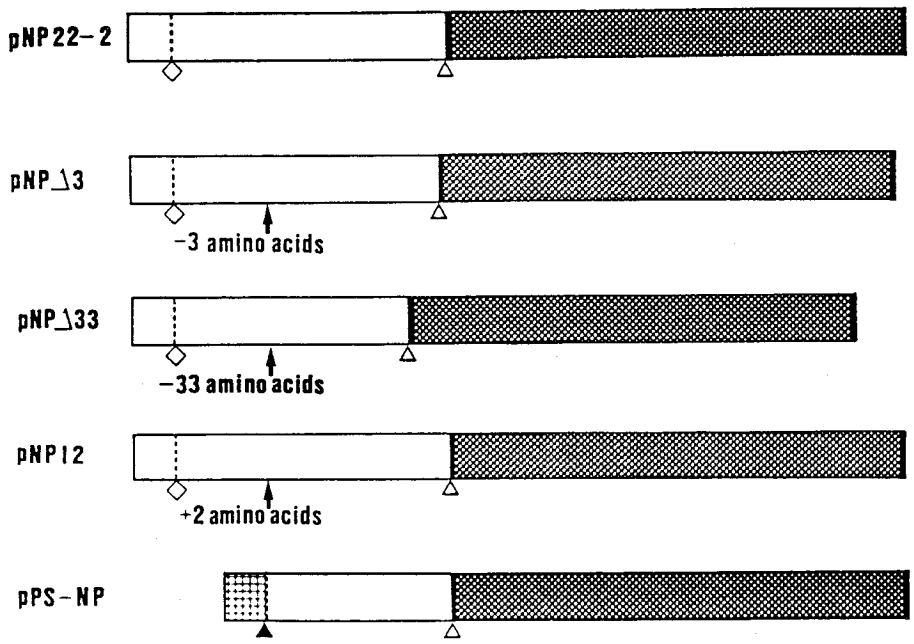


図3-2. pNP22-2由来変異プラスミドの構造. □, ▩ 及び ⊞ の領域はそれぞれプレ-プロ構造領域, 成熟領域, 及びペニシリナーゼシグナル配列を示す. ◇ はプロテアーゼのシグナル配列切断点(Met25-Lys26), ▲ はペニシリナーゼシグナル配列の切断点を示す. △ はプロテアーゼのプレ-プロ構造と成熟タンパク質領域の間の切断点(Pro229-Val230). 矢印は欠失又は挿入の起こった場所を示している.

残基を保持する分泌ベクターpNP48ができた。pNP22-2をBalIで切断してBamHIリンカーを挿入して分泌ベクターpNP89を作製し、pNP22-2をSalIで部分分解してその付着末端をDNAポリメラーゼによって平滑化してBamHIリンカーを挿入して分泌ベクターpNP235を作製した。

ペニシリナーゼ分泌ベクターおよびペニシリナーゼカートリッジはImanakaらの方法により作製した(9)。

酵素活性測定方法

プロテアーゼ活性は、第1章第2節で述べたカゼイン加水分解能を調べる方法で測定した。プロテアーゼ生産菌の検定はLC寒天培地上(L寒天培地に乳製カゼイン1%[wt/vol]を加えたもの)で形成されるコロニー周辺のハローにより検定した。

ペニシリナーゼ活性は、SherrattとCollinsの方法(70)を改良したImanakaらの方法によって行った(27)。 30°Cに予備保温した酵素標品1mlとペニシリンG(1,000 units/ml 0.1Mリン酸緩衝液 pH7.0)1mlを混合し30°Cで10から60分間反応後、ヨード停止液5ml(ヨード保存液[0.32N I_2, 1.2N KI]を0.5M 酢酸ナトリウム pH4.0で20倍に希釈したもの)を加えて反応を停止し、30°C, 10分間保温後、499nm における吸光度を測定した。活性測定の際にコントロールとして: (a)リン酸緩衝液とペニシリンG溶液; (b)酵素標品とリン酸緩衝液; (c)リン酸緩衝液のみ の吸光度の測定も同時に行った。これらの値より$\Delta A_{499}=A_a-(A_c-A_b)-A_{sample}$を算出し、測定値とした。酵素活性の定義は、30°C 1時間で1μmolのペニシリンGを加水分解する量とした。

ペニシリナーゼ生産菌の検定はLP寒天培地(L 培地に0.75% ポリビニルアルコールを加えたもの)を用いたSherrattとCollinsの方法(I_2-ポリビニルアルコール法)(70)に従った。

プロテアーゼの精製

菌体外プロテアーゼは、第1章第2節で述べたDEAE-SephadexA25及びA50を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。 精製後の酵素タンパク質の純度検定は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。 タンパク質に相当するバンドの染色は銀染色法によって行った。

プロテアーゼ遺伝子の試験管内発現

中性プロテアーゼ遺伝子をin vitro遺伝子発現キットを用いて試験管内で発現させた。約5μgのプラスミドDNAをエッペンドルフ管内で真空乾燥させて、30μlの容量で遺伝子発現を行った。 反応後の溶液に120μlの酵素緩衝液、150μlの基質を加えて混合し37°C 2時間保温した後、TCA反応停止液300μlを加え生じた沈澱を遠心分離によって除去し、上澄液を回収した。 対照として基質添加前に反応を停止したものを用いた。

試薬

DNAリンカーは東洋紡(株)より、Ba131ヌクレアーゼは宝酒造(株)より購入した。銀染色キットは、第一化学薬品(株)より、in vitroDNA発現キットはアマシャム・ジャパン(株)より購入し、その他の試薬については前章で述べたとおりである。

第3節　結果

3.3.1. 酵素分泌に及ぼすプロ構造領域内における欠失と挿入の影響

プラスミドpNP22-2, pNPΔ3, pNPΔ33, pNPI2, 及びpPS-NPを用いて各挿入や欠失変異のプロテアーゼ分泌生産に与える影響を調べた。これら5種類のプラスミドの構造を図3-2に示す。 各々のプラスミドを保持する枯草菌(B. subtilis MT-2)をプロテアーゼ検定用LC培地に植菌しコロニー周辺のハローによってプロテアーゼ生産性を比較した(図3-3)。 欠失の大きさが3アミノ酸残基の場合プロテアーゼ分泌能力に殆ど変化がないが、欠失領域が33アミノ酸残基に及ぶと明らかにプロテアーゼ分泌生産能に影響があり野生型と比べて小さいハローしか形成しなかった(図3-3(B))。このpNPΔ33を保持する株を、更に長時間保温した場合、宿主菌の増殖に強いストレスがかかり組み換えプラスミド保持株よりも増殖が早く、かつプロテアーゼを生産しない派生株(segregant)が高頻度で出現した(図3-4)。 挿入変異であるプラスミドpNPI2保持株の場合には、僅か2アミノ酸残基の挿入にも拘らず極端にプロテ

アーゼ分泌生産能が低下していた。 またプロテアーゼシグナル配列の代わりにペニシリナーゼ由来のシグナル配列と交換したプラスミドpPS-NPを保持する株の場合には、野生型プラスミドpNP22-2保持株よりも若干大きなハローをプレート上で形成した(図3-3)。

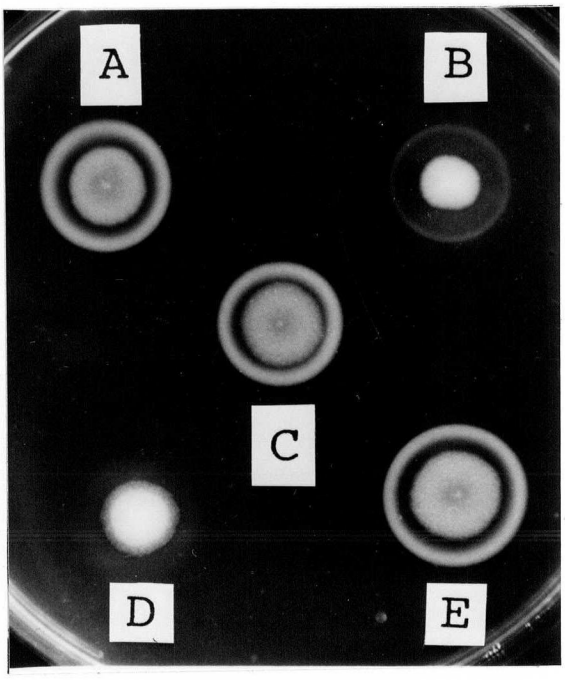


図3-3. LCプレート上におけるプロテアーゼ生産性. 各プラスミド保持株をLC寒天培地上で37°Cで培養後のコロニー周辺のハローを観察した. A, B, C, D, 及び E は, それぞれB. subtilisMT-2株 pNPΔ3, pNPΔ33, pNP22-2, pNPI2 及び pPS-NP 保持株である.

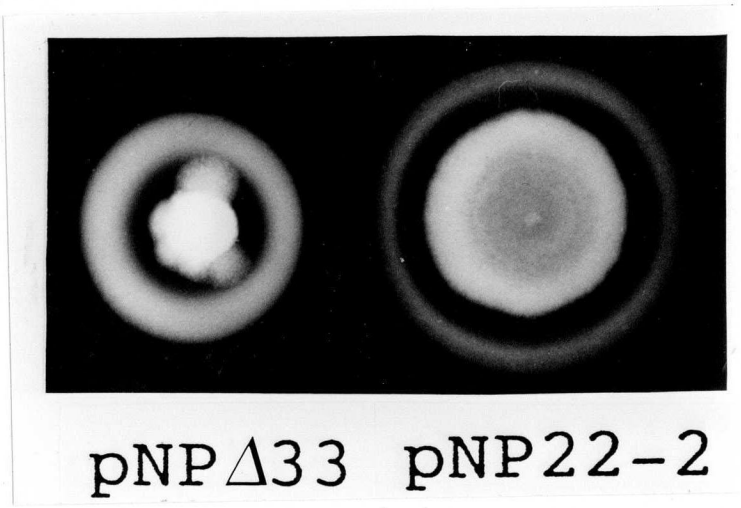


図3-4. 変異プラスミド保持株 B. subtilis MT-2(pNPΔ33) のコロニーから生じたプロテアーゼ非生産株. 図3-3.で使用したプレートを更に長時間(計48時間)保温した.

これら変異プラスミド保持株のプロテアーゼ生産性を、より定量的に測定するために液体培養による乾燥菌体重量当たりのプロテアーゼ生産性を、第1章第3節の方法により行った(表3-2)。

表3-2

	プロテアーゼ(unit/mg 乾燥菌体) ; 時間		
	6	9	12
B. subtilis MT-2	4.2	7.0	6.2
B. subtilis MT-2(pNP22-2)	136	212	204
B. subtilis MT-2(pNPΔ3)	128	190	155
B. subtilis MT-2(pNPΔ33)	88	45	32
B. subtilis MT-2(pNPI2)	-[a]	-[a]	-[a]
B. subtilis MT-2(pPS-NP)	294	257	201

a ; プラスミドが安定に宿主菌に維持されなかった。

プラスミドpNPΔ3, pNPΔ33, 及びpPS-NP保持株は、それぞれ野生型pNP22-2保持株の 76%, 15.7%, 及び 98.5%のプロテアーゼをそれぞれ培養12時間目において生産していた。またプラスミドpNPI2は、液体培養において安定に宿主菌内に維持されなかった。SmaIリンカーの挿入によって挿入されたアミノ酸残基がグリシンとプロリンであり、共にヘリックスブレイカーであることが影響していると考えられる。

また更に33アミノ酸残基以上の欠失変異は、プラスミドが不安定なために作製できなかった。これらの結果は、プロテアーゼ前駆体のプロ構造領域は分泌において重要な役割を担っている事を示しており、プロ構造領域により、前駆体タンパク質が膜透過に必要なコンフォメーションを形成できると考えられる。しかし、プロテアーゼシグナル配列の代わりにペニシリナーゼシグナル配列を用いた場合(pPS-NP)に、プロ構造領域が不完全であるにも拘らずプロテアーゼ生産に影響がなかったことから、プロ構造領域の役割は、本プロテアーゼのシグナル配列に特異的なもので

あると考えられる。

3．3．2．　変異プラスミド保持株の生産するプロテアーゼの精製

枯草菌(B. subtilis MT-2)株を宿主として各変異プラスミド(pNPΔ3，pNPΔ33，pPS-NP)保持株を培養してその培養濾液からプロテアーゼをDEAE SephadexA50イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し、酵素活性のピーク画分をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析し、野生型の酵素と比較した(図3-5)。野生型中性プロテアーゼの分子量は、第2章で述べたとおり塩基配列からの計算により34,579であることが判っている。 図よりプラスミドpNPΔ3，並びにpPS-NP保持株の生産するプロテアーゼの分子量は、pNP22-2由来の野生型プロテアーゼと同じ分子量を示しており、このことからこれらのプラスミド保持株におけるプロテアーゼ前駆体のプロセッシングは正常に行われている事が判る。 更に、各々のバンドの濃さは先に調べた乾燥菌体重量当たりのプロテアーゼ生産性と対応がついていた。

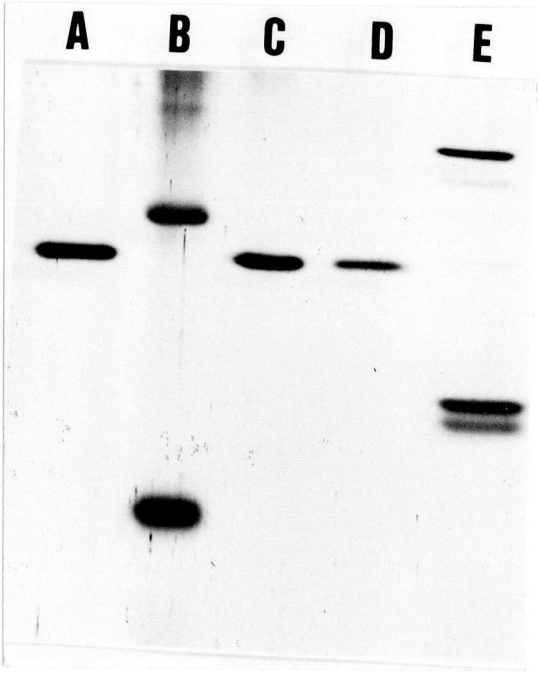


図3-5．精製したプロテアーゼのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動．B. subtilis MT-2 を宿主とした pPS-NP保持株(レーンA)，pNP22-2保持株(レーンC)，pNPΔ3(レーンD)，及び pNPΔ33(レーンE)からのプロテアーゼを示している．レーンEは分子量マーカーの乳酸脱水素酵素(M.W. 36,500)，トリプシンインヒビター(M.W. 21,500)である．

他方プラスミドpNPΔ33保持株の場合には、野生型プロテアーゼと同じところにバンドは存在せず、分子量56,000，25,000，及び24,500の位置にそれぞれタンパク質が存在し(図3-5;レーンE)、この場合通常のプロセッシングは起きていないと考えられた。 詳細を検討する必要はあるものの、分子量の一番大きなタンパク質(分子量56,000)は、前駆体プロテアーゼのプロ構造と成熟領域を加えた大きさにほぼ等しい。

3．3．3． プロテアーゼ分泌ベクターによるペニシリナーゼ生産

第2節で述べたプロテアーゼ分泌ベクターpNP48，pNP89，及びpNP235は各々異なった長さのプロ領域を保持しており、これらの分泌ベクターを用いてB. licheniformis由来のペニシリナーゼの分泌生産を試みた。シグナル配列切断部位を持たないペニシリナーゼカートリッジをpPC45Xから調製して、分泌ベクターpNP48とpNP89のBamHIクローニング部位にそれぞれ挿入してpNP48-453とpNP89-453を作製した。次にペニシリナーゼカートリッジのうちプロセッシング部位のあるものと無いものをそれぞれpPC44XとpPC27Lから抽出して、分泌ベクターpNP235のBamHI部位に挿入し、pNP235-442とpNP235-272を、それぞれ作製した。作製したプラスミドの構造を図3-6に示した。また、それぞれのプラスミド保持株の生産する乾燥菌体重量当りのペニシリナーゼ生産量を表3-3に示した。

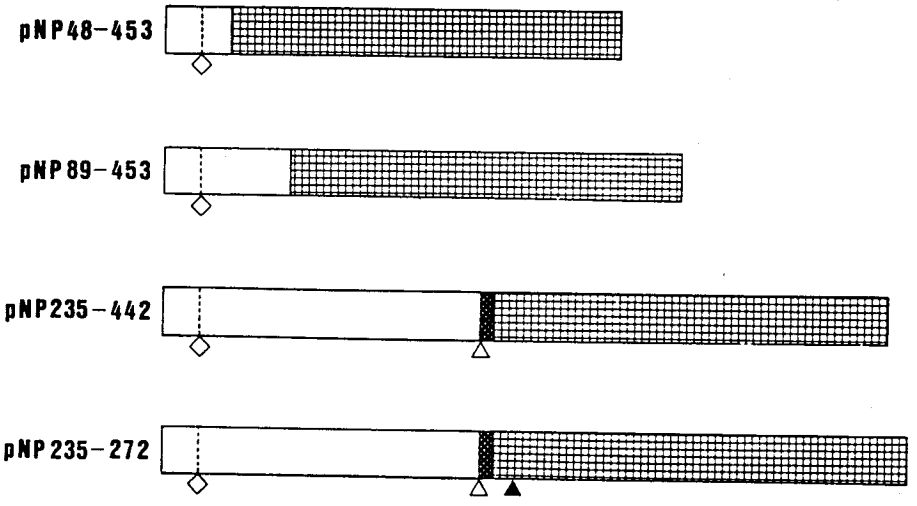


図3-6．各種ペニシリナーゼカートリッジを含むnprT 分泌ベクターの構造．
ペニシリナーゼシグナル配列切断点を▲で示した．その他は図3-2に同じ．

表 3-3

菌株	ペニシリナーゼ(units/mg 乾燥菌体)；時間		
	6	9	12
B. subtilis MT-2(pNP48-453)	8.2	7.2	6.2
B. subtilis MT-2(pNP89-453)	1.8	3.6	4.8
B. subtilis MT-2(pNP235-272)	4.0	7.8	6.4

N末端側48アミノ酸残基を利用した分泌ベクター(pNP48)によってペニシリナーゼ分泌生産を行うことができた。 他方N末端側89アミノ酸残基を用いた分泌ベクター(pNP89)の場合には、ペニシリナーゼ生産性は12時間後で約20%低下していた。更にプロ構造領域全体を含むN末端領域235アミノ酸残基を含む分泌ベクター(pNP235)の場合、ペニシリナーゼのプロセッシング部位が存在しないと(pNP235-442)全くペニシリナーゼ生産性を示す形質転換体が得られなかった。 以上の結果は、プロ構造領域を分泌ベクター内に多く含むほどペニシリナーゼ分泌生産には阻害的に働いていることを示している。 先のプロ領域内への変異導入の結果と併せて考えると、プロ構造領域の役割はプロテアーゼ前駆体に特異的であること、異種タンパク質分泌の目的にはシグナル配列のみでも機能し得ることが示唆される。 分泌ベクターpNP235を用いたペニシリナーゼ分泌生産を、ペニシリナーゼ自身のシグナル配列プロセッシング部位を含むカートリッジを利用して行うプラスミドpNP235-272保持株の場合、前述のプラスミドpNP48-453保持株と同程度のペニシリナーゼ生産性を示した(表3-3)。 このことは、プロテアーゼ前駆体のプロ領域と成熟領域の間のプロセッシング部位(Pro229-Val230)がペニシリナーゼ遺伝子を融合させた場合には正常に切断されていないことを示していると考えられる。

3. 3. 4. プロテアーゼ遺伝子のin vitro発現

プロテアーゼ前駆体のプロ構造領域の役割については様々の仮説が出されているが、果してプロ構造が存在した場合成熟タンパク質領域のプロテアーゼ活性をマス

クできるか否かを、in vitroでプロテアーゼ遺伝子を発現させ、前駆体プロテアーゼの状態で活性を測定することにより調べた(表3-4)。

表3-4

プラスミド	ΔOD_{275}	プロテアーゼ活性(units/ml)
pNP22-2	0.26	0.37
pNPΔ3	0.25	0.35
pNPΔ33	0.29	0.40
No DNA	ND[a]	-

[a] ND ; Not detectable(検出不可能[$\Delta OD_{275} < 0.01$])

この実験より、in vitroで合成されたプロテアーゼ前駆体にも明らかにタンパク質分解活性が存在しており、プロ領域に成熟タンパク質領域の活性をマスクする能力がないと考えられるデータが得られた。 従ってプロ構造は、プロテアーゼ成熟タンパク質領域さらにプロテアーゼシグナル配列と相互に作用して、膜透過に必要な立体構造を形成する役割を担っている可能性が高い。

第4節　考察

本プロテアーゼ前駆体構造領域は229アミノ酸残基から成る。そのN末端領域にはシグナル配列が存在し、プロ構造領域、そして成熟タンパク質領域がそれに続いている。ここでは、このプロ構造領域にアミノ酸の欠失及び挿入を導入し、プロテアーゼ分泌生産に与える影響を調べた。 その結果、プロ領域内の欠失アミノ酸残基が多くなるほどプロテアーゼ分泌生産能が落ちること、ヘリックスブレイカーであるGlyやProなどをプロ構造内に挿入すると極端にプロテアーゼ生産性が落ちること等が明らかになり、プロ構造領域のプロテアーゼ分泌生産における重要性を示すことができた。欠失変異をもつプラスミドpNPΔ33保持株で宿主菌の増殖が阻害されたこと(図3-4)は、大腸菌(E. coli)の分泌タンパク質とβ-ガラクトシダーゼの融合タンパク質が誘導状態において分泌過程で膜内の分泌装置に埋め込まれてしまい宿

主菌に致死的な影響を与える現象と類似したものと考えられる(71,72,73)。 従ってプロ構造領域は、プロテアーゼ前駆体タンパク質の細胞膜透過に必要な立体構造を形成するために必要であるという仮説を支持する実験結果であるといえる。

プロテアーゼ前駆体のシグナル配列を、 B. licheniformis由来ペニシリナーゼのものと交換した場合(pPS-NP)には、プロ構造が不完全であるにもかかわらず野生株と同程度の旺盛なプロテアーゼ生産性を示した。 従って先に述べたプロ構造の役割はプロテアーゼのシグナル配列に特異的であり、シグナル配列、プロ構造領域、そして成熟タンパク質領域、これら3者が相互に影響を及ぼし合い膜透過に必要な立体構造を形成している様子がうかがえる。我々の研究室では、かつてペニシリナーゼとアミラーゼのシグナル配列を利用した分泌ベクターをそれぞれ作製し、異種タンパク質の分泌生産を試みた結果に基いて、シグナル配列と成熟タンパク領域の組み合わせが異種タンパク質の分泌効率を左右する上で重要であることを報告した(10)。本研究におけるプロテアーゼの場合にも、先の結果を支持する知見が得られたと言える。 しかし、シグナル配列のみでも機能し得る例(pPS-NP)、が取得できているにもかかわらず、プロテアーゼがプレ-プロ構造を形成している理由に関しては未だ明らかになっておらず、単に膜透過時の立体構造形成のみでない別の役割をプロ構造が担っている可能性も残されている。

プレ-プロ構造領域を種々の長さで含む分泌ベクターを作製し、ペニシリナーゼの分泌生産を試みた結果、プロテアーゼシグナル配列は、ペニシリナーゼ分泌生産において機能しうる事が判った。 その場合、分泌量は非常に少なく、モル換算でプロテアーゼの場合の約1/580であった。(ここでプロテアーゼの比活性を33,600 (units/mg)(第5章第3節)、ペニシリナーゼの比活性を 0.35 (units/mg) (74)とした。)しかもプロテアーゼ生産の場合とは逆に、プロ構造領域が分泌に阻害的に働くことが種々の分泌ベクターを用いることで判った。特にプロ構造を全部含む分泌ベクターの場合には、ペニシリナーゼのシグナル配列切断部位がある場合(pNP235-272)にのみ活性のあるペニシリナーゼ分泌生産が認められたことは、プロテアーゼの成熟過程のうち特にプロ構造領域と成熟タンパク質領域との間のプロセッシングは自己消化的に起こっている、つまり成熟タンパク質側のタンパク質分解活性によってプロ構造領域が切断されている事を示唆している。 実際、in vitroで合成されたプロテアーゼ前駆体にはタンパク質分解活性が存在することが実験により確かめ

られ、また本プロテアーゼとアミノ酸配列で85%と高い相同性を有し、活性中心部位のアミノ酸配列も同じであることが第2章で明らかとなったB. thermoproteolyticus由来サーモライシンの基質特異性との類似性から考えて、プロ構造と成熟タンパク質領域間のプロセッシング部位(Pro229-Val230)は、本プロテアーゼによって切断され得ると考えられる(75)。 このプロ構造領域がプロセッシングされないことが、同領域がペニシリナーゼ分泌生産に阻害的に働く理由であり、余分なプロ構造領域はペニシリナーゼ分泌時にはプロセッシングされず、融合タンパク質となっていると考えられる。今後、分泌ベクターを用いて生産されたペニシリナーゼを精製してN末端アミノ酸配列を決定すれば、シグナルプロセッシングの場所を限定でき、また併せてプロ構造のプロセッシング機構に関しても新たな知見が得られるであろう。プロテアーゼの成熟機構に関しては、B. amyloliquefaciens 由来のアルカリプロテアーゼについて他の研究者による報告が為され、自己消化によってプロ領域のプロセッシングが起こっていること、並びにプロ領域のコンフォメーションが分泌に重要な役割を果すことを示唆するデータが得られている(76,77)。また同アルカリプロテアーゼのプレ-プロ構造領域を利用した分泌ベクターによるStaphylococcus aureus由来のプロテインAの分泌生産においても、プロ構造領域と成熟タンパク質領域間のプロセッシング(Tyr107-Ala108)は起こらず、プロ領域と成熟タンパク質の融合タンパク質のみ生産されたことも報告されている(78)。これらの知見は、今回、中性プロテアーゼの分泌機構に関して得られた知見と矛盾せず、Bac-illus属細菌由来のアルカリプロテアーゼと中性プロテアーゼのプロ構造領域は、同様の役割を成熟タンパク質分泌時に担っていると考えられた。

第五節　要 約

1. 耐熱性プロテアーゼ前駆体のプロ構造内に欠失(3アミノ酸残基、33アミノ酸残基)及び挿入変異(2アミノ酸残基)を導入して、プロテアーゼ分泌生産に対する影響を調べた。 プロ構造領域内の欠失アミノ酸残基数が多いほどプロテアーゼ分泌能力が低下し、また2アミノ酸残基の挿入によってもプロテアーゼ生産性が極端に低下した。このことよりプロ構造がプロテアーゼ分泌生産において重要

な役割を担い、特にシグナル配列や成熟タンパク質領域と相互に影響を及ぼしあって、膜透過に必要な立体構造を構成する役割を担っているのではないかと考えられた。

2. プロテアーゼ前駆体を利用してペニシリナーゼの分泌生産を試みた結果、プロ構造領域を多く含むほどペニシリナーゼ分泌生産能が低下し、異種タンパク質(ペニシリナーゼ)分泌生産においては、プロ構造は阻害的に働くことが判った。これは分泌時にプロ構造領域がプロセッシングされない為であると考えられた。
3. プロ構造領域と成熟タンパク質領域の間のプロセッシングは自己消化的に起こると考えられる。プロ構造領域をすべて含む分泌ベクターを用いた場合に、活性のあるペニシリナーゼ生産が認められたのは、成熟タンパク質領域内にペニシリナーゼ自身のシグナル配列プロセッシング部位を含む場合に限られており、これは、プロ領域と成熟領域の間のプロセッシングがプロテアーゼの自己消化により起こる為であると考えられた。
4. 上述 3. の仮説はin vitroで合成された前駆体プロテアーゼタンパク質にプロテアーゼ活性が認められた事実により支持され、また同時に、プロ構造領域には成熟タンパク質領域のプロテアーゼ活性をマスクする能力は無いことが示された。

第４章　タンパク質工学的手法による酵素熱安定性の改変

第１節　緒言

生物はそれぞれが棲息する環境温度において効率良く機能するタンパク質を生産している。従って、温泉や堆肥などの高温環境に棲息する好熱性細菌の生産するタンパク質は同じ機能を有する常温菌由来のタンパク質よりも一般に熱安定性が高い(79,80)。このような耐熱性酵素は、古くから研究者達の興味の対象となっており、アミノ酸配列決定や立体構造決定と言った酵素化学的アプローチや、塩基配列決定や部位特異的変異操作と言った分子生物学的アプローチが試みられるようになった。その結果、現時点において、質的にも量的にも多くの情報が集積しつつあるが、しかし今なおタンパク質構造と熱安定性の関係を明確に説明し得る一般性のある法則は確立されていない。 近年発達しつつあるタンパク質工学的手法においても置換するアミノ酸残基を具体的に決定する方針が定まっておらず、ジスフィルド結合を増やすと言った特殊な場合を除き(81)、試行錯誤の域を脱していないと言える。

好熱菌由来耐熱酵素の一般的性質をまとめると(79,82)

1. 好熱菌酵素はすべて熱に対して安定でありその安定性は細胞から抽出後も変化しない事から分子内部に熱安定性の原因が存在する。
2. 好熱菌酵素は安定性以外の性質は相当する常温生物の酵素と類似している事から両者は進化的に見て同一の起源から派生したと考えられる。
3. アミノ酸組成や一次配列も相当する常温生物のものに類似しており互いに相同な関係にある。しかし僅かだがアミノ酸組成に明らかに熱安定性の高い酵素特有の傾向が存在する。

ということが挙げられる。

以上まとめてみると、好熱菌酵素は酵素分子内の極めて微小な構造の変化により高い熱安定性を獲得していることが言える。 微小な構造変化とは、換言すれば僅かのアミノ酸置換のことであり、人為的にアミノ酸置換を起こす変異を導入して酵素熱安定性を向上させることが理論的に可能であることを示している。

そこで次に、具体的にどのようなアミノ酸置換が酵素熱安定性の向上に有効であるのかを考える。Singletonらは好熱菌由来の耐熱性酵素及び同一機能を有する熱

安定性の低い酵素のアミノ酸組成を比較し、好熱菌酵素に多く含まれるアミノ酸残基を選び出した(83)。その結果、好熱菌酵素に多く含まれるアミノ酸残基は、Arg, Glu, Gln, Ala,及びLeuであり、逆に少ないアミノ酸残基は、Lys, Asp, Asn, Cys, 及びSerであった(84)。またArgosらはタンパク質アミノ酸配列を比較して各タンパク質の至適温度を考慮に入れた統計的処理を行い熱安定性の向上に有効なアミノ酸置換を調べた。その結果、Gly→Ala, Ser→Ala, Ser→Thrなど10種類の置換を挙げている(85)。 熱安定性向上をもたらす可能性のあるこれらのアミノ酸置換の一般的傾向は、① 10置換中9置換は1塩基の置換によって起こる。② 立体構造上内部疎水性を高めている。③ ヘリックス内部では、よりヘリックス形成能の強い側鎖への置換が起こっている。④ β-シート構造内にあってもより安定化する方向へと置換が起こっている。⑤ 分子内部がより高密度にパックされる傾向がある。の5点が挙げられるが、これらの特徴がタンパク質一般に適応し得るか否かは興味のもたれる点である。

酵素構造の熱安定性は、1塩基置換に基く1アミノ酸置換によっても変化し得る事が既に示されており(86,87)、上述の好熱菌酵素特有のアミノ酸置換をタンパク質工学的手法により導入すれば人為的に効率良く酵素の熱安定性向上を行うことが可能となるであろう。

本章では、耐熱性中性プロテアーゼを材料として、現時点で得られているタンパク質のアミノ酸配列や立体構造、あるいは構造と安定性の相関に関する情報を元に、熱安定性を更に向上させるための3項目の設計基準を設け、それらに基いて熱安定性の意図的な向上と低下を試み、酵素タンパク質の構造と機能との相関、そして酵素構造の熱に対する安定性の一般的特徴について考察した。

第2節　実験材料及び方法

使用菌株とプラスミド

使用菌株及びプラスミドを表4-1に示した。

表4-1

菌株	特性	文献
B. subtilis MT-2	trpC2 leuC7 hsrM hsmM Npr^-	(35)
E. coli C600-1	leu-6 thr-1 supE44 lacY tonA21 hsdR hsdM Trp^-	(27)
E. coli JM101	Δlacpro thi supE F' traD36 proAB lacIqZΔM15	(36)

プラスミド	特性	文献
pNP22-2	Km^r $nprT^+$	(69)
pBR322	Ap^r Tc^r	(67)

枯草菌(B. subtilis MT-2)は、プロテアーゼ構造遺伝子を保持する組み換えプラスミドの宿主として用いた中性プロテアーゼ欠損株である。また、大腸菌(E. coli C600-1)は、変異作製時の中間宿主として用いた。

培地

B. subtilis及びE. coli用の完全培地としては、L培地を、酵素生産用には、YPC培地をそれぞれ用いた。両培地の組成については第1章で述べたとおりである。ファージDNAの調製の際のE. coli JM101株の培養には、2×YT培地（5g 塩化ナトリウム，10g 酵母エキス，16g バクトトリプトン/l)を用いた(35)。

一本鎖ファージDNAの調製

100mlの2×YT培地に宿主菌(E. coli JM101)を植菌し、約2時間培養した後、爪楊枝でプラークを釣り培養液に移して一晩培養する。培養液を遠心分離(12,100 × g, 10分)し、沈澱よりRFDNAを、上澄液より一本鎖DNAを調製した。上澄液に1/5容量の

PEG溶液(20% PEG6000, 2.5M 塩化ナトリウム)を加え室温で20分間放置した後に遠心分離(17,300 × g, 20分)しファージ粒子の沈澱を得、その沈澱を8mlのTE緩衝液に懸濁して等量のフェノールにて2回抽出した。水相をエタノール沈澱して、真空乾燥した後、緩衝液(50mM トリス塩酸塩, 50mM EDTA pH8.0) 6ml に溶かして塩化セシウム-エチジウムブロミド平衡密度勾配超遠心(38,000rpm, 40時間)により一本鎖鋳型DNAを調製した(36)。

オリゴヌクレオチドの合成

部位特異的変異操作に用いるオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems社製381ADNAシンセサイザーを用いたホスホアミダイト法により合成した。合成終了後のカラムをチオフェノールで満たし約1時間放置して保護基を外したのち、2.5mlのメタノールをゆっくり通し、続いて2.5mlの空気を通しカラムを洗浄した。メタノールによる洗浄操作を計4回繰り返して、最後にシリンジに2-2.5mlのアンモニア水を取り、カラムをアンモニア水で満たして15分毎に0.5mlずつナス型コルベンに押し出してカラムから切り出した。コルベンに蓋をして55°Cで一晩放置後アンモニア水を蒸発させて、さらに1mlの蒸留水を加えて溶解後蒸発させて、TE緩衝液に懸濁して凍結保存した。

部位特異的変異操作

変異導入用プライマーである一本鎖オリゴヌクレオチド30pmolの5'末端をT4キナーゼでリン酸化したものと、1pmolの鋳型一本鎖DNAを混ぜてエタノール沈澱し真空乾燥した。このDNAの混合物を10μlのアニーリング用緩衝液(10mM トリス塩酸塩, 10mM 塩化マグネシウム, pH8.0)に懸濁し80°Cで保温し、30分以上かけて40°Cになるまで冷却した。その後20μlの修復用緩衝液(10mM トリス塩酸塩, 10mM 塩化マグネシウム, 各0.25mM のdGTP,dATP,dTTP,及びdCTPの混合液 , 0.25mM ATP, 5mM ジチオスレイトール)中でDNAポリメラーゼI(Klenow断片) およびT4DNAリガーゼを用いて12°C 16-20時間反応を行いギャップのある2本鎖DNAに修復した。大腸菌(E. coli)では、DNA内にミスマッチが存在する場合には、メチル化されているほうのDNA鎖を正しい方として修復する機構が存在する事が知られており、このことが部位特異的変異操作の際の頻度低下の原因となっていると考えられているので、上述

のギャップのある2本鎖DNAより、クローニング部位を含むEcoRI-PstI断片を抽出してpBR322のEcoRI-PstI間に挿入し、E. coli C600-1を形質転換してテトラサイクリン耐性株を選択した。変異の導入されたプラスミドは、遺伝子領域内の新たな制限酵素切断点部位の出現により一次選択し、更に塩基配列決定により最終確認をした(88)。

その他の方法

大腸菌および枯草菌の形質転換法、プラスミドDNA抽出法、電気泳動法、制限酵素使用法、プロテアーゼ精製法、プロテアーゼ活性測定法及び熱安定性測定法は、前章までに述べた方法により行った。

第3節　結 果

4. 3. 1.　アミノ酸置換部位と内容の設計

遺伝子工学の手法を用いた部位特異的変異導入法は、既に技術的に確立されている。しかし酵素熱安定性の改変を目的とした変異を導入する際に、どのアミノ酸残基をどのアミノ酸残基に置換するかに関して一定の方針を立てることはプロテアーゼのみならず他の酵素熱安定性を改変するうえでも参考となるであろう。ここでは現時点までに得られた酵素熱安定性に関する情報を元に以下の3項目の設計基準を設定した。

① 相同性の高いアミノ酸残基は置換しない。

同一機能、異種生物由来のタンパク質とアミノ酸配列を比較した場合に活性発現に重要なアミノ酸残基は保存されていることが知られている。酵素熱安定性の向上の為には、活性を失わない範囲でのアミノ酸置換を導入する必要があるので、相同性の高いアミノ酸は置換しないようにした。

② 統計的処理に基づく熱安定性向上に寄与するアミノ酸置換を導入する。

緒論で述べたArgosらは、フェレドキシン、グリセルアルデヒド-3リン酸脱水素酵素及び乳酸脱水素酵素についてアミノ酸配列を比較した。熱安定性に関与するアミノ酸置換はその寄与の度合の大きい順に、Gly→Ala, Ser→Ala, Ser→Thr, Lys

→Arg, Asp→Glu, Ser→Gly, Lys→Ala, Val→Ala, Asp→Asn, そしてVal→Ileであると報告している(85)。この結果は、サンプル数が少ない点など問題点もあるが変異導入の際に参考とした。

③ 酵素立体構造の情報をもとにα-ヘリックス構造を安定化し内部疎水性を高める置換を導入する。

第2章でも述べたが、B. stearothermophilusCU21由来耐熱性中性プロテアーゼ(NprT)のアミノ酸配列はB. thermoproteolyticus由来のサーモライシンと約85%のホモロジーを有している。サーモライシンについては既に三次元構造の決定が為されているのでその情報を参考にした(50)。

以上の3項目を念頭において、B. stearothermophilus CU21中性プロテアーゼのアミノ酸配列を解析した。

中性プロテアーゼのアミノ酸配列は、B. subtilis(22), B. amyloliquefaciens(46), B. thermoproteolyticus(34), 及びB. stearothermophilus(89)由来のものについて既に明らかにされており、それらを比較して相同性の高い領域を中心に並べた(図4-1)。四角で囲んでいる領域は、4種類の中性プロテアーゼに共通の相同性の高いアミノ酸残基を示している。9箇所の相同領域のうちサーモライシンで活性中心である事が判っているHis231, 基質結合部位であるArg203(90)は、相同性の高い領域内に存在しており、他の3種類のプロテアーゼにおいてもそれらの残基は完全に保存されていた(B. stearothermophilus由来では、His234, Arg206)。酵素の活性発現に必須の亜鉛イオン、安定性に重要な役割を担うカルシウムイオンの結合部位(各々残基の上にZ及びCで示している)も良く保存されていた。これら保存されているアミノ酸は置換しない事とした。

次に各配列中にArgosらの挙げている熱安定性の向上に寄与するアミノ酸置換の有無を、サーモライシンとB. stearothermophilus由来プロテアーゼ(NprT)の間で調べた。アミノ酸置換の内上位3種類に属するもの(Gly→Ala, Ser→Ala, Ser→Thr)を挙げ、サーモライシンからNprTに向かって耐熱性の向上すると考えられる置換の場合(+)を、低下すると考えられる置換の場合(-)を図4-1の残基の上に示した。酵素熱安定性向上に最も寄与し得る置換(Gly→Ala)が、Gly47, Gly61, 及びGly144に存在した。NprTのアミノ酸配列は、サーモライシンのものと相同性が高く、立体構造上でも類似の構造をしている可能性が高い(図4-2)。サーモライシンの三次構造

```
                 .         .     -   .         .     -+ .         C
B.st. VAGASTVGVGRGVLGDQKYINTTYSSYYGYYYLQDNTR  GSGIFTYDGRNRT VLPGSLWTD 60
B.th. ITGTSTVGVGRGVLGDQKNINTTYSTYY   YLQDNTR  GDGIFTYDAKYRT TLPGSLWAD
B.su.  AAA T GSGTTLKGATVPLN  ISYEGGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNRQSRLPGTLVSS
B.am.  AAT T GTGTTLKGKTVSLN  ISSESGKYVLRDLSKPTGTQIITYDLQNREYNLPGTLVSS

      A(M2) S(M3)
      ↑     ↑
      -C
                 .         .         .         .     +   .         .
B.st. GDNQFTASYDAAAVDAHYYAGVVYDYYKNVHGRLSYDGSNAAIRSTVHYGRGYNNAFWNG 120
B.th. ADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAAIRSSVHYSQGYNNAFWNG
B.su. TTKTFTSSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYSNFKRNSYDNKGSKIVSSVHYGTQYNNAAWTG
B.am. TTNQFTTSSQRAAVDAHYNLGKVYDYFYQKFNRNSYDNKGGKIVSSVHYGSRYNNAAWIG

                                A(M1)
                                ↑
                 .         .C   -Z   Z.         .         Z.         C
B.st. SQMVYGDGDGQTFLPFSGGIDVVGHELTHAVTDYTAGLVYQNESGAINEAMSDIFGTLVE 180
B.th. SEMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVAHELTHAVTDYTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTLVE
B.su. DQMIYGDGDGSFFSPLSGSLDVTAHEMTHGVTQETANLIYENQPGALNESFSDVFG
B.am. DQMIYGDGDGSFFSPLSGSMDVTAHEMTHGVTQETANLNYENQPGALNESFSDVFG

            C .  CC      .+ C+      .         .         .         .
B.st. FYANRNPDWEIGEDIYTPGVAGDALRSMSDPAKYGDPDHYSK RYT   GTQDNGGVHTNSGII 240
B.th. FYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRSMSDPAKYGDPDHYSK RYT   GTQDNGGVHINSGII
B.su.  YFNDTEDWDIGEDI T  VSQPALRSLSNPTKYNQPDNYANYRNLPNTDEGDYGGVHTNSGIP
B.am.  YFNDTEDWDIGEDI T  VSQPALRSLSNPTKYGQPDNFKNYKNLPNTDAGDYGGVHTNSGIP

                 .         .         .         .         .   +     .
B.st. NKAAYLLSQGGVHYGVSVNGIGRDKMGKIFYRALVYYLTPTSNFSQLRAACVQAAADLYG 300
B.th. NKAAYLISQGGTHYGVSVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQSAYDLYG
B.su. NKAAYNTITK          LGVSKSQQIYYRALTTYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYG
B.am. NKAAYNTITK          IGVNKAEQIYYRALTVYLTPSSTFKDAKAALIQSARDLYG

                 .
B.st. STSQEVNSVKQAFNAVGVY 319
B.th. STSQEVASVKQAFDAVGVK
B.su. STD  AAKVEAAWNAVGL
B.am. SQD  AASVEAAWNAVGL
```

図4-1. 各種菌体外中性プロテアーゼアミノ酸配列の比較. アミノ酸は一文字表記で示した. 1. B. stearothermophilus, 2. B. thermoproteolyticus 3. B. subtilis 4. B. amyloliquefaciens 由来である. 相同領域は四角で囲み, 活性中心, 基質結合部位はそれぞれ ○ と □ で示した. Zn イオン及びCa イオンに配位している残基をアミノ酸の上に示した. B. stearothermophilus由来プロテアーゼを, B. thermoproteolyticus由来プロテアーゼと比較して熱安定性が向上又は低下する可能性のある残基を＋又は－でそれぞれ示した. 矢印は置換した残基を示す.

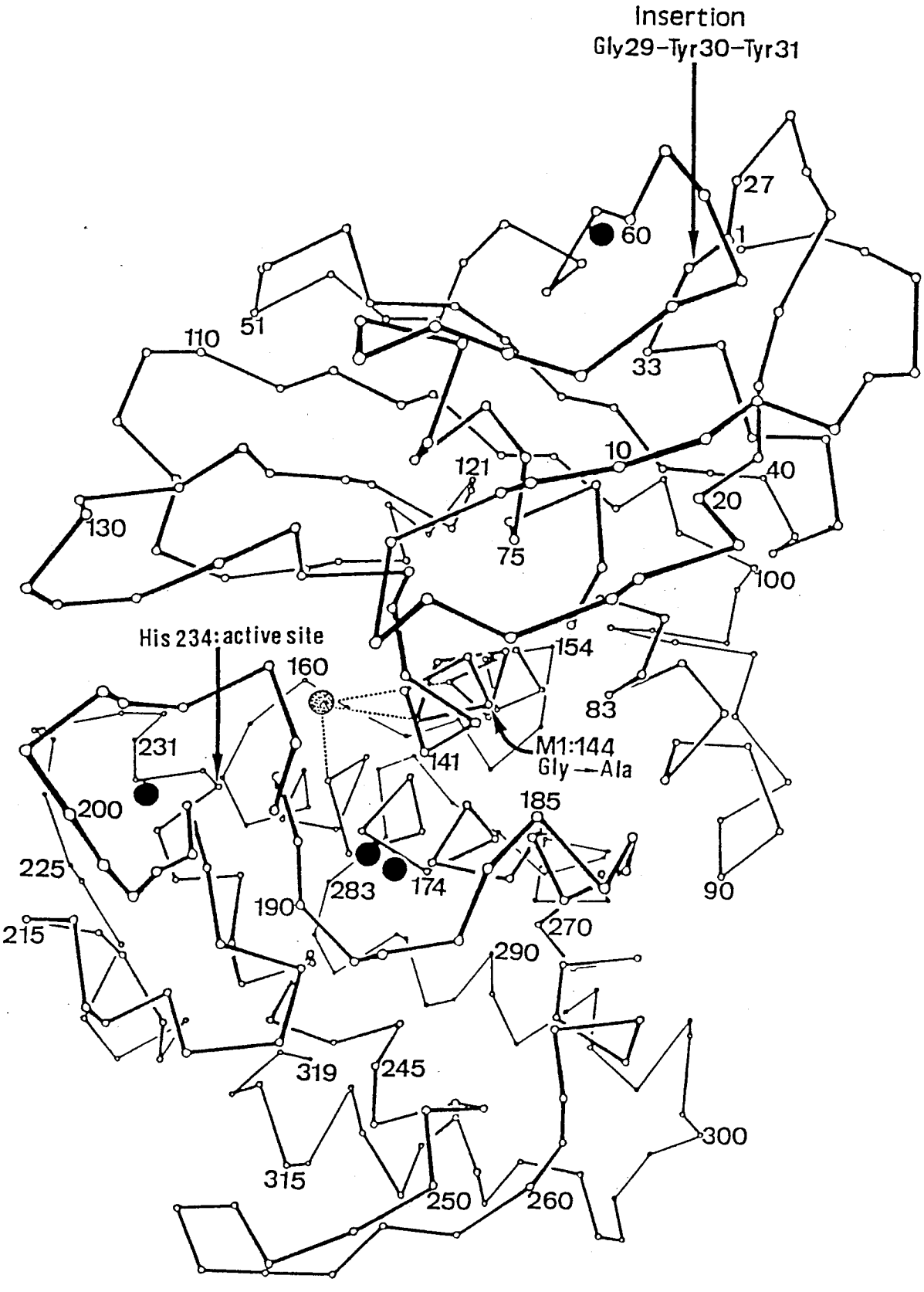


図4-2. サーモライシンの3次元構造. ○ はアミノ酸残基の位置を、● はカルシウムイオンを、 ◎ は亜鉛イオンを示している. アミノ酸の番号は B. stearothermophilus 中性プロテアーゼに合わせており, サーモライシンでは, Gly29-Tyr30-Tyr31が欠失している.

(50)をもとにNprTの立体構造を示したのが図4-2である。両者は、NprT側にGly29-Tyr30-Tyr31の挿入があることを除けば同様の構造をしている。構造上から言うと前出のGly144は酵素分子内部のα-ヘリックス構造内に存在している。

これらの事実より、酵素熱安定性向上のためのアミノ酸置換導入部位3箇所を決定した。 まず熱安定性向上をもたらす置換としてGly144をAlaに変える置換(M1)、次にGly61をAlaに変える置換(M2)、そして熱安定性を低下させる置換としてThr66→Ser(M3)を行うことに決めた。

4. 3. 2. 変異の導入

B. stearothermophilus由来の中性プロテアーゼ構造遺伝子(nprT)をクローニングしたプラスミドpNP22-2には酵素成熟領域の殆どを間に含んだ2ケ所、構造遺伝子上流領域に1ケ所のSalI切断点部位が存在している(89)。そこで変異を含む成熟領域を効率良く枯草菌に導入するために遺伝子上流のSalI切断点の除去を行った。即ち、pNP22-2をSalIで部分分解し、エキソヌクレアーゼBal31によってSalI部位の除去をおこない、その結果構築されたプラスミドをpNP22-3と命名した(図4-3)。

pNP22-3をSalIで切断して得られる888bpの断片内には、成熟タンパク質領域のほぼ全体が含まれる。そこでこのSalI断片をファージM13mp11のマルチクローニングサイト内のSalI部位にクローニングして、一本鎖DNAを調製した。挿入方向に合わせて合成した変異導入オリゴヌクレオチドを用いて鋳型一本鎖を二本鎖に修復した。修復したDNAよりEcoRI-PstI小断片を抽出して、pBR322のEcoRI-PstI間に挿入後E. coli C600-1を形質転換し、テトラサイクリン耐性株を選択した。

形質転換体からプラスミドを抽出後、制限酵素で切断して、例えばM1変異が導入されればHhaI切断点が新たにできる。このような制限酵素切断点の新たな付加を目安に変異が導入されたプラスミドを選択した。 更に塩基配列決定によって変異導入の確認を行った。 また二重変異(M13, M23)および三重変異(M123)の導入は制限酵素切断点を用いた断片交換によって行った。

変異の導入が確認されたプラスミドより888bpのSalI断片を抽出して、pNP22-3の同断片を欠くプラスミドpDMP10のSalI切断部位に挿入して、枯草菌内で変異型酵素遺伝子を発現させた(図4-3)。

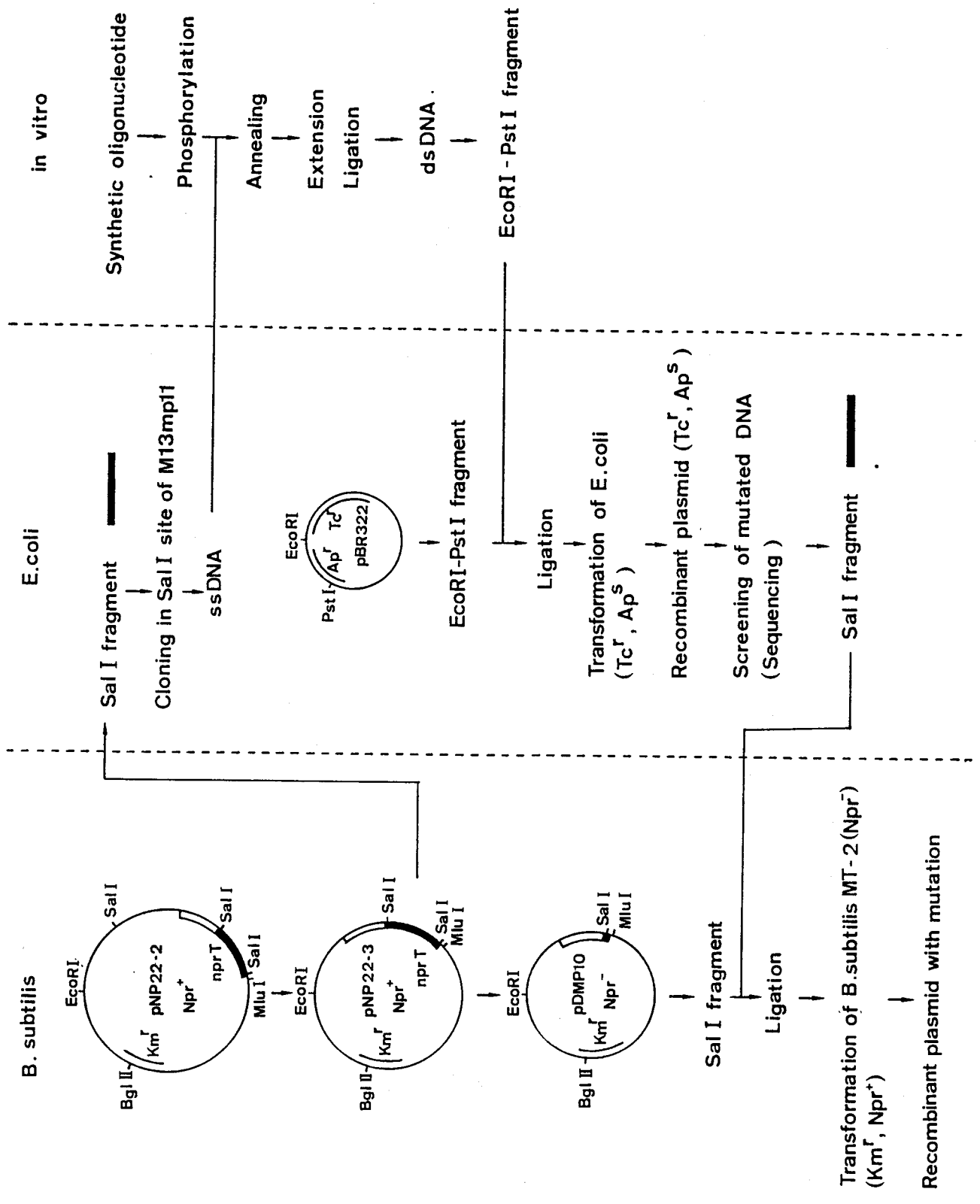


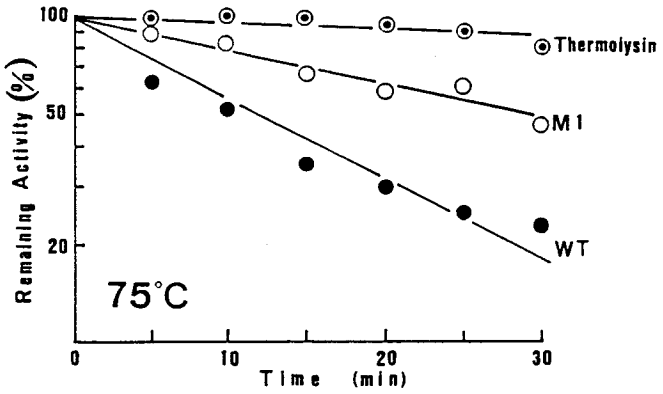
図4-3．部位特異的変異操作およびプラスミドの構築法．pNP22-2はpNP22-1由来の欠失プラスミドである．pNP22-2のSalI切断点1箇所をエキソヌクレアーゼBal31により消去し(pNP22-3)，更に成熟タンパク質領域を欠失させたのがpDMP10である．成熟領域(SalI断片)をM13ファージにクローニングし部位特異的変異操作を行った．変異断片は再びSalIを介して枯草菌ベクターpDMP10に挿入して変異酵素を生産するベクターを構築した．

4．3．3．　熱安定性の比較

それぞれの変異プロテアーゼを生産する組み換えプラスミド保持株を培養後、DEAE-SephadexA50を用いて精製し、熱安定性を比較した。野生型酵素(WT)、変異型酵素M1、並びにサーモライシンについて75°Cで30分間熱処理を行い、それぞれの残存活性を比較した(図4-4)。サーモライシンは30分後で80%以上の残存活性を示しており非常に熱に対して安定であることが判った。他方、野生型酵素については同一条件で20%程度にまで活性が低下している。 変異酵素M1では30分後の残存活性が50%でありGly144→Alaにより予測どおり熱安定性が向上していると考えられた。

次に、野生型酵素と変異酵素M3(Thr66→Ser)の熱安定性を65°Cで比較した。野生型酵素は80%以上の残存活性を示したが、変異型酵素M3は同条件で20%以下になっており置換(Thr66→Ser)による熱安定性の低下が認められた(図4-5)。

このM3変異による熱安定性の低下を回復させるために、M3変異にM1変異を加えた二重変異M13を作製して酵素熱安定性を調べたがその熱安定性はM3酵素と同じであった。同様にしてM23の二重変異酵素も作製したが熱安定性に変化は無かった。しかしながらM3変異にM1,M2の両変異を加えた三重変異(M123)では、65°C，30分後の残存活性が約50%と部分的な熱安定性の回復が認められた(図4-5)。



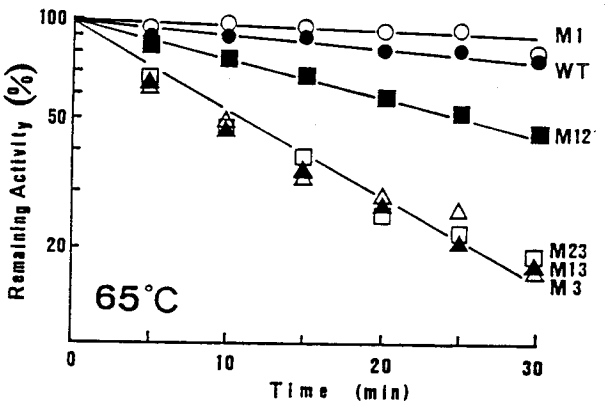


図4-4．変異型酵素M1の熱安定性(75°C)．

図4-5．各種変異酵素の熱安定性(65°C)．● 野生型(WT)，○ 変異型酵素(M1)，△ 変異型酵素(M3)，▲ 二重変異酵素(M13)，□ 二重変異酵素(M23)，■ 三重変異酵素(M123)をそれぞれ示している．

第4節　考察

部位特異的変異操作により、アミノ酸置換を導入してタンパク質機能の改変を試みる場合に、常に問題となるのはどのアミノ酸残基をどのアミノ酸残基に置換するかという方針の設定である。例えば熱安定性向上のためにはタンパク質構造を強固にするアミノ酸置換を導入するということが当然考えられる。事実、同一機能を有する常温菌由来のタンパク質と好熱菌由来のタンパク質を比較すると酵素構造の安定化は分子内部の疎水性を高め、α-ヘリックス及びβ-シート構造をより安定化することにより達せられている事が判っている。この条件のみならば、酵素熱安定性向上の計画は比較的容易に立てられるのだが、酵素構造の安定化も活性の発現を無視して行えないのでアミノ酸置換を主鎖の立体構造を大きく変えない範囲内で行う、という前提条件が更に必要になる。主鎖の立体構造を決定する要素は、やはり一次構造、則ち、アミノ酸配列によって規定されているのは間違いない。 ところが、現時点において一次構造から三次構造を予測する一般的な方法は存在せず、一次構造から二次構造を予測する方法であるChouとFasmanの判定方法にしてもその的中率は60-70%程度である(91)。この理由の一つには、統計処理に用いたタンパク質のサンプル数が少ない為であるが、主な理由としては、二次構造の形成が単にアミノ酸残基とその一次配列上で近傍に存在する残基によって影響されるだけでなく、アミノ酸配列上では離れているペプチド領域とも高次構造形成において相互に影響を及ぼし合っていることが構造予測を困難にしているのである(92)。 予測法に頼らず主鎖の立体構造を決定する上で最も有効な手段はX線結晶解析である。ところがこの方法においては、構造解析に適した良質のタンパク質結晶を取得する必要があるのだが、実際結晶化における一般的な方法論は全くなく、先にも述べたが現在までに構造解析がなされたタンパク質は約300種類にすぎない。

本研究で用いた耐熱性中性プロテアーゼは、互いに相同性が高く酵素学的にもよく研究されているサーモライシンの高次構造が判っていること、他の3種類の同一機能を有するプロテアーゼのアミノ酸配列が既に決定されていることから計画的酵素耐熱性向上の材料としては非常に適していた。 三次構造が明らかになっていることより置換を導入するアミノ酸残基周辺の立体配置や、置換のもたらす構造上の影響が非常に予測しやすい。例えばM1置換(Gly144→Ala)は分子内部の疎水性を高め、α-ヘリックス構造を安定化させる設計基準の③に準じた理想的な構造安定性をも

たらす置換であったことが言える。しかも主鎖の立体構造の構成、また酵素活性の発現に重要な役割を担う残基を4種類のプロテアーゼ間の相同アミノ酸残基によって予測することができることより、アミノ酸置換の活性発現への影響を事前に判定できる。現在、種々の酵素についてアミノ酸配列が明らかになりつつあるが、プロテアーゼ以外の酵素で、しかも立体構造が明らかになっていないものであっても、配列から二次構造や疎水領域を予測し(91,93)、更にアミノ酸配列の相同性を解析する手法により活性発現に最小限必要なアミノ酸残基を規定すれば、本プロテアーゼの場合と同様のプロセスにより耐熱性向上のための置換残基の方針決定が行えるであろう。またこのような実験データの蓄積が構造予測の確率を向上させる。

4種類の中性プロテアーゼのアミノ酸配列を比較した結果、9個所の相同領域が存在したことについては既に述べたが、好熱菌由来と常温菌由来のプロテアーゼの間での比較において、Thr177からPhe181までの5残基が常温菌由来のプロテアーゼでは欠失している事が判る。これらの残基のうちGlu180はカルシウムイオンに配位していることがサーモライシンの構造決定により示されており(50)、この領域の欠失が常温菌由来プロテアーゼの熱安定性を低下させている原因であろうと考えられる。

このようにアミノ酸配列相同領域の検索とその解析は非常に多くの情報を提供するので、今後コンピュータ等の機器を用いて広範に実施されると予想される。

今回、アミノ酸置換の方向づけにおいて参考にしたArgosらの統計データは、1979年の報文に発表されたものである為、タンパク質の種類は僅か3種類、生物種にして、のべ15種類でしかなく統計上のサンプル数が少ないことは否定できない。

また生物種は細菌から哺乳動物まで多彩であるためアミノ酸置換において熱安定性以外の要素(例えば原核生物と真核生物の違い等)が反映している可能性もある。だが、結果として現れた熱安定性向上に効果があると考えられるアミノ酸置換の多くが、疎水性を高める方向に、またα-ヘリックス構造を安定化する方向に向かっている点でこれらのデータの妥当性が認められる。現時点において相当数のタンパク質のアミノ酸配列が明らかになっていることから、それらを通してより信頼性の高い統計処理が行えるであろう。

酵素熱安定性の向上が僅か1アミノ酸残基の置換によって起きることは我々の研究室においてもカナマイシン不活化酵素の解析(87)によって示されたが、今回の実験結果からもM1変異(Gly144→Ala)により熱安定性の向上が認められた。しかし熱安

定性の低下した変異酵素(M3;Thr66→Ser)の安定性回復のためにはM1変異のみでなくM2変異(Gly61→Ala)を導入する必要があったことから、タンパク質構造の熱安定化は各アミノ酸残基の相加的な効果ではなくむしろ協同的な効果によって起こっていると考えられる。これは正にタンパク質立体構造が、その構成するアミノ酸残基の協同的な作用によって形作られていることを裏付けていると言えよう。

今後これらの野生型及び変異型酵素の立体構造が決定できれば、より詳細に酵素熱安定化機構が解析でき、より計画的な酵素改変の分子設計が可能になると考えられる。

第5節　要　約

1. 好熱菌B. stearothermophilus由来耐熱性中性プロテアーゼの酵素熱安定性向上をより計画的に行うために3つの設計基準を設けた。その基準に従って同一機能異種起源の中性プロテアーゼ間の相同領域を調べた結果、金属イオンに配位している残基や、活性発現に重要な役割を担う残基はよく保存されている事が判った。
2. 酵素分子の内部疎水性を高め、α-ヘリックス構造を安定化する置換であるM1(Gly144→Ala)を野生型酵素(WT)に導入した結果、75°C 30分後の残存活性はM1が50%であったのに対しWTでは20%であった。したがって予想通り酵素熱安定性が向上していた。
3. β-シート構造内に存在する熱安定性が低下すると予測される置換M3(Thr66→Ser)を導入した結果熱安定性の低下が認められ、65°C, 30分後の残存活性がWTで80%, M3では20%以下であった。
4. M3置換によって低下した熱安定性を回復させるためにM3にM1置換を加えた二重変異M13並びにM2置換(Gly61→Ala)を加えたM23を作製したが両酵素の熱安定性はM3酵素と全く同じであった。しかし三重変異M123の熱安定性は部分的に回復が認められ、酵素M123の65°C, 30分後の残存活性は50%であった。このことより酵素熱安定性は各アミノ酸残基の協同的な効果によって達成されると考えられた。

第５章　変異酵素における基質特異性の変化

第１節　緒言

酵素タンパク質の熱安定性向上が、僅か１アミノ酸残基の置換という微小な構造変化によって達成されることについて第4章で述べた。Bacillus stearothermophilus由来中性プロテアーゼの熱安定性向上に有効であったアミノ酸置換M1(Gly 144→Ala)は、直接タンパク質分解活性に関わる位置の残基ではない。しかし、この位置のアミノ酸残基はN末端側のドメインとC末端側のドメインを結ぶα-ヘリックス構造内に存在し、この領域周辺には酵素活性発現に重要な役割を担うアミノ酸残基が集中して存在する基質結合部位にあたる。従って、この領域におけるアミノ酸置換がもたらす構造変化の活性に与える影響には無視できないものがあると考えられる。プロテアーゼのアミノ酸置換と酵素活性の関係は Bacillus属細菌の生産するアルカリプロテアーゼであるサチライシンにおいて良く研究されており、基質特異性の変換(94,95)や、反応中間体の検討(96,97)が為されている。他方中性プロテアーゼの基質特異性についてはオリゴペプチドを使用したミカエリス定数 (Km)やターンオーバー数(k_{cat})の測定が為され、一般に分子量の大きな疎水性アミノ酸残基(Leu,Phe等)の前で良く切断することがサーモライシン(75,98)やBacillus subtilis由来の中性プロテアーゼ(99)の酵素学的研究で明らかになっている。

ここでは、第1、2章でクローニングし、塩基配列決定を行ったB. stearothermophilus由来野生型中性プロテアーゼ(WT)、また第4章で部位特異的変異操作により熱安定性が向上した変異酵素(M1:Gly144→Ala)を材料として、アミノ酸置換の活性発現に与える影響を異なった基質を用いて調べ、更に本プロテアーゼの基質特異性について比較考察した。

第２節　実験材料及び方法

使用菌株及びプラスミド

実験に使用した菌株及びプラスミドを表5-1に示した。

表5-1

菌株	特性	文献
B. subtilis MT-2	trpC2 leuC7 hsdR hsdM Npr^-	(35)

プラスミド	特性	文献
pNP22-3	Km^r $nprT^+$(野生型)	(69)
pNP22-3(m1)	Kmr $nprT^+$(変異(Gly144→Ala))	(69)

枯草菌B. subtilis MT-2株は組み換えプラスミドの宿主菌として用いた。またプラスミドpNP22-3及びpNP22-3(m1)は、それぞれ第4章で述べた野生型及び熱安定性の向上した変異型耐熱性プロテアーゼ (M1)をクローニングした組み換えプラスミドである。

培地

B. subtilis用の完全培地としてはL培地を用いた。固形培地として用いる時には寒天を1.5%加え、薬剤を加える場合は、カナマイシンを5μg/mlの濃度になるように添加した。酵素取得の際には、第1章で述べた酵素生産用培地、YPC培地を用いた(35)。

緩衝液

DNAはTE緩衝液(10mM トリス塩酸塩，0.1mM エチレンジアミン四酢酸，pH8.0)に、酵素は酵素用緩衝液(50mM トリス塩酸塩，5mM 塩化カルシウム，pH7.5)に、それぞれ溶解した。

プロテアーゼの精製

プロテアーゼ遺伝子をコードするプラスミド保持株をカナマイシンを含むYPC培

地を用いて40°C 一晩培養した。遠心集菌後上澄液を限外濾過膜(選択分子量10,000)により濃縮し、第1章で述べた方法によりイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。2度目のクロマトグラフィーの後に、TSK-gel G2000SWを用いた高速液体クロマトグラフィーにより完全に純品になるまで精製した。

プロテアーゼの活性測定

カゼインを基質とした場合については第1章で既に述べた通りである。インスリンA,B鎖及び可溶性還元リゾチームを基質とした場合は、反応により生じた分解物によるN末端数の増加をニンヒドリン反応により測定する方法により活性を測定した。基質(2.5mg/mlの濃度になるようにそれぞれのペプチドを酵素緩衝液に溶かしたもの)360μlに純品酵素液40μlを加えて撹拌した後37°Cで保温した。基質と酵素を混合した時点を0分と定め、20分まで5分毎に20μlずつサンプリングした。反応停止には酢酸180μlを添加した。総量200μlになった各サンプルに200μlニンヒドリン試薬(2%(w/v)ニンヒドリン, 0.15%(w/v)ヒドリンダンチンになるように4M 酢酸緩衝液(pH5.5), 75%(v/v) 2-メトキシエタノールに溶かしたもの)を加えて100°Cで15分間加熱した後50%エタノールで6倍希釈した。それぞれのタンパク質凝固物を 0.45μmメンブレンディスクにより濾過後、570nmにおける吸光度を測定して反応初速度を求めた。酵素活性は ΔA_{570}/min•mg protein の値によって比較した(100)。

高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィーを酵素精製の最終段階並びにインスリンA鎖分解産物の分取に使用した。酵素精製の場合、イオン交換クロマトグラフィー終了後のサンプルについてTSKgelG2000SWを用いて精製した。溶離液として酵素緩衝液を用い、流速1.0ml/min にて行った。インスリンA鎖の分解産物を分取する際には、カラムとしてTSKgel ODS-80TMを、溶離液としてA:20%アセトニトリル(0.1% HCl), B:80%アセトニトリル(0.1%HCl)でAからBに流速0.5ml/min, 30分間のリニアグラジエントを行った(101)。

酵素の反応定数(Km, k_{cat})の測定

オリゴペプチド(2(Benzyloxycarbonyl)-L-Gly-L-Leu-NH_2: 以後Z-Gly-Leu-NH_2)

を基質として用いてKm，k_{cat}値の測定を行った。基質Z-Gly-Leu-NH2を酵素緩衝液に溶かして10mM，6.7mM，5mM，4mM，及び3.3mMの各基質溶液を用意した。各濃度の基質溶液2mlに等量の酵素液を加えて反応を開始し、0から60分まで10分毎に200μlずつサンプリングし、氷冷した酢酸100μlを加えて反応を停止した。その後、蒸留水700μlとニンヒドリン溶液1mlを加えて撹拌後15分間煮沸し、水で冷却後5mlの50%エタノールで希釈して波長570nmでの吸光度を測定した。 Leu-NH_2を標準として反応初速度を求めLineweaver-BurkプロットによりKm，k_{cat}値を決定した(102)。

タンパク質濃度の定量

タンパク質濃度はPierce Chemical Co.のBCA Protein Assay Reagentを用いその説明書に従って決定した。 その際標準試料として牛血清アルブミンを用いた。

その他の方法

枯草菌のコンピテントセル法による形質転換、及び酵素タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などは第1章で述べた方法に従って行った。

第3節　結 果

5．3．1．　カゼインを基質とした比活性の比較

組み換えプラスミドpNP22-3及びpNP22-3(m1)を保持する枯草菌B. subtilis MT-2株をそれぞれ酵素精製用培地YPCを用いて培養し、その上澄液から野生型酵素(WT)及び変異型酵素(M1)を精製し、電気泳動的に単一のバンドとなるような酵素標品を取得した。各酵素のタンパク質濃度を測定し、またカゼインを基質とした活性を測定した。 それらの結果から各酵素の比活性を算出し、WT酵素の比活性は33600(units/mg protein)またM1酵素の比活性は50500(units/mg protein)となった。WT酵素を1とした場合のM1酵素の比活性は、1.50とM1の方が約50%比活性が高くなる傾向を示した。この結果は、アミノ酸置換(m1: Gly144→Ala)が第4章で述べた酵素の熱安定性向上のみならず加水分解活性の発現にも影響していることを示している。

5. 3. 2. 可溶性還元リゾチーム、インスリンB鎖及びインスリンA鎖を基質とした場合の比活性の比較

カゼインのような複合基質ではなく、より分子量の小さい、そしてアミノ酸配列の明らかになっている還元型のペプチドを利用してWT酵素とM1酵素の比活性を比較した。 基質としての可溶性還元リゾチーム(129アミノ酸残基、分子量14300)(103)を酵素(M1,WTそれぞれ40μl;20μg プロテアーゼ)と混合して活性を測定した結果が図5-1(A)である。この結果から反応初速度を求めて比活性を計算した。その結果WT酵素の比活性は、0.35 (ΔA_{570}/min・mg protein)、M1の比活性は0.29(ΔA570/min・mg protein)であった。従ってカゼインの場合とは逆に可溶性還元リゾチームを基質とした場合、変異型酵素(M1)の方が比活性が17.2%低かった。更に同様にしてインスリンB鎖(30アミノ酸残基、分子量3496)を基質とした場合の比活性は、WTの場合0.38(ΔA_{570}/min・mg protein)であり、又M1の場合0.29(ΔA_{570}/min・mg protein)であった(図5-1(B))。 従ってインスリンB鎖を基質とした場合にもM1の方が13.2%比活性が低くなる傾向を示した。 このように酵素M1の比活性が低くなる現象は、より小さな基質、インスリンA鎖(21アミノ酸残基、分子量2530)を用いた場合に顕著に現れ、変異型酵素M1によるインスリンA鎖の分解を、ニンヒドリン反応により検出することができなかった。

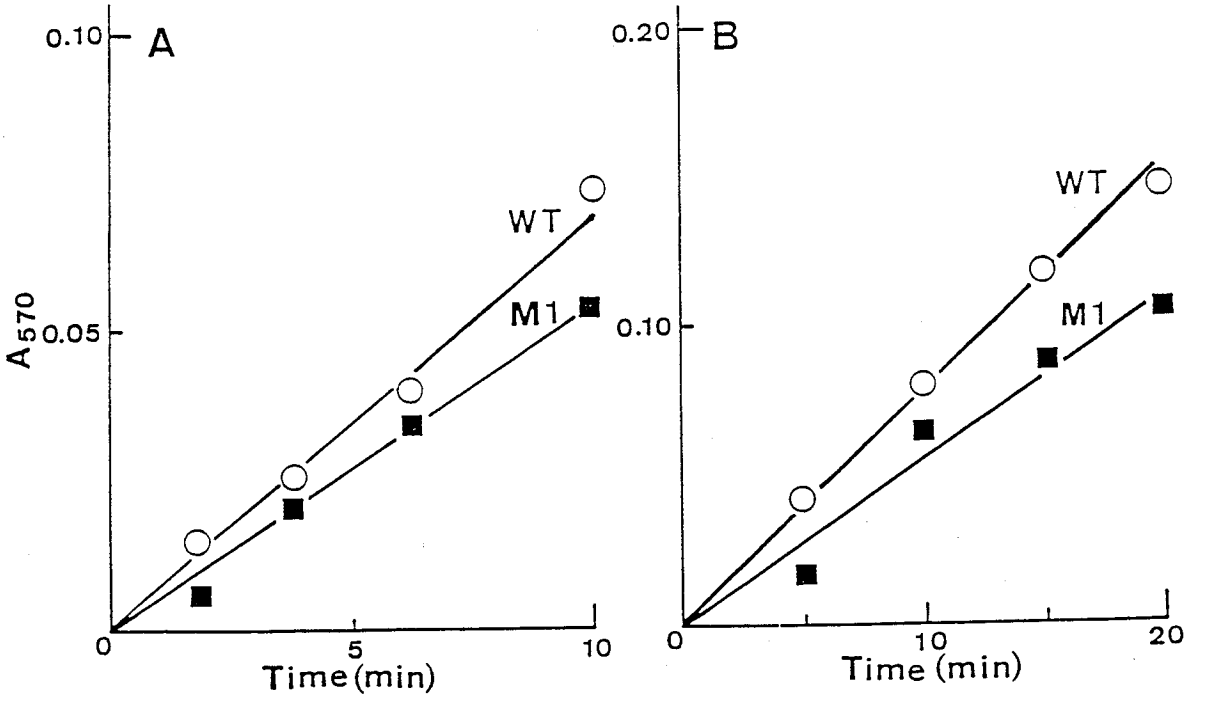


図5-1. 可溶性還元リゾチーム(A), 及びインスリンB鎖(B)のプロテアーゼによる加水分解.

5．3．3．　インスリンＡ鎖を基質とした場合の酵素基質特異性

インスリンＡ鎖の配列のどの部分を認識して野生型酵素はペプチド結合を切断しているかを調べるために、酵素による分解産物の分取を行った。WT酵素とインスリンＡ鎖との反応を20分間に延ばし、酢酸(360μl)の添加によって反応を停止した後にHPLCを用いた逆相カラムクロマトグラフィー(ODS-80TM)を行い分解産物の分析を行った(図5-2(A))。 6種類の溶出物の内、2種類の大きなピークに相当する物質は、反応停止に使用した酢酸と未分解の基質(インスリンＡ鎖)であったが、他の4種類は分解物に相当すると考えられた。 しかしながら、変異型酵素M1による同一条件における分析の結果、分解産物の検出は、できなかった(図5-2(B))。そこで前述の4種類の分解産物に相当するピーク画分を分取後凍結乾燥して、N末端アミノ酸残基を各4残基ずつ決定し、インスリンＡ鎖のアミノ酸配列と比較した(図5-3)。この結果より酵素WTは少なくとも3箇所、Ile又はLeuの前でインスリンＡ鎖を切断することが判明した。

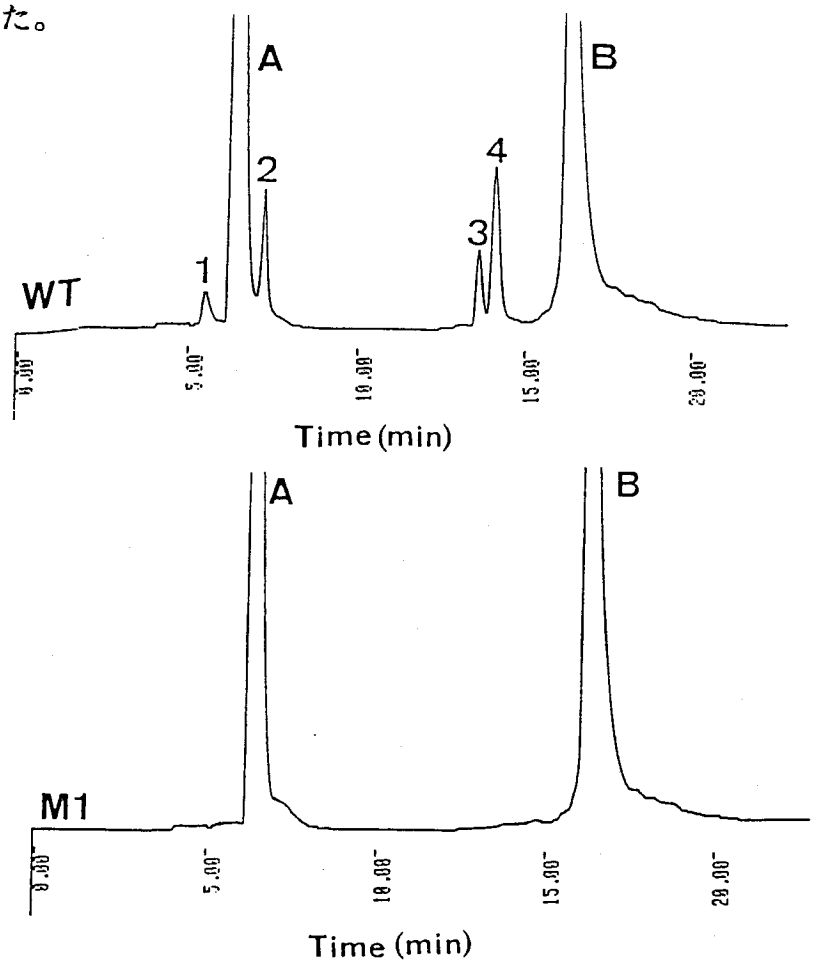


図5-2．インスリンＡ鎖の野生型酵素(WT)(A)，及び変異型酵素(M1)(B)による分解産物．A，及びBで示した大きなピークは，それぞれ反応停止に使用した酢酸，及び未分解のインスリンＡ鎖に相当する．

Insulin A Chain	1 Gly ▼ Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser 10 Val Cys Ser ▼ Leu Tyr Gln ▼ Leu Glu Asn Tyr Cys 21 Asn
Peak 1	2 Ile Val Glu Gln
Peak 2	16 Leu Glu Asn Tyr
Peak 3	13 Leu Tyr Gln Leu
Peak 4	1 Gly Ile Val Glu

図5-3. 分解産物のアミノ酸配列. 図5-2(A)に示した分解物 1 - 4 のN末端アミノ酸配列をインスリンA鎖のアミノ酸配列と比較した.

5. 3. 4. 酵素反応特性の検討

変異型酵素M1がインスリンA鎖を切断できない現象には、2つの原因が考えられる。第一には変異酵素が基質との結合体を作れない場合、第二には、酵素の加水分解能が大きく低下した場合である。このどちらが主要な原因であるかを解析するために、まず酵素とインスリンA鎖の結合状態に関して考察を加えた。酵素標品をインスリンA鎖(2.5mg/ml)と混合して37°Cで20分間保温し、次に400μlのカゼイン(2%)を加えインスリンA鎖がカゼイン加水分解能を阻害するか否かについて調べた。もし変異型酵素M1において阻害が認められればインスリンA鎖は基質と相互作用していることになる。実験の結果、WT酵素の場合インスリンA鎖による阻害は認められなかったが、M1酵素の場合加えた酵素活性の約32%が阻害された。従ってインスリンA鎖と変異型酵素M1とは基質-酵素複合体を形成するが酵素が基質を加水分解しないために、酵素から基質が外れず、結果的に活性中心部位をマスクしてしまっていると推察された。

更に直接的、また定量的にM1酵素における加水分解能の低下を示すために、合成オリゴペプチドである2(ベンジルオキシカルボニル)-L-Gly-L-Leu-NH_2(以後Z-Gly-Leu-NH_2)を基質として用いてKmとk_{cat}の測定を行った。

各基質濃度での反応初速度を求めて、Lineweaver-BurkプロットによりKm, k_{cat}値を測定した。酵素反応温度を37°Cと50°Cの2種類に設定して測定を行い、得られた結果を表5-2(A)(B)に示した。

表5-2(A) 反応温度 37°C

プロテアーゼ	Km(mM)	$k_{cat}(min^{-1})$	$k_{cat}/Km(min^{-1}/mM)$
野生型(WT)	26	830	33
変異型(M1)	25	240	10

表5-2(B) 反応温度 50°C

プロテアーゼ	Km(mM)	$k_{cat}(min^{-1})$	$k_{cat}/Km(min^{-1}/mM)$
野生型(WT)	29	1400	48
	(1.1)*	(1.7)	(1.5)
変異型(M1)	30	430	14
	(1.2)	(1.8)	(1.4)

＊：50°Cでの値と37°Cでの値の比 (50°C/37°C)

表5-2の結果より、野生型酵素(WT)と変異型酵素(M1)では、基質との親和性に対応するKm値に顕著な差は無いが、触媒活性能に相当するk_{cat}においては3倍以上WTの方が高い値を示している事が判る。この傾向は温度を50°Cに上げて実験を行った場合にも認められた。従って、この特性は、先の仮説に矛盾するものではないといえる。

第4節　考察

タンパク質工学的手法によって熱安定性の向上した変異型酵素（M1：Gly144→Ala）のタンパク質分解活性を野生型と比較した。カゼインを基質とした場合、変異型酵素M1は野生型より約50%高い比活性を示すことが判った。しかし可溶性還元リゾチーム、インスリンB鎖及びインスリンA鎖を基質として用いた場合には、いずれも野生型酵素の方が高い比活性を示したことより、酵素の熱安定性のみならず触媒活性も僅か1アミノ酸残基の置換により変化すること、そしてその比活性が基質として用いるペプチドの種類を変えることによって野生型酵素と変異型酵素M1の間の優劣に差が生ずることが判った。

耐熱性中性プロテアーゼの基質特異性を、インスリンA鎖の分解産物を同定することにより決定し、ロイシン又はイソロイシンのN末端側でペプチド結合を切断することが判った。この基質特異性は既に報告のあるサーモライシンの場合と全く同じであった(97)。

サーモライシンの結晶解析から導かれた基質の結合状態及び切断過程を模式化したのが図5-4である(104)。

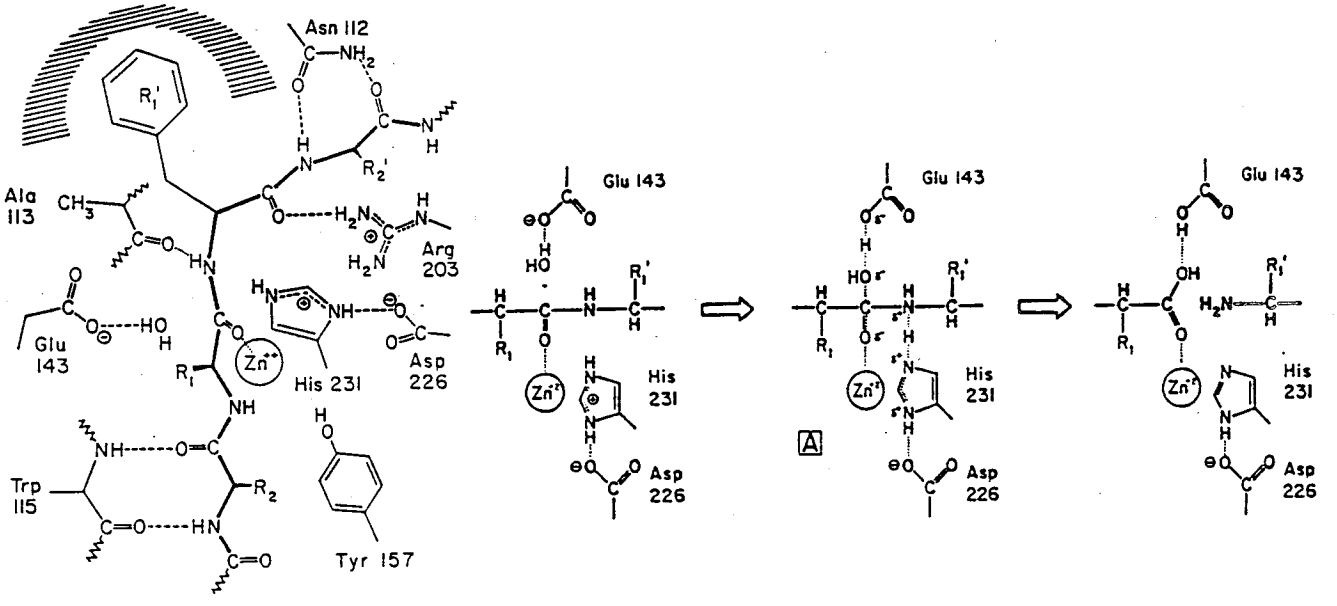


図5-4．サーモライシンの活性中心部位と基質(阻害剤)の結合状態(A)，並びにサーモライシンの触媒活性発現機構．

反応は酵素と基質の結合状態から、Glu143 (NprTではGlu146)のCOOH基が水分子の求核攻撃を促進し、また結合部位がZn^{+2}イオンによって非極性化されている状態から開始する。次にHis231(NprTでは234)がペプチドのプロトンを遊離してアシル中間体が形成される。そして最後に炭素-窒素間の結合が外れて分解反応が終わる。

NprTにおいて変異を導入した残基(M1:Gly144→Ala)は、活性中心の裏側に存在しているが、求核攻撃を促進するGlu146を含むα-ヘリックス領域内に変異残基は存在している。当初、アミノ酸置換(Gly144→Ala)は、その残基を含むα-ヘリックス構造の安定化を目的としたが、そのためにGlu146の占める高次構造上の位置が微妙にずれて、結果的に熱安定性のみならず触媒活性、特に水分子による求核攻撃の促進効果に変化をもたらしたのだと考えられる。　熱安定性向上並びに触媒活性の変化の詳細な解析は、やはり野生型と変異型の両酵素についてのX線結晶構造解析を行い両者を比較する事により行える。　現在、予備的に酵素結晶化の条件設定を行っているが、本中性プロテアーゼは、サーモライシンと同じジメチルスルホキシドを用いた方法(105)では結晶化できず、硫酸アンモニウムを用いた透析法により小結晶を取得することができた。そこで現在、X線結晶解析に使用可能な結晶に成長する条件を検討中である。結晶解析が可能になれば、変異型酵素M1におけるGly144→Alaというメチル基の付加が酵素構造全体に与える影響、あるいは活性発現に重要な役割を果す残基への間接的な影響を解析することができるであろう。

第5節　要　約

1. 第4章でタンパク質工学的手法により取得した熱安定性の向上した変異型酵素M1(Gly144→Ala)の比活性を、カゼインを基質として野生型酵素と比較した場合変異型酵素M1の方が約50%比活性が高かった。
2. 同じく両酵素の比活性を可溶性還元リゾチーム、インスリンB鎖及びインスリンA鎖を基質として測定した場合、カゼインの場合とは逆に野生型のほうが高い比活性を示した。特にインスリンA鎖を基質とした場合、変異型酵素による分解は殆ど認められなかった。
3. インスリンA鎖の野生型酵素による分解産物のN末端配列を決定した結果、本プロテアーゼは基質のロイシンまたはイソロイシンのN末端側を切断することが判っ

た。

4. 変異型酵素M1がインスリンA鎖を分解できないのは、触媒活性が低下した為であって、基質との親和性に影響は無いと考えられた。実際、合成オリゴペプチド(Z-Gly-Leu-NH_2)を用いてKmおよびk_{cat}を測定した結果、km値には両者で殆ど差がなかった、他方、野生型酵素に比べて変異型酵素M1のk_{cat}は37°Cで1/3程度に低下しており、これがインスリンA鎖を分解できない理由であると考えられた。

5. 変異型酵素M1を作製する時にアミノ酸置換を導入した144番目の残基は、立体構造上、分解反応において求核攻撃を促進する役割を担うGlu146を含むα-ヘリックス構造内に存在する。上述の触媒活性の低下はα-ヘリックス構造を安定化したことによってGlu146残基の位置が微妙に変化して求核攻撃促進作用が低下したことが主因であると考えられた。

総括と展望

タンパク質工学とはタンパク質の分子構造とその機能の相関を背景として、設計基準に基づいて分子の改変を行い、タンパク質の構造-機能相関を解析、 あるいはタンパク質機能を人為的に改良することを目的とした工学である。このタンパク質工学を、遺伝子工学の側面から見ると、目的酵素遺伝子のクローニング、塩基配列決定、並びに部位特異的変異操作の3段階に分けることができ、このことがまた、タンパク質工学が新世代の遺伝子工学と言われる所以であろう。そして序論、及び各章でも述べたとおり、それらのステップを通して得られる知見も基礎と応用の両面で非常に重要である。 分子改変における設計基準の作成は、タンパク質工学において最も重要であるが、タンパク質立体構造に関する情報が不足しているために、未だ試行錯誤の域を脱していない。本研究ではタンパク質機能の計画的改変を最終的な目標として、耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニング、塩基配列決定、分泌機構の解明、タンパク質工学的手法を用いた耐熱性の向上、そして変異酵素の基質特異性に関する研究を行った。 以下にその成果を総括する。

まず第1章では、好熱菌Bacillus stearothermophilus由来耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニングを同じくB. stearothermophilusを宿主として行い、またクローニングした遺伝子を常温菌である枯草菌(B. subtilis)内においても発現させた。 好熱菌の組み換えプラスミド保持株も、常温菌の組み換えプラスミド保持株も耐熱性を始めとして全く同じ性質の中性プロテアーゼを生産することが示され、クローニングした遺伝子は中性プロテアーゼ構造遺伝子であると考えられた。また遺伝子増幅効果により約15倍のプロテアーゼ生産の増強も認められた。

第2章では、クローニングした構造遺伝子の塩基配列、菌体外酵素のN末端アミノ酸配列並びに転写開始点を明らかにして遺伝子構造を解析した。その結果、本中性プロテアーゼ構造遺伝子は1,644塩基(548アミノ酸残基)からなるオープンリーディングフレームにコードされていることが判った。また菌体外プロテアーゼを精製して、そのN末端配列を決定した結果、菌体外にはオープンリーディングフレームのコードするタンパク質の230番目のアミノ酸以降のペプチドが成熟タンパク質として分泌されている事が明らかになり、N末端側229アミノ酸残基はプレ-プロ構造領域としてプロテアーゼ分泌に関わっていると考えられた。

第3章では、先に明らかとなったプレ-プロ構造領域のプロテアーゼ分泌生産における役割を解明するために、プロ構造領域内にフレームの合う形で欠失並びに挿入変異を導入した。プロ構造領域内の欠失が大きくなるほどプロテアーゼ生産性が低下する傾向が、また僅か2アミノ酸残基の挿入変異(Gly-Pro)でもプロテアーゼ生産性が極端に低下する傾向が認められプロ構造が前駆体タンパク質の膜透過に重要な役割を担っていることが判った。またペニシリナーゼのシグナル配列やプロテアーゼのプレ-プロ構造を用いた分泌ベクターによる異種タンパク質の分泌生産を試みた結果、プロ構造の役割は、プロテアーゼ前駆体に膜透過に必要なコンフォメーションを与えることであり、しかもその役割は本プロテアーゼに特異的であることが明らかになった。

第4章では、成熟タンパク質領域にタンパク質工学的手法によりアミノ酸置換を導入して酵素熱安定性の向上を図った。変異を導入するアミノ酸残基は、以下の3項目の設計基準に従って行った。 即ち、①本中性プロテアーゼと同一機能異種起源の酵素のアミノ酸配列を比較することにより、相同性の高いアミノ酸残基は置換しない。②統計的に熱安定性向上に寄与する程度の高いアミノ酸置換(例えばGly→Ala)を導入する。 ③酵素の立体構造を考慮して内部疎水性を高め、α-ヘリックス構造を安定化する置換を導入する。 その結果、成熟タンパク質領域のGly144をAlaに置換した場合(M1)予想どおり野生型酵素に比べて熱安定性の向上が認められ75°C 30分の熱処理後の残存活性が野生型で20%以下であるのに対して変異型では50%であった。また熱安定性を低下させると考えられるアミノ酸置換(M3: Thr66→Ser)もまた計画通り熱安定性の低下が認められた。しかし、このM3置換による熱安定性の低下を回復させる為には、M3酵素に、M1(Gly144→Ala)のみではなくM2(Gly61→Ala)置換を組み合わせた3重変異M123を作製する必要があった。これらの知見より、酵素熱安定性の向上は、活性に直接関与していない領域における熱安定性向上に寄与するアミノ酸置換の協同的な効果により達成し得ると考えられた。

第5章では、先に第4章で作製した変異型酵素M1の比活性あるいは基質特異性の変化を異なった基質(カゼイン、可溶性還元リゾチーム、インスリンB鎖、及びインスリンA鎖)を用いて調べた。カゼインを基質として用いた場合の比活性は野生型酵素に比べて変異型酵素M1では約50%高くなる傾向を示した。一方、可溶性還元リゾチームやインスリンB鎖を基質とした場合には逆に変異型酵素のほうが比活性が

低い事が、さらにインスリンA鎖を基質とした場合変異型酵素による分解が認められない事が判った。合成オリゴペプチド(Z-Gly-Leu-NH_2)を用いてKm,及びk_{cat}を測定した結果、変異型酵素M1ではk_{cat}値が野生型酵素の3分の1以下に低下していた。アミノ酸置換を導入したGly144の近傍で、かつ同じα-ヘリックス構造領域内に存在する残基(Glu146)は、触媒活性の発現時に求核攻撃を促進するアミノ酸残基であり、アミノ酸置換によって3次元構造上の位置が微妙に変化したことが比活性が変化した理由であると考えられた。

以上のように、本研究を通してタンパク質工学的に酵素の性質を変化させ得る事を示し、またその過程において種々の基礎的知見を得ることができた。本研究に関連して今後の解決すべき問題点を、①酵素生産と②酵素機能改変の2点に絞って以下に述べたい。

①酵素生産　序論でも述べたとおり、Bacillus属細菌の特徴は種々の菌体外酵素を分泌する点にあり、またその特徴ゆえに醗酵工業上で重要な位置を占める菌属となっているのである。しかし菌体外酵素が工業的によく利用されている反面で、タンパク質の分泌機構に関する知見はまだ殆ど得られていないのが実情である。今後は菌の細胞膜に存在すると考えられる分泌装置に関与する遺伝子の同定、及びそれらの役割を理解する必要がある。その目的のためには、分泌に関する変異体の作製、またその変異を相補する因子のクローニング、コードされている遺伝子の解析、そして遺伝子産物の局在性の解析という地道な努力の蓄積が必要であろう。また同時に分泌される側、つまり菌体外酵素タンパク質(特にその前駆体)についての研究も重要である。第3章でも述べたとおり、シグナル配列やプロ構造領域は前駆体タンパク質が膜透過に必要なコンフォメーションを構成するのに重要な役割を担っていると考えられる。従って遺伝子工学的手法により異種タンパク質分泌生産を試みる場合においては、シグナル配列(あるいはプレ-プロ構造)領域と成熟領域との組み合わせによって菌体外への分泌効率が規定されていると言っても過言ではない。分泌タンパク質前駆体のどのような構造上の特徴が膜透過に重要であるかが判れば、前駆体領域の役割解明と異種タンパク質分泌生産の為に貢献するであろう。

酵素生産においては、遺伝子発現制御機構も解明すべき重要な点を含んでいる。酵素構造遺伝子の上流領域には、シスに働く制御領域が存在する場合が報告されており、例えば枯草菌(B. subtilis)由来の中性プロテアーゼの場合nprR1, nprR2(23)

等の存在が知られている。また、構造遺伝子とは染色体上の離れた位置に存在し、遺伝子産物が酵素生産にトランスに作用して影響を及ぼす遺伝子も存在しプロテアーゼの生産増強をもたらす因子についてだけでも、枯草菌において、degSU(26), degQ(25), degR(106), 及びpapM(24) 等が報告されている。これらの遺伝子の特徴として複数の遺伝子に同時に作用する点も挙げられる。最近の我々の研究では、好熱菌(B. stearothermophilus)においてもこのようにトランスに働く遺伝子(degT)がクローニングされ、酵素生産増強(アルカリプロテアーゼ、レバンスクラーゼ、キシラナーゼ、及びセルラーゼ)のみならず胞子形成、細胞分裂、鞭毛形成やオートライシン活性に影響を与えることが判っている(107)。このようなシスあるいはトランスに働く制御遺伝子が、どのような機構で標的酵素構造遺伝子の発現を制御しているかを解明することは、遺伝子発現制御機構の解明と酵素生産性向上の為に、避けることのできないステップであると言えよう。また制御領域と前駆体領域を組み合わせて、制御可能な分泌ベクターの構築も行われ、ペニシリナーゼ生産制御系とアミラーゼシグナル配列を合わせ持つ分泌ベクターにより良好な異種タンパク質分泌生産を行った例もある(108,109)。

②酵素機能改変　　遺伝子工学的手法を用いれば、いかなるアミノ酸置換であっても酵素タンパク質内に導入することが可能である。しかし各アミノ酸残基の酵素機能における役割が未解明なため、酵素機能を計画的改変を行った例はまだ少なくアミノ酸置換の酵素機能への影響を調べることにより各アミノ酸の役割を類推しているのが現状であると言える。この状態から抜け出す為には酵素構造の側面からの情報が提供される必要があり、その意味ではより多くの酵素について結晶化そしてX線解析が行われる必要があるが、併せて結晶解析方法自体の改良も加えられる必要があり、より強くて安定なX線発射装置と画像処理技術の向上、3次元NMR(核磁気共鳴装置)の開発、等の機器分析の分野の進展もタンパク質工学において非常に重要であり成果が待たれる。しかし反面、構造解析により得られる情報にも限界が存在することを研究者は認識せねばならない。構造解析からの情報を元にして得られた仮説は、アミノ酸置換による変異酵素の作成と性格づけによって証明されなければならず、構造を元に立てたアミノ酸置換の戦略がそのまま機能改変に結び付くとは考えられない。こう考えると、タンパク質工学は変異体の作製と構造解析の繰り返しであるとも言える。ところが、時間的な要素を考慮に入れると、構造解析の段

階が律速しており、変異の導入に際してはそれ以外の情報を参考にする必要がある。例えば、第4章で述べたように自然界に存在する同一機能異種起源の酵素の1次構造を参考にするのも一つの方法である。本研究の場合、熱安定性に基準をおいて統計的手法を参考にして、アミノ酸残基の置換場所と置換の種類を限定したが、他の酵素特性(例えば至適pHなど)についても同様の方法により改変できるのではないかと考えられる。酵素熱安定性の向上はあくまでも酵素タンパク質の主鎖の立体構造を変えない範囲での、しかも活性発現に大きく影響しない領域での微小な構造変化に基いて行われるアミノ酸置換である。今後、タンパク質工学の分野が目標とするのは、やはり活性中心部位あるいはその近傍において基質との結合や触媒能力を直接操作することにある。本研究で用いた中性プロテアーゼに関して述べれば、Asn115, Ala116, Phe117及びTrp118が基質との結合時に疎水性ポケットを形成しており、第5章でも述べたとおりGlu146が水分子による求核攻撃を促進する役割を担っていること、またArg206やTyr160も基質との結合に重要な役割を担っているということがX線結晶解析の情報から推測されている。従って今後、これら触媒活性に直接関与するアミノ酸残基を置換して、基質との親和性や触媒活性のみならず、基質特異性や逆反応(ペプチド合成能)(110,111)に着目してアミノ酸置換と酵素特性の関係を系統的に調べて行く方向で研究は進むであろうと考えている。

Bacillus属細菌は工業的利用価値の高い酵素を生産し、しかもそれらを菌体外へ分泌する能力をも保持しており、分泌機構、遺伝子発現制御機構やタンパク質構造-機能相関に関する基礎的知見はそのまま応用面でも生かすことができると考えられ、今後も研究対象として更に注目されるであろう。

参考文献

1. Cohen, S.N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, and Helling, R. B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70 3240-3244.
2. 高木 昌宏、 今中 忠行 (1988) 枯草菌
バイオテクノロジーレビュー'88, シーエムシー、pp. 9 - 13.
3. Dubnau, D. (1983) Molecular cloning in Bacillus subtilis. In Experimental manipulation of gene expression. (ed. M. Inouye), pp. 33-51, Academic Press, New York.
4. Imanaka, T., M. Fujii, and S. Aiba. (1981) Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. J. Bacteriol. 146, 1091-1097.
5. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba. (1982) Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between Bacillus sterothermophilus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 149, 824-830.
6. Muller, R. E., T. Ano, T. Imanaka, and S. Aiba. (1986) Complete nucleotide sequences of Bacillus plasmids pUB110dB, pRBH1 and its copy mutants. Mol. Gen. Genet., 202, 416-420.
7. Ano, T., T. Imanaka, and S. Aiba. (1986) The copy number of Bacillus plasmid pRBH1 is negatively controlled by RepB protein. Mol. Gen. Genet., 202, 416-420.
8. Imanaka, T., H. Ishikawa, and S. Aiba. (1986) Complete nucleotide sequence of low-copy-number plasmid pRAT11 and the replication control by repA protein in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet., 205, 90-96.
9. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. (1985) Effect of in vitro DNA rearrarngement in the NH_2-terminal region of the penicillinase gene from Bacillus licheniformis on the mode of expression in Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol., 131, 1753-1763.
10. Himeno, T., T. Imanaka, and S. Aiba. (1986) Protein secretion in Bacillus subtilis as influenced by the combination of signal sequence and the following mature portion. FEMS Microbiol. Lett., 35, 17-21.
11. Himeno, T., T. Imanaka, and S. Aiba. (1986) Nucleotide sequence of the penicillinase repressor gene penI of Bacillus licheniformis and regulation of penP and penI by the repressor. J. Bacteriol., 168, 1128-1132.
12. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. (1987) Cloning and nucleotide sequence of the penicillinase antirepressor gene penJ of Bacillus licheniformis. J. Bacteriol., 169, 3867-3872.
13. Imanaka, T., K. Takagaki, and S. Aiba. (1986) Construction of high, intermediate and low-copy-number promoter-probe plasmids for Bacillus subtilis. Gene, 43, 231-236.
14. Kuriki, T., S. Okada, and T. Imanaka. (1988) New type of pullulanase from Bacillus stearothermophilus, and molecular cloning and expression of the gene in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 170, 1554-1559.

15. Kubo, M., and T. Imanaka. (1988) Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus. J. Gen. Microbiol., 134, 1883-1892.
16. Imanaka, T., and S. Aiba. (1986) Thermophiles: General, molecular, and applied microbiology, eds. T. B. Brock, J. G. Zeikus, John Wiley & Sons, Inc. Publishers, pp. 159-178.
17. Crea, R., A. Kraszewski, T. Hirose, and K. Itakura. (1978) Chemical synthesis of genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 5765-5769.
18. deHaseth, P. L., R. A. Goldman, C. L. Cech, and M. H. Caruthers. (1983) Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda P_R promoter. Nucl. Acids Res. 11, 773-787.
19. Winter, G., A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, and M. Smith. (1982) Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. Nature, 299, 756-758.
20. Ulmer, K. M..(1983) Protein Engineering. Science, 219, 666-671.
21. 今中 忠行 (1988) プロテアーゼの人工耐熱化 細胞工学 7, 533-538.
22. Yang, M. Y., E. Ferrari, and D. J. Henner. (1984) Cloning of the neutral protease gene of Bacillus subtilis and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion mutation. J. Bacteriol. 160, 15-21.
23. Uehara, H., K. Yamane, and B. Maruo. (1979) Thermosensitive, extracellular neutral proteases in Bacillus subtilis : isolation, characterization, and genetics. J. Bacteriol. 139, 583-590.
24. Yoneda, Y., and B. Maruo. (1975) Mutation of Bacillus subtilis causing hyperproduction of α-amylase and protease, and its synergestic effect. J. Bacteriol. 124, 48-54.
25. Amory, A., F. Kunst, E. Aubert, A. Kiler, and G. Rapoport. (1987) Characterization of the sacQ genes from Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 169, 324-333.
26. Henner, D. J., M. Yang, and E. Ferrari. (1988) Localization of Bacillus subtilis sacU(Hy) mutations to two linked genes with similalities to the conserved procaryotic family of two-component signaling systems. J. Bacteriol. 170, 5102-5109.
27. Imanaka, T., T. Tanaka, H. Tsunekawa, and S. Aiba. (1981) Cloning of the genes for penicillinase, penP and penI, of Bacillus licheniformis in some vector plasmids and their expression in Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 147, 776-786.
28. Birnboim, H. C., and J. Doly. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
29. Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. (1961) Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81, 741-746.
30. Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki. (1958) Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of Bac. subtilis. J. Biochem. (Tokyo) 45, 185-194.
31. Weber, K., and M. Osborn. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel

electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
32. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 277, 680-685.
33. Keay, L. (1969) Neutral proteases of the genus Bacillus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 257-265.
34. Titani, K., M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, and H. Neurath. (1972) Amino-acid sequence of thermolysin. Nature (London) New Biol. 238, 35-37.
35. Fujii, M., M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba. (1983) Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus in a vector plasmid and its expression in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 154, 831-837.
36. Messing, J.(1983) New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101, 20-78.
37. Maxam, A. M., and W. Gilbert. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65, 499-560.
38. Hunkapiller, M. W., R. M. Hewick, W. J. Dreyer, and L. E. Hood. (1983) High-sensitivity sequencing with a gas-phase sequanator. Methods Enzymol. 91, 399-413.
39. Duvall, E. J., D. M. Williams, S. Mongkolsuk, and P. S. Lovett. (1984) Regulatory regions that control expression of two chloramphenicol-inducible cat genes cloned in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 158, 784-790.
40. Gilman, M. Z., and M. J. Chamberlin. (1983) Development and genetic regulation of Bacillus subtilis genes transcribed by σ^{28}-RNA polymerase. Cell 35, 285-293.
41. Novotny, J. (1982) Matrix program to analyze primary structure homology. Nucleic Acids Res. 10, 127-131.
42. Kozak, M. (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. 47, 1-45.
43. Moran, C. P., Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero, and R. Losick. (1982) Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 186, 339-346.
44. Tinoco,I.,Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levine, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crothers, and J. Gralla. (1973) Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature (London) New Biol. 246, 40-41.
45. Stahl, M. L., and E. Ferrari. (1984) Replacement of the Bacillus subtilis subtilisin structural gene with an in vitro derived deletion mutation. J. Bacteriol. 158, 411-418.
46. Vasantha, N., L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula. (1984) Genes for alkaline protease and neutral protease from Bacillus amyloliquefaciens contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature portion. J. Bacteriol. 159, 811-819.

47. Wells, J. A., E. Ferrari, D. J. Henner, D. A. Estell, and E. Y. Chen. (1983) Cloning, sequencing, and secretion of Bacillus amyloliquefaciens subtilisin in Bacillus subtilis. Nucl. Acids Res. 11, 7911-7925.
48. Wong, S. -L., C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi. (1984) The subtilisin E gene of Bacillus subtilis is transcribed from a σ^{37} promoter in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81,1184-1188.
49. Bouvier, J., P. Stragier, C. Bonamy, and J. Szulmajster. (1984) Nucleotide sequence of the spo0B gene of Bacillus subtilis and regulation of its expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7012-7016.
50. Matthews, B. W., J. N. Jansonius, P. M. Colman, B. P. Schoenborn, and D. Dupourque. (1972) Three-dimensional structure of thermolysin. Nature (London) New Biol. 238, 37-41.
51. Moran, C. P., Jr., W. C. Johnson, and R. Losik. (1982) Close contacts between σ^{37}-RNA polymerase and and Bacillus subtilis chromosomal promoter. J. Mol. Biol. 162, 709-713.
52. Moran, C. P., Jr., N. Lang, and R. Losick. (1981) Nucleotide sequence of a Bacillus subtilis promoter recognized by Bacillus subtilis RNA polymerase containing σ^{37}. Nucl. Acids Res. 9, 5979-5990.
53. Wang, P. -Z., and R. H. Doi. (1984) Overlapping promoters transcribed by Bacillus subtilis $\sigma^{55}$and σ^{37}RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. J. Biol. Chem. 259, 8619-8625.
54. Johnson, W. C., C. P. Moran, Jr., and R. Losick. (1983) Two RNA polymerase sigma factors from Bacillus subtilis discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. Nature (London) 302, 800-804.
55. Lee, G., and J. Pero. (1981) Conserved nucleotide sequences in temporally controlled bacteriophage promoters. J. Mol. Biol. 152, 247-265.
56. Wong, H. C., H. E. Schnepf, and H. R. Whiteley. (1983) Transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. Biol. Chem. 258, 1960-1967.
57. Fliss, E. R., and P. Setlow. (1984) Complete nucleotide sequence and start sites for transcription and translation of the Bacillus megaterium protein C gene. J. Bacteriol. 158, 809-813.
58. Stenesh, J. (1976) Information transfer in thermophilic bacteria, p. 85-101. In M. R. Heinrich (ed.) Extreme environments - mechanism of microbial adoptation. Academic Press, Inc., New York.
59. Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. (1985) Nucleotide sequence of the Bacillus stearothermophilus α-amylase gene. J. Bacteriol. 163, 404-409.
60. Winter, G., G. L. E. Koch, B. S. Hartley, and D. G. Barker. (1983) The amino acid sequence of the tyrosyl-tRNA synthetase from Bacillus stearothermophilus. Eur. J. Biochem. 132, 383-387.
61. Kagawa, Y., H. Nojima, N. Nukiwa, M. Ishizuka, T. Nakajima, T. Yasuhara, T. Tanaka, and T. Oshima. (1984) High guanine plus

cytosine content in the third letter of codons of an extreme thermophile. J. Biol. Chem. 252, 7704-7710.
62. Blobel, G. and B. Dobberstein. (1975). Transfer of proteins across membranes. J. Cell Biol., 67, 835-851.
63. Wickner, W. (1980). Assembly of proteins into membranes. Science, 210, 861-868.
64. Minsky, A., R. G. Summers, and J. R. Knowles. (1986). Secretion of β-lactamase into the peliplasm of Escherichia coli : Evidence for a distinct release step associated with a conformational change. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 4180-4184.
65. Randall, L. L., and S. J. S. Hardy. (1986). Correration of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in E. coli. Cell, 46, 921-928.
66. Randall, L. L., and S. J. S. Hardy. (1984) Export of protein in bacteria. Bacteriol. Rev. 48, 290-298.
67. Bolivar, F., R. L. Rodoriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, and S. Falkow. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles Ⅱ. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.
68. Takagi, M., and T. Imanaka. (1989). Role of the pre-pro-region of neutral protease in secretion in Bacillus subtilis. J. Ferment. Bioeng. 67, 71-76.
69. Imanaka, T., M. Shibazaki, and M. Takagi. (1986). New way of enhancing the thermostability of proteases. Nature (London), 324, 695-697.
70. Sherratt, D., and J. Collins. (1973). Analysis by transformation of the penicillinase system in Bacillus licheniformis. J. Gen. Microbiol. 76, 217-230.
71. Moreno, F., A. V. Fowler, M. Hall, T. J. Shilhavy, I. Zabin, and M. Schwartz. (1980). A signal sequence is not sufficient to lead β-galactosidase out of the cytoplasm. Nature 286, 356-359.
72. Bassford, Jr., P. J., T. J. Shilhavy, and J. R. Beckwith. (1979). Use of gene fusions to study secretion of maltose-binding protein into Escherichia coli periplasm. J. Bacteriol. 139, 19-31.
73. Ito, K., P. J. Bassford, Jr., and J. Beckwith. (1981). Protein localization in E. coli: is there a common step in the secretion of periplasmic and outermembrane proteins ? Cell, 24, 707-717.
74. Imanaka, T., W. Oshihara, T. Himeno, and S. Aiba. (1983). Comparative studies on extracellular penicillinase of the same structural gene, penP, expressed in Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol., 129, 2621-2628.
75. Matsubara, H. (1966). Observations on the specificity of thermolysin with synthetic peptide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 427-430.
76. Power, S. D., R. M. Adams, and J. A. Wells. (1986). Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 309-3100.
77. Ikemura, H., H. Takagi, and M. Inouye. (1987). Requirement of pro-

sequence for the production of active subtilisin E in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 262, 7859-7864.
78. Vasantha, N., and L. D. Thompson. (1986). Fusion of pro region of subtilisin to staphylococcal protein A and its secretion by Bacillus subtilis. Gene, 49, 23-28.
79. 大島泰郎. 1978. 好熱性細菌. 東京大学出版会.
80. 大島泰郎. 1977. 異常環境と微生物酵素. 講談社サイエンティフィック.
81. Wells, J. A. and D. B. Powers. (1986) In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. J. Biol. Chem. 261, 6564-6570.
82. Imanaka, T. (1988) Application of genetic engineering to thermophilic bacilli. In Recombinant DNA and bacterial fermentation, (ed.) J. A. Thomson, CRC Press pp.77-95.
83. Singleton, R., Jr., and R. E. Amelunxen. (1973) Proteins from thermophilic microorganisms. Bacteriol. Rev. 37, 320-342.
84. 大島泰郎. (1982) タンパク質の安定性（好熱菌の耐熱タンパク質）. 蛋白質、核酸、酵素. 27, 154-163.
85. Argos, P., Rossmann, M. G. Rossmann, U. M. Grau, H. Zuber, G. Frank, and J. D. Tratschin. (1979) Thermal stability and protein structure. Biochemistry 18, 5698-5703.
86. Yutani, K., K. Ogasawara, Y. Sugino, and A. Matsushiro. (1977) Effect of a single amino acid substitution on stability of conformation of a protein. Nature 267, 274-275.
87. Matsumura, M., Y. Katakura, T. Imanaka, and S. Aiba, (1984) Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid fro thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. J. Bacteriol., 160, 413-420.
88. Norris, K., F. Norris, L. Christiansen, and N. Fiil. (1983) Efficient site-directed mutagenesis by simultaneous use of two primers. Nucl. Acids Res. 11, 5103-5112.
89. Takagi, M., T. Imanaka, and S. Aiba. (1985) Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 163, 824-831.
90. Kester, W. R., and B. W. Matthews. (1977) Comparison of the structures of carboxypeptidase A and thermolysin. J. Biol. Chem., 252, 7704-7710.
91. Chou, P. Y., and G. D. Fasman. (1978) Empirical prediction of protein conformation. Ann. Rev. Biochem., 47, 251-276.
92. G. E. Schulz, and R. H. Schirmer. (1977) Principles of protein structure. Springer-Verlag GmbH & Co. KG.
93. Kyte, J., and R. F. Doolittle. (1984) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., 157, 105-132.
94. Estell, D. A., T. P. Grayer, J. V. Miller, D. B. Powers, J. P. Burnier, P. G. Ng, and J. A. Wells. (1986) Probing steric and hydrophobic effects on enzyme-substrate interactions by protein engineering. Science, 233, 659-663.
95. Wells, J. A., B. C. Cunningham, T. P. Graycar, and D. A. Estell.

(1987) Recruitment of substrate-specificity properties from one enzyme into a related one by protein engineering. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 5167-5171.

96. Bryan, P., M. W. Pantoliano, S. G. Quill, H. Hsiao, and T. Poulos. (1986) Site-directed mutagenesis and the role of oxyanion hole in subtilisin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 3743-3745.

97. Carter, P., and J. A. Wells. (1988) Dissecting the catalytic triad of a serine protease. Nature, 232, 564-568.

98. Matsubara, H., R. Sasaki, A. Singer, and T. H. Jukes. (1966) Specific nature of hydrolysis of insulin and tobacco mosaic virus protein by thermolysin. Arch. Biochem. Biophys., 115, 324-331.

99. Feder, J. (1967) Studies on the specificity of Bacillus subtilis neutral protease with synthetic substrates. Biochemistry, 6, 2088-2093.

100. Moore, S., and W. H. Stein. (1954) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem. 211, 907-913.

101. Carter, P., and J. A. Wells. (1987) Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". Science, 237, 394-399.

102. Wells, J. A., D. B. Powers, Bott, R. R., T. R. Graycar, and D. A. Estell. (1987) Designing substrate specificity by protein engineering of electrostatic interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1219-1223.

103. Okazaki, K., T. Imoto, and H. Yamada. (1985) A convenient protein substrate for the determination of protease specificity: Reduced and S-3-(trimethylated amino) propylated lysozyme. Anal. Biochem. 145, 87-93.

104. Kester, W. R., and B. W. Matthews. (1977) Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: Implications for the mechanism of catalysis. Biochemistry, 16, 2506-2516.

105. McPherson, A. (1982) Crystallization. In Preparation and analysis of protein crystals. John Wiley & Sons, Inc. pp. 82-159.

106. Tanaka, T., M. Kawata, Y. Nagami, and H. Uchiyama. (1987) prtR enhances the mRNA level of the Bacillus subtilis extracellular proteases. J. Bacteriol. 169, 3044-3050.

107. Takagi, M., H. Takada, and T. Imanaka. (1989) Cloning in Bacillus subtilis and nucleotide sequence of the pleiotropic regulatory gene, degT, from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. Submitted.

108. 高木昌宏、今中忠行. (1989) ベクター・発現。 生命分子工学、三浦謹一郎 編、裳華房.

109. 嶋 秀樹 (1989) 枯草菌における蛋白質分泌生産系の開発 枯草菌を宿主とする人為的発現制御可能な分泌ベクターの構築 修士論文, 大阪大学工学部.

110. Isowa, Y., M. Ohmori, T. Ichikawa, H. Kurita, M. Sato, and K. Mori. (1977) The synthesis of peptides by means of proteolytic enzymes. Bull. Chem. Jap., 50, 2762-2765.

111. Oka, T., and K. Morihara. (1980) Peptide bond synthesis by thermolysin. J. Biochem. 88, 807-814.

本論文に関連する報告

1. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus in a vector plasmid and its expression in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 154, 831-837 (1983).

2. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 163, 824-831 (1985).

3. Role of pre-pro-region of neutral protease in secretion in Bacillus subtilis. J. Ferment. Bioeng. 67, 71-76 (1989).

4. A new way of enhancing the thermostability of proteases. Nature (London), 324, 695-697 (1986).

5. Addition of a methyl group changed both the catalytic velocity and thermostability of the neutral protease from Bacillus stearothermophilus. FEBS Lett. 254, 43-46 (1989).

6. 枯草菌　バイオテクノロジーレビュー'88, シーエムシー、pp. 9-13 (1988).

7. ベクター・発現　生命分子工学、三浦 謹一郎 編、裳華房 (1989).

謝　　辞

この研究は、大阪大学工学部醗酵工学科教授 今中忠行先生の下に行われたものであり、先生より激励と御教示を戴いたことを心より感謝致します。

本論文をまとめるに当たり、有益な御助言を頂きました大阪大学工学部醗酵工学科 岡田弘輔教授、大嶋泰治教授、山田靖宙教授、高野光男教授、菅　健一教授、大阪大学工学部生物工学国際交流センター 吉田敏臣教授並びに大阪大学産業科学研究所 二井将光教授に感謝致します。

本研究を遂行するに当たり実りある討論と共に御指導頂いた大阪大学名誉教授(現 東京電機大学教授) 合葉修一先生に御礼申し上げます。

本研究に際して、数々の実験方法を御指導して頂きました藤井幹夫博士に感謝致します。更に、様々な研究の便宜を図って頂きました大阪大学工学部醗酵工学科 松岡正佳助手、西田佐知子技官に感謝致します。

最後に、本研究に御協力下さいました柴崎充至氏、高田洋樹氏、井上 淳氏、白井丙午郎氏、並びに大阪大学工学部醗酵工学科第一講座の皆様に感謝致します。