



Title	Bacillus stearothermophilus由来の耐熱性中性プロテアーゼに関する研究
Author(s)	久保, 幹
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065972
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Bacillus stearothermophilus 由来の
耐熱性中性プロテアーゼに関する研究

1992年

久保 幹



目次

序論	1
第 1 章 耐熱性プロテアーゼ生産菌の分離と当該酵素の諸性質	
第 1 節 緒言	5
第 2 節 実験材料および方法	5
第 3 節 結果	
1.3.1. プロテアーゼを生産する好熱菌の分離	9
1.3.2. プロテアーゼを生産する好熱菌MK232 株の同定	9
1.3.3. <i>Bacillus stearothermophilus</i> MK232 株の変異処理による 酵素生産性の増強	10
1.3.4. <i>Bacillus stearothermophilus</i> YG185 株を用いた中性プロ テアーゼの生産	10
1.3.5. 中性プロテアーゼの精製および結晶化	12
1.3.6. 中性プロテアーゼの諸性質	14
第 4 節 考察	16
第 5 節 要約	17
第 2 章 <i>Bacillus stearothermophilus</i> MK232 株由来耐熱性中性プロ テアーゼ遺伝子のクローニングとその塩基配列	
第 1 節 緒言	19
第 2 節 実験材料および方法	20
第 3 節 結果	
2.3.1. 耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子 (<i>nprM</i>) の枯草菌にお けるクローニング	24
2.3.2. <i>nprM</i> 遺伝子の塩基配列決定	25
2.3.3. 菌体外耐熱性中性プロテアーゼのアミノ酸配列	28
2.3.4. <i>nprM</i> 遺伝子および <i>nprT</i> 遺伝子の枯草菌中での発現	29
2.3.5. <i>NprM</i> の枯草菌を用いた醗酵生産	31
第 4 節 考察	33

第5節 要約	35
第3章 <i>nprM</i> の発現における遺伝子2次構造の役割	
第1節 緒言	37
第2節 実験材料および方法	38
第3節 結果	
3.3.1. <i>nprM</i> 遺伝子中の2次構造の検索および2次構造の伸長、縮小を与える変異導入	41
3.3.2. 2次構造の伸長、縮小を与えた <i>nprM</i> 遺伝子の発現およびその解析	44
3.3.3. 原核生物の遺伝子発現における遺伝子上2次構造強度の生物学的閾値	46
第4節 考察	50
第5節 要約	51
第4章 <i>nprM</i> 遺伝子の有するプロモーター配列の解析	
第1節 緒言	52
第2節 実験材料および方法	52
第3節 結果	
4.3.1. <i>E. coli</i> 中での <i>nprM</i> 遺伝子の発現	55
4.3.2. 改変 <i>nprM</i> プロモーターの構築とその強度の比較	57
4.3.3. 改変 $\Delta 3$ プロモーターの構築とその強度の比較	60
第4節 考察	62
第5節 要約	63
第5章 蛋白質工学によるNprMの改変	
第1節 緒言	64
第2節 実験材料および方法	64
第3節 結果	
5.3.1. 変異導入プラスミドの作製	68

5.3.3. サブサイトにおけるアミノ酸置換を付与したNprMの創製	71
5.3.4. ドメイン間における自由度の増減を付与したNprMの創製	73
5.3.5. チロシンをトリプトファンに置換したNprMの創製	75
5.3.6. 自己分解耐性を付与したNprMの創製	78
第4節 考察	82
第5節 要約	83
第6章 耐熱性中性プロテアーゼの枯草菌を用いた醗酵生産における温度効果	
第1節 緒言	85
第2節 実験材料および方法	86
第3節 結果	
6.3.1. 高温における枯草菌を用いた <i>nprM</i> 遺伝子の発現様式	88
6.3.2. 各温度における枯草菌を用いた <i>nprM</i> 遺伝子の発現及びその発現様式	90
6.3.3. 各温度における枯草菌を用いた <i>nprT</i> および <i>amyE</i> 遺伝子の発現様式	92
第4節 考察	94
第5節 要約	96
総括と展望	97
参考文献	102
本論文に関する文献	111
謝辞	113

序論

生物の生命活動は生化学反応の集積であり、各素反応は生体触媒である酵素に依存している。国際生化学連合の分類によれば、酵素の種類は約 2,400種にのぼる。またこれまでにきわめて多くの種類の酵素が分離され、それらの諸性質、構造等が検討されてきた。この中にはストレプトキナーゼ(1)、ウロキナーゼ(2、3)など、医薬用酵素として用いられているものから、プロテアーゼ(4)やアミラーゼ(5)等、工業的に広く利用されている酵素まで非常に多岐にわたっている。これらの酵素資源は動物、植物、微生物など生物界全体に分布しているが、微生物の場合には、酵素生産を目的として、変異処理等により優良菌株を容易に得ることができ、またその培養方法を改良して生産性を増強することも可能であり、さらに種の多様さゆえに各種の応用酵素の供給源としてますます重要になりつつある。

1970年代から *E. coli* を用いた遺伝子組換え技術が出現し(6)、1980年代前半にかけては各種酵素遺伝子が次々とクローニングされた(7、8、9、10)。この間、Maxam と Gilbert (11) や Sanger 等(12) は DNA の塩基配列決定法を確立させ、クローン化された遺伝子の塩基配列レベルでの解析を可能とした。現在では蛋白質化学などにおける基礎研究から、医学、農学、工学領域での応用研究に至るまで、これらの技術は幅広く活用されるまでになった。

近年、遺伝子組換え技術を利用した遺伝子増幅効果による物質生産への応用が広く進められており、例えば DNA リガーゼ(13) や トリプトファンシンターゼ(14) など特定の酵素の生産力を数十ないし数百倍に増強しうることが示されている。また遺伝子クローニングの技術は、種の障壁を越えた遺伝子発現をも可能とし、従来微量しか得られなかった人由来インターフェロン(15)、ヒト成長ホルモン(16)、tissue-type plasminogen activator (t-PA)(17)をはじめとする各種付加価値の高い酵素やペプチド等の大量生産も可能となってきた。このように、遺伝子レベルでの解析を行い遺伝子増幅効果を利用することによって、クローン化した特定の酵素遺伝子の生産を格段に増強することが可能となった。

1982年、Winter と Fersht 等(18) は、化学合成した DNA を用いて特定の塩基配列を換える、いわゆる部位特異的変異 (site-directed mutagenesis) の手法により酵

素特性の改変を行った。その後この方法を用い、蛋白質の分子構造とその機能との相関を背景として、特定の酵素やペプチドのアミノ酸配列を自由に設計、変更するという蛋白質工学 (protein engineering) が注目されてきた。この蛋白質工学的手法を用いることにより酵素分子の活性中心の解析、触媒機能の解明、蛋白質の安定性など、従来以上に分子内部に関わる問題を深く理解することが可能になると考えられている。また応用的にも蛋白質分子の設計により、特定の基質に対する親和性を上昇させることなど、その機能改変も徐々に可能となってきた。これら蛋白質工学的手法を用い、Perry と Wetzel (19) は T4 リゾチームに新たな S-S 結合を設計、導入することにより酵素の安定性を高めた。また Imanaka 等(20) は、耐熱性中性プロテアーゼのドメイン間に位置する α -ヘリックス中に、特定のアミノ酸置換を導入することでその熱安定化に成功している。今後はこれらの技術を利用し、蛋白質内部に係わる問題から遺伝子の調節、発現などに至るまで遺伝子を思い通りに設計、改変することがますます多用されるものと予想される。すなわち従来型技術を基礎とし、遺伝子工学、蛋白質工学を組み合わせることにより、一層明快な解析、応用が可能になると期待されている。

一方、有機合成においては、その一部またはすべてにおいて生体触媒である酵素を利用するといういわゆるハイブリッド・プロセスが注目されている。この場合、酵素は触媒としての機能を果たすが、従来の化学触媒とはその性格が大きく異なる。

すなわち生化学反応を触媒する酵素は、

(1) 常温、常圧、中性付近からせいぜい弱酸性、弱アルカリ性の pH 範囲内といった温和な条件下で、大きい反応の加速作用を示すこと。

(2) 基質に対する厳密な選択性。

(3) 反応の立体選択性。

(4) 複雑な構造の基質分子の特定の部位にのみ反応を起こしうること。

など、一般の化学触媒の到達しがたい優れた特徴を有している。

ハイブリッド・プロセスを利用した一例として、1979年 Oyama 等(21) が行ったプロテアーゼの逆反応による、甘味料アスパルテーム (Asp-Phe-OMe) (APM)

(22) の合成があげられる。彼等の合成法は、従来の有機合成法とは異なる生体触媒を利用した点が大きな特徴である。この合成法では、酵素の特徴である基質

に対する厳密な選択性、大きい反応の加速作用を利用し、有機合成法と比べ大幅に合成ステップが簡略化されている。さらにこの方法は反応の立体選択性があるため、D,L-Phe-OMe 混合下においてもL体のみ選択的に反応するため、最終的に分離する工程が不必要となることも大きな利点である。今後、このようなハイブリッド・プロセスはますます発展していくであろう。

本研究では、ハイブリッド・プロセスに用いるAPM合成用酵素の取得およびその分子構造の解明を目指し、APM合成に利用しうるプロテアーゼ生産菌のスクリーニング、酵素遺伝子のクローニングおよび塩基配列レベルでの解析、その組換え体の醗酵、および蛋白質工学的的手法による酵素分子の改変を目的とし研究を行った。

以下にその研究の概要を述べる。

第1章においては、ハイブリッド・プロセスに用いるAPM合成用酵素取得を目指し、天然界より合成用酵素を生産する菌株のスクリーニングを行った。また得られたプロテアーゼ生産菌株の改良を行うことにより、高生産株の育種、さらに酵素蛋白質としての諸性質を調べた。

第2章では、第1章で得られた菌株をDNA 供与体とし、*Bacillus subtilis* の遺伝子交換系(23)を利用して、耐熱性中性プロテアーゼ構造遺伝子のクローニングを行った。次に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推定した。また組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た。さらに構造遺伝子を高コピー数プラスミドベクターであるpUB110にサブクローニングし、低コピー数プラスミドベクターでの発現と比較した。

第3章では、この酵素遺伝子を詳細に解析し、遺伝子発現に及ぼす核酸上の2次構造の有無を調べ、それらが遺伝子発現とどのような関係にあるかを明らかにした。さらに一般的に原核生物における核酸上の2次構造の遺伝子発現に及ぼす影響についてまとめた。

第4章では、この酵素遺伝子の有するプロモーターを解析するため、このプロモーターを基本として種々の改良型プロモーターを構築し、*E. coli* 中でプロモーター強度の比較を行い、*Bacillus* 属細菌由来 *nprM* プロモーターの特徴を明らかにした。さらにこれらの知見を基とし、*E. coli* 中で働く強力かつ制御可能なプロモーターの構築を試みた。

第5章では、蛋白質工学的にプロテアーゼの活性と安定性を上昇させるべく、(1) 活性中心の改良、(2) サブサイトにおけるアミノ酸置換導入による基質親和性の上昇、(3) ドメイン間の自由度の増減、(4) チロシン残基をトリプトファン残基に置換する効果、(5) 自己分解耐性の付与など試み、活性上昇と安定性が付与される可能性があることを示した。

第6章では、低コピー数プラスミドベクターを用い、*B. subtilis* 内で *NprM* 遺伝子発現を行わせた際、この遺伝子は醗酵温度により発現様式が異なると共に、酵素生産性が増強されることを見出し、その現象を詳細に解析した。さらに好熱菌由来耐熱性中性プロテアーゼをコードする遺伝子、*nprT* (24)、中温菌である枯草菌由来 α -アミラーゼ遺伝子、*amyE* (25)、を同様の系を用いて発現させ、これらの遺伝子において培養時における温度効果についても調べた。

最後に、本研究で明らかにした結果を総括して、今後解決すべき問題点と共に、*Bacillus* 属細菌のプロテアーゼを中心に、遺伝子発現、酵素醗酵生産、および蛋白質工学的な酵素分子の改変について、今後の展望をまとめた。

第1章 耐熱性プロテアーゼ生産菌の分離と当該酵素の諸性質

第1節 緒言

1965年にアメリカG. D. Searle社で、胃液分泌ホルモンであるガストリンの合成について研究中、アスパルテム (APM) が強い甘みを呈することが偶然発見された(22)。その構造はL-Asp-L-Phe-OMe のジペプチドであり、砂糖の約200倍の甘さを持つ合成甘味料として知られている。またAPMは、アメリカ食品医薬品局(FDA)においてかつてないほど厳しい安全性試験が実施され、発癌性などに対する安全性が確認され、現在アメリカのみならずヨーロッパ、日本においてもその食品添加剤としての認可がなされている。従来は化学合成法により合成されていたが、1979年Oyama等(21)は、プロテアーゼの逆反応を利用した新たな合成法を確立した。この方法では、プロテアーゼとして*Bacillus thermoproteolyticus*由来、耐熱性中性プロテアーゼであるサーモライシンが使用されている。サーモライシンは、切断点のイミノ基側に、ロイシン、フェニルアラニンのような疎水性アミノ酸を要求する、エンド型のプロテアーゼである。またこの酵素は好熱菌由来であるため他のプロテアーゼに比べ非常に耐熱性が高く、長時間の使用にも安定であり、ハイブリッド・プロセス向きの酵素であるといえよう。

ここでは、従来用いられてきたサーモライシンよりも耐熱性、比活性の高い酵素取得を目指し、自然界より目的酵素生産菌株のスクリーニングを行った。また酵素の諸性質を調べると共に、各種変異処理を行い高生産株の取得を行った。

第2節 実験材料および方法

培地

スクリーニング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でpH 7.3に調整)を用いた。L培地に1%カゼインを添加したものをLC培地とした。固形培地として用いる場合には、寒天を2%加えた。醗酵槽を用いた培養においては、WSG培地(小麦粉 30g、大豆粕 15g、グルコース 10g、カゼイン 4g、KH₂PO₄ 1.5g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、CaCl₂・2H₂O 0.2g/ℓ、NaOHでpH 7.5に調整)を用いた。

培養条件

酵素生産には、WSG培地を用いコンピューター制御醗酵槽(実容量60ℓ)で培養した。培養温度は、50℃、pHは6.0以上、また溶存酸素濃度は2ppm以上に保持し9時間(増殖期)培養後、徐々に回転数を低下させ溶存酸素濃度を下げた。

プロテアーゼ生産菌株のスクリーニング法

菌体外にプロテアーゼを分泌すると、カゼイン含有プレート上で、コロニーの周辺にカゼインの部分分解物(パラカゼイン)のハローを形成する。プロテアーゼ生産菌のスクリーニングは、滅菌水で適当に試料(土壌より採取したもの)を希釈し、LC寒天培地に塗布した後、50℃、24時間培養し、ハロー形成の有無により確認した。

プロテアーゼ活性測定法

プロテアーゼ活性測定は、Hagihara(26)等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(50mM トリス塩酸塩、5mM 塩化カルシウム、pH7.5)に酵素を適当に希釈後、基質(酵素緩衝液に溶かした2%カゼイン)1mlとを混合攪拌後、37℃、20分間保存した。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)を加え激しく攪拌し、さらに室温にて30分間静置後、Watman Filter paper No.1(直径7cm)で濾過して、波長275nmにおけるろ液の吸収を測定した。

プロテアーゼ活性単位の定義は、37℃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。

スクリーニング菌株同定法

菌株同定は、酸素通気増殖、カタラーゼ反応、グラム染色、および孢子形成等、標準法に従って同定した(27)。

変異導入方法

50℃、L培地で対数増殖期まで培養後、遠心(5,000 g、10分)し、20 μg/mlのN-メチル-N-ニトロソグアニジン(NTG)を含むL培地で50℃、15分静かに培養した。遠心集菌後、L培地で2回洗浄し、再びL培地に懸濁した。さらに50℃、2時間培養し、LC寒天培地上で変異株を選択した。

菌体外プロテアーゼの粗精製法

培養上清を限外濾過膜(UF-10ps, およびUF-100ps, 東ソー社製)を用い、低分子(分子量、MW<10K)および高分子(分子量、MW>100 K)蛋白質をそれぞれ除去した。得られた蛋白質溶液について、アセトンを用いて溶媒沈殿を得た。凍結乾燥後、酵素緩衝液(5 mM CaCl₂, 50 mM トリス塩酸、pH7.5)に懸濁し、これを粗酵素液とした。

プロテアーゼの結晶化法

20mMの酢酸カルシウムを酵素懸濁液に添加後、0.2N NaOHで徐々にpHを11.5まで上昇させ酵素を完全に溶解させた。溶液は直ちに0.2N酢酸を用いて中性にし、4℃、24時間放置した。析出した結晶を集め、さらに同様の方法により再結晶した。

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 (28)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、酵素蛋白質純度検定には、Laemmliの不連続SDSゲル(29)を用いた。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%クーマジープリリアントブルーR250で40分間染色し、脱色液(25%メタノール、10%酢酸)で脱色した。

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、60℃の湯浴中に入れた。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℃で測定した。

至適pH

酵素活性は、37℃で次に示す緩衝液中で測定した。pH5.5~7.5は10 mM クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0~8.5は10 mM トリス塩酸緩衝液、pH8.0~9.0は10 mM ホウ酸緩衝液を使用した。それぞれのpHに調整した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。

等電点電気泳動

等電点の測定は、Bier等(30)の開発した分取型等電点電気泳動装置を用いて測定した。実験は以下の条件で行った。

両性担体	1% PHARMALITE (pH 3~10)
両性担体注入量	130 ml
サンプル濃度	40mg/ml
サンプル注入量	4 ml
泳動時間	20分
電極液	陽極側 0.1N H ₃ PO ₄ 陰極側 0.1 NaOH
ポンプスピード	65%
設定電力	150W
設定電圧	1600V
設定温度	-5℃

プロテアーゼ阻害剤の影響

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

試薬

バクトトリプトン、酵母エキス、はDifco Laboratoriesより、リゾチーム、トリス塩基は、Sigma Chemicals より、Filter paper No.1は、Watmanよりそれぞれ購入した。その他の試薬は、和光純薬工業(株)、およびナカライテスク(株)より購入した。

第3節 結果

1.3.1. プロテアーゼを生産する好熱菌の分離

温泉等から土壌を採取し、その一部を5ml のL培地で55°C、4時間振とう培養した。培養液を適当に滅菌水で希釈し、その100 μ lをLC寒天培地上に広げ、55°Cで一晩培養した。その結果、約2,000株の好熱菌を分離することができた。そのうち約100株がハローを形成し、プロテアーゼを分泌生産していた。各々の菌株を、L培地を用い55°C、16時間振とう培養した。集菌後、上清からプロテアーゼを部分精製し、APM合成活性および耐熱性試験を行った。その結果MK232株がAPM合成活性、耐熱性共に優れたプロテアーゼを分泌生産することが判明した。

1.3.2. プロテアーゼを生産する好熱菌MK232株の同定

MK232株は絶対好気性であり、孢子形成細菌であった。またグラム染色陽性の桿菌であり、カタラーゼ産生能を有していた。以上のことより、この菌株は*Bacillus*属細菌であると同定した。一方、MK232株は70°Cまで生育可能であった。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(27)によりこの菌株を、*Baci-*

llus stearothermophilus であると同定し、*Bacillus stearothermophilus* MK232と命名した。

1.3.3. *Bacillus stearothermophilus* MK232株の変異処理による酵素生産性の増強

B. stearothermophilus MK232株のプロテアーゼ生産能をさらに高めるため、NTGを使用し種々の変異株の取得を行った。

孢子形成は*Bacillus*属細菌において、アルカリ性プロテアーゼ生産と関連しており、リファマイシン耐性(R^r)変異株は孢子形成能欠損となる場合があることが報告されている(31)。また一般に*Bacillus*属細菌において、中性プロテアーゼは対数増殖期に、またアルカリ性プロテアーゼは定常期以降に産生される。従って中性プロテアーゼは、定常期以降アルカリ性プロテアーゼによる分解を受ける可能性がある。そこで中性プロテアーゼの生産性を向上させるため、NTG処理により、数種のリファマイシン耐性変異株の取得を試みた。その結果、得られたリファマイシン耐性変異株のほとんどは孢子形成能欠損株であったが、1株を除き生育が非常に悪かった。生育の良い1株(R^r4株と命名)は、MK232株と同様に生育し、野生株より多量の中性プロテアーゼを生産した。このようにR^r4株は、リファマイシン耐性変異株であり、同時に孢子形成能も欠損していた。またアルカリ性プロテアーゼは定常期以降、検出限界以下でありその生産能が失われていた。その結果、目的とする中性プロテアーゼの分解を減少させることが可能となり、生産性を向上させることができた。

工業的に中性プロテアーゼの醗酵生産を考えた場合、グルコース抑制と窒素抑制を解除することにより、安価にまた効率良く酵素生産が可能となる。そこでグルコース耐性株と窒素耐性株の取得を試みた。NTG処理によりグルコース1%を含むLC寒天培地上で、大きなハローを形成するグルコース耐性株(G20株と命名)をR^r4株より得た。さらにG20株からカザミノ酸耐性株(GC51株と命名)、高アンモニウム塩耐性株(YG185株と命名)を同様の方法により得ることができた。

1.3.4. *Bacillus stearothermophilus* YG185を用いた中性プロテアーゼの生産

B. stearothermophilus YG185 株とその親株であるMK232 株をWSG 培地を用い、醗酵槽を使用して50°Cで、20時間培養した。 YG185 株の酵素生産パターンを図1-1に示した。 菌体濃度は、培地中に小麦粉等不溶物が入っているため直接濁度の測定は不可能であった。 そこで濁度測定可能なL培地で培養を行い発生する炭酸ガス(CO₂)を、廃ガス分析装置を用いガス中のCO₂濃度を測定した。 その結果1ℓの培地からCO₂で0.5ℓの蓄積があったとき、菌体濃度OD₆₀₀で約10に相当した。 これらの関係から、菌体濃度を推定し求めた。 両菌株(MK232とYG185)の菌体増殖経過はほぼ同じであったが、変異株であるYG185株はMK232株に比べ約2倍高い酵素活性を示した(3,000 u/ml)。 また両株とも増殖連動型で酵素の生産が行われた。 図1-1にYG185株の酵素生産様式を示す。

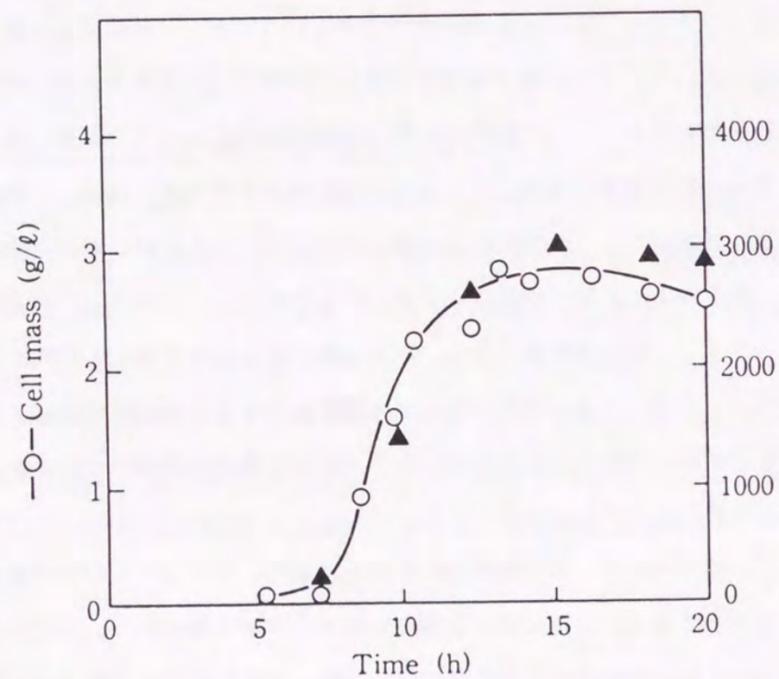


図1-1. YG185 株の酵素生産様式。 菌株はWSG 培地を用い50°Cで、20時間培養した。 ○: 菌体濃度、▲: 酵素活性。

1.3.5. 中性プロテアーゼの精製および結晶化

B. stearothermophilus YG185 株を培養後、その上清より中性プロテアーゼ(NprM)を粗精製し、結晶化した(図1-2)。

この酵素資料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した(図1-3)。

その推定分子量(MW)は34,000であった。 またHPLCを用いたゲル濾過(TSK-gel I G-3000sw, 東ソー社製)でも同様の分子量であった(34,000)。



図1-2. NprMプロテアーゼの結晶。 横線は10μmを示す。

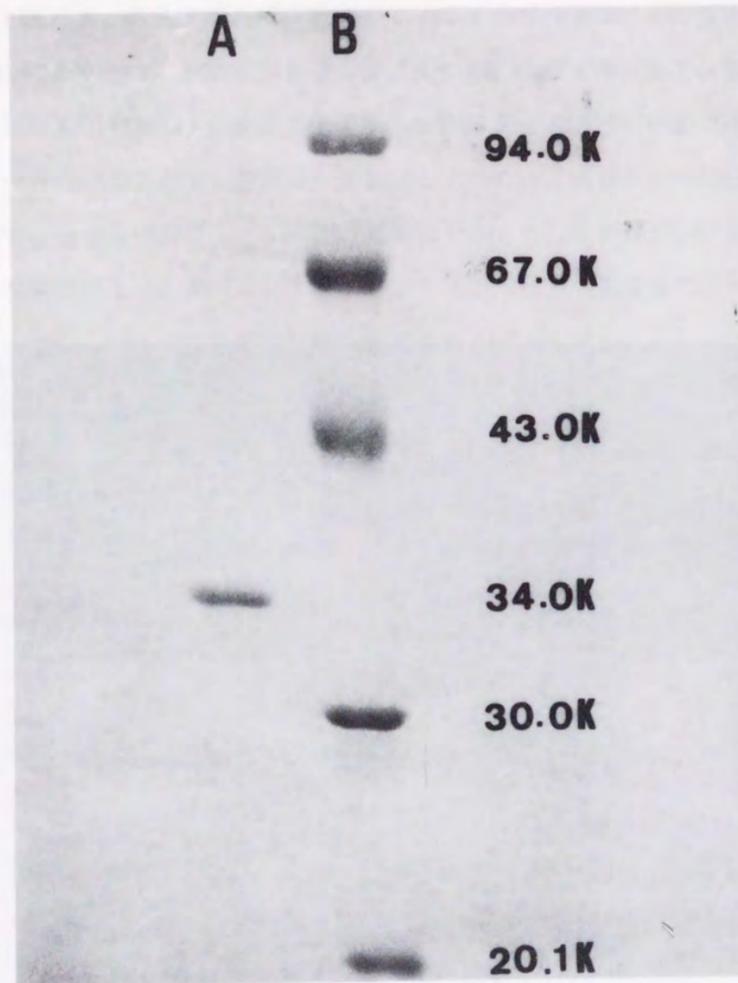


図1-3. 精製したNprMのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動. A: 精製NprM B: 標準蛋白質マーカー (94.0K:phosphorylase b, 67.0K:albumin, 43.0K:ovalbumin, 30.0K:carbonic anhydrase, 20.1K:trypsin inhibitor). K:kilodaltons.

1.3.6. 中性プロテアーゼの諸性質

結晶化したNprMを用い、至適pH、pH安定性、至適温度、熱安定性、等電点、および阻害剤の影響を調べた。至適pHは7~8付近であった(図1-4)。またこの酵素はpH5~10において室温で24時間は安定であった(図1-5)。酵素活性の至適温度は70℃付近と高温であり(図1-6)耐熱性の酵素である。酵素耐熱性は、従来耐熱性が高いと言われているサーモライシンと共に測定し比較した。50℃から5℃おきに温度を上昇させたが両酵素とも85℃まで活性低下はほとんど認められなかった。図1-7に示したように90℃、30分の熱処理後、NprMはサーモライシンに比べ約10%高い残存活性を示した。また等電点は9.4であった。

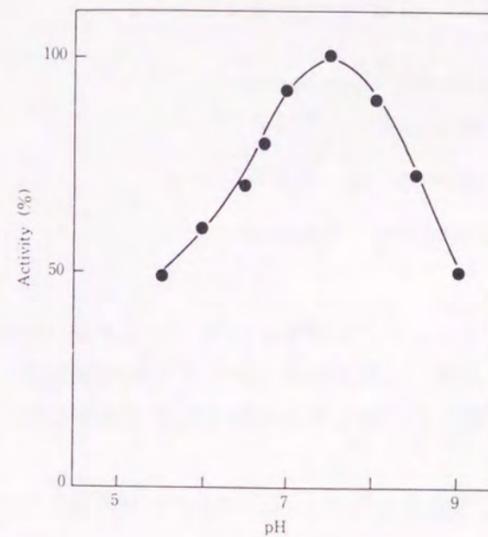


図1-4. NprMの至適pH. 酵素活性はそれぞれの緩衝液中で37℃で測定した. pH5.5-7.5:10mMクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.0-8.5:10mM トリス塩酸緩衝液, pH8.0-9.0:10mM ホウ酸緩衝液.

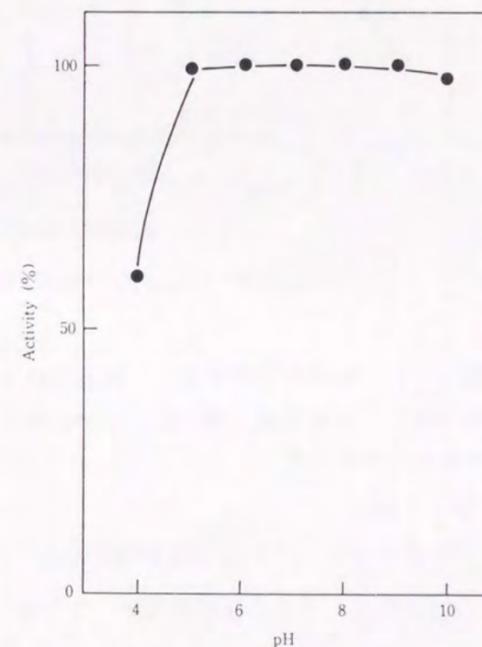


図1-5. NprMのpH安定性. 酵素液はそれぞれのpH、室温において24時間静置した. その後、その溶液を中和して37℃で酵素活性を測定した.

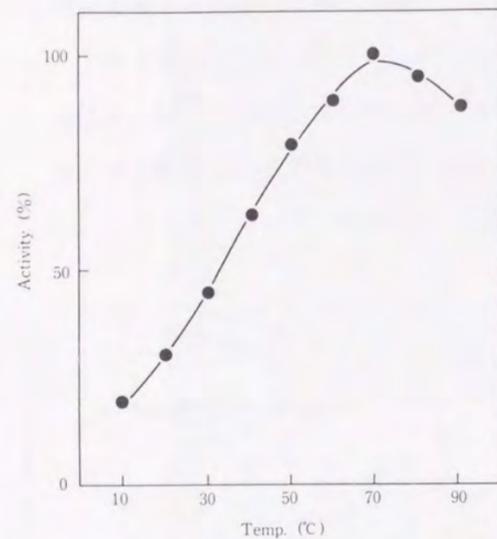


図1-6. NprMの至適温度. 酵素活性は安10mMトリス緩衝液 (pH7.5)を用い、各々の温度で測定した.

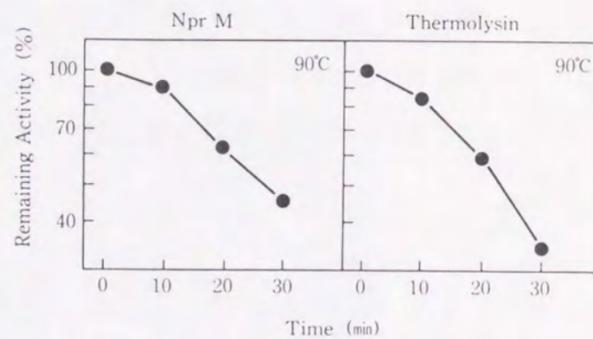


図1-7. NprMおよびサーモライシンの熱定性. 酵素溶液は90°Cで各時間保温後、直ちに冷却し残存活性を37°Cで測定した.

表1-1に示したように各種阻害剤の影響を調べた。キレート剤であるEDTAで活性は阻害されたが、DFP、およびPMSFでは阻害されなかったことよりNprMは金属プロテアーゼであることがわかった。

一方HPLCを用いたゲル濾過 (TSK-gel G-3000sw, 東ソー社製) により粗精製したNprMと市販のサーモライシンについてそれぞれ完全にシングルピークになるまで精製し両酵素のカゼインを基質とした比活性の測定を行った。その結果NprMの比活性は27,000 u/mg protein、サーモライシンは19,000 u/mg protein でありNprMの

方が約40%高い比活性を有していることがわかった。

表1-1. プロテアーゼ NprM の各種阻害剤.

阻害剤 ^a (mM)	活性 (%)
なし	100
EDTA (1)	19
(5)	11
(10)	2
DFP (1)	90
(5)	86
PMSF (1)	92
(5)	88

^a EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid,

DFP : diisopropyl fluorophosphate

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride.

第4節 考察

APMの合成を目的とし、従来使用されていた耐熱性中性プロテアーゼであるサーモライシンより耐熱性、比活性の優れたプロテアーゼの取得を目指し、その生産菌を土壌よりスクリーニングした結果、サーモライシンよりも耐熱性で約10%、またカゼインを基質とした場合約40%高い比活性を有する耐熱性プロテアーゼを得ることができた。表1-2にその性質をまとめた。

このプロテアーゼ (NprM) は分子量、至適pH等、サーモライシンと非常によく似た性質を有する酵素であった。しかし、耐熱性や比活性が、サーモライシンより優れた性質を有していることからほとんど同じ構造を有しているが、微妙な差異もあることが予想される。これら両酵素の分子構造の違いを比較することは非常に

興味を持たれる点である。

表1-2. NprMの諸性質.

分子量 (MW)	34,000
至適 pH	7~8
至適温度	約70°C
等電点	9.4
耐熱性	90°C、30分の熱処理後、約45%の 残存活性
比活性 (基質: カゼイン)	27,700 u/mg protein
pH安定性	pH 5~10、室温で24時間は安定
熱安定性	70°C以下では安定
阻害剤	EDTA

親株であるMK232株よりアルカリ性プロテアーゼ欠損株を取得することにより、定常期以降、本酵素の分解を押さえることができた。またグルコース抑制、窒素抑制を解除することにより、安価な糖蜜や硫酸アンモニウムを培地中に添加することが可能となり、工業的醗酵生産においても有利になるとと思われる。

第5節 要約

1. 土壌より耐熱性プロテアーゼを生産する菌株を一次スクリーニングし、約2,000株の好熱菌を分離することができた。さらにその中から耐熱性中性プロテアーゼを効率良く生産するMK232株を分離することができた。
2. 種々の変異処理により親株のMK232株より約2倍高い酵素生産性を示すYG18

5株を分離することができた。

3. MK232株、YG185株の生産する耐熱性プロテアーゼ (NprM) の諸性質を調べたところ、分子量34,000、中性付近に至適pHを有する金属プロテアーゼであった。またNprMは非常に安定な酵素であり、サーモライシンより耐熱性で約10%、比活性で約40%高い酵素であった。

第2章 *Bacillus stearothermophilus*
MK232 由来耐熱性中性プロテ
アーゼ遺伝子のクローニングと
その塩基配列

第1節 緒言

従来、耐熱性中性プロテアーゼとして工業的にも広く使用されてきたサーモライ
シン (EC 3. 4. 24. 4) は、1972年 Matthews、Titani等によりそのアミノ酸配列
が明らかにされ、その後X線結晶構造解析によりその立体構造が決定された。ま
たこれらの知見に基づき、活性中心や基質結合部位が明らかにされた(33, 34, 35)。

一方、好熱菌由来中性プロテアーゼ遺伝子は1983年、Takagi等(24)によって*B.*
subtilis および *B. stearothermophilus* の系を用いてクローニングされ、その全
塩基配列が明らかにされた。この酵素 (NprT) は *Bacillus* 属細菌の生産するプ
ロテアーゼに見られる特有のプレプロ構造を有し、サーモライシンと非常に高い
相同性を示した(85%の相同性)。このように特定の遺伝子をクローニングする
ことは、塩基配列レベルでの解析を可能にし、また塩基配列からアミノ酸配列を推
測することができるだけでなく、遺伝子増幅効果を利用した酵素の生産性増大も期
待できる。1986年、Imanaka 等(20)は *nprT* 遺伝子を用い、部位特異的変異導
入 (site-directed mutagenesis) の手法を用い、 α -ヘリックス中に変異を導入
することにより、NprTの耐熱性を上昇させることに成功した。しかしながらサー
モライシンに比べると、その耐熱性は低いままであった。

第1章において土壌より、耐熱性中性プロテアーゼを生産する好熱菌を分離し、
その酵素の諸性質を調べたところ、この酵素はサーモライシンより耐熱性、比活性
共に高い有用な酵素であった(36)。そこで、NprMの分子構造を解析し、サーモ
ライシンとの違いを明らかにすること、また遺伝子増幅効果により酵素生産の増大
を目指し、*nprM* 遺伝子のクローニングおよびその解析を試みた。

第2節 実験材料および方法

使用菌株、ファージ、およびプラスミド

使用した菌株、ファージ、およびプラスミドを表2-1に示した。

表2-1. 使用菌株、ファージおよびプラスミド。

菌株	特性	由来
<i>B. stearothermophilus</i>		
MK232	Cm ^r <i>nprM</i> ⁺	(36)
YG185	R ^r Cm ^r <i>nprM</i> ⁺	(36)
<i>B. subtilis</i>		
MT-2	<i>trpC2 leuC7 hsrM hsmM Npr</i>	(54)
<i>Escherichia coli</i>		
K-12 JM103	Δ (<i>lac pro</i>) <i>thi strA</i> <i>endA sbcB hsdR</i>	(53)
ファージ		
ファージM13 mp10		(53)
mp11		(53)
プラスミド		
pTB53	Tc ^r Km ^r	(55)
pNP22	Tc ^r Km ^r <i>nprT</i> ⁺	(24)

Tc^r : テトラサイクリン耐性、Km^r : カナマイシン耐性、R^r : リファマイシン
耐性、Cm^r : クロラムフェニコール耐性

培地

L 培地、L 寒天培地、およびLC寒天培地を用いた(第1章記載)。抗生物質と
して、カナマイシンは5 μ g/ml、テトラサイクリンは20 μ g/mlの濃度を用いた。

プラスミドおよび染色体DNA の分離

染色体DNA の調製はWarrick とLederberg の方法 (37) を改変して以下のように行った。 *B. stearothermophilus* の場合は50°C、*B. subtilis* の場合では37°CでL培地にて一夜培養した100 ml培養液より遠心集菌後、菌体を緩衝液(10 mM トリス塩酸塩、1 mM EDTA、pH8.5) で洗浄した。次に1 mg/ml (*B. stearothermophilus*) または5 mg/ml (*B. subtilis*) のリゾチームを含む50 mM トリス塩酸塩、50 mM EDTA、15%スクロース(pH8.5) 液3 mlに懸濁し、37°Cで30分間放置した。その後、50 mM トリス塩酸塩、50 mM EDTA、1% Sarkosyl (pH8.5) 液3 mlを加えて溶解させDNA 粗標品を得た。これを塩化セシウム-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(10 mM トリス塩酸塩、0.1 mM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。

プラスミドの調製は、BirnboimとDoly (38) 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(5 ml) 中で37°Cにて約16時間培養した*B. subtilis* 培養液1 mlをエッペンドルフ遠心管に移して遠心集菌後、得られた菌体を100 μ l の25 mM トリス塩酸(pH7.4)、10 mM EDTA、50 mM グルコース、5 mg/ml リゾチーム溶液に懸濁し、37°C、30分間保持した。次に0.1N NaOH - 1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 溶液 200 μ l を加え混合した。氷中で5分間保った後、3 M 酢酸カリウム(pH4.8) を150 μ l 加え混合し、氷中で15分以上静置後、10,000 \times g、5分遠心を行った。遠心上清約0.4 ml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 400 μ l を加えて混合し、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 \times g、5分) によってDNA 沈殿を集め、70%エタノールでリンスの後、真空乾燥した。これを100 μ g RNaseAを含む35 μ l のTE緩衝液に溶かし、37°Cで30分間保温した。プラスミド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分離にかけて精製した後、TE緩衝液に懸濁し4°Cで保存した。またDNA の染色には、臭化エチジウム1%溶液を使用した。

DNA の電気泳動および回収法

DNA の解析には、アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた(39)。アガロースゲルからのDNA の回収は、Gene clean(Bio 101 Inc. CA U.S.A.) を使用し行った。ポリアクリルアミドゲルからDNA の回収は、Maniatis等(60) の方法に従った。

形質転換

E. coli の形質転換はImanaka 等の方法(40) に従った。CaCl₂ 処理したコンピテント細胞はグリセロール(終濃度20% V/V) を加え、-80°Cで凍結保存したものを使用した。形質転換株の選択には、アンピシリン(20 μ g/ml) を用いた。

B. subtilis のコンピテント細胞はAnagnostopoulos とSpizizenの方法(41) に従って調製した。5 mlのL培地中で37°C、一夜培養した培養液1 mlをTF I培地(K₂HPO₄ 14g, KH₂PO₄ 6g, (NH₄)₂SO₄ 2g, クエン酸ナトリウム 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, L-ロイシン 50 mg, L-トリプトファン 50 mg, カザミノ酸 0.2 g/l 20 ml) に植菌し、37°Cで培養した。対数増殖期からはずれて約1時間後(植菌後 3.5-3.75 時間) にその4 mlをTF II培地(K₂HPO₄ 14g, KH₂PO₄ 6g, (NH₄)₂SO₄ 2g, L-ロイシン 5 mg, L-トリプトファン 5 mg, カザミノ酸 0.1g/l) 36 ml) に植菌し、1.5 時間培養することによりコンピテント細胞を得た。コンピテント細胞1 mlとDNA (約1 μ g) を混合し、37°C、30分、振とう培養した後、5,000 \times g、5分間遠心し集菌した。これに3 mlのL培地を加え、37°Cでさらに2時間培養することにより、プラスミドの遺伝子発現を行わせた。

この培養液を薬剤を含むLCまたはL寒天培地に塗布し37°C、一夜培養することにより形質転換株を得た。

DNA 塩基配列決定

DNA の塩基配列決定は、*E. coli* JM103 およびファージM13 mp10、mp11を用いて、ジデオキシ法(57, 58) で行った。両方向の配列を決定し、制限酵素部位を挟む形で行った。使用した配列決定用のゲル濃度は、ポリアクリルアミド8%、および6%ゲルとした。

菌体外プロテアーゼの精製

培養上清を粗精製後（第1章、第2節記載）10 mlの緩衝液（50 mM トリス塩酸、5 mM CaCl₂ pH7.5）に溶解後、Toyopearl HW-50（ゲル濾過）およびHPLC TSK gel G-2000swを用い完全に単一ピークになるまで精製した。アミノ酸配列決定のためには、自己消化を防ぐため、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。この沈澱を遠心して（15,000×g、30分）回収後、0.8 mlの蟻酸に溶解させた。脱塩後、TSK gel phenyl 5PW RP（逆相クロマトグラフィー）にかけピークを回収した。このサンプルは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ケンサーを使用した。フェニルチオヒダントイン誘導体となったアミノ酸をHPLCにより解析した。

アミノ酸配列の相同性検索

アミノ酸配列の相同性検索はパーソナルコンピューター NEC PC-9801と“GENIAS”（三井情報）を使用して解析した。

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シーケンスキットは宝酒造（株）より購入した。（ α -³²P）-CTPはアマーシャムより購入した。他の試薬類については、第1章、第2節で述べた。

第3節 結果

2.3.1. 耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子(*nprM*)の枯草菌におけるクローニング

nprM 遺伝子の塩基レベルでの解析を行うため枯草菌中で *nprM* 遺伝子のクローニングを試みた。まず *B. stearothermophilus* MK232 株および YG185 株からの染色体DNA（約5 μ g）をそれぞれ *Pst* I で消化後、*Pst* I で消化した pTB53（約2 μ g）とを連結した（全量50 μ g）。連結混合物を用いて *B. subtilis* MT-2 株を形質転換した。5 μ g/mlのカナマイシンを含むLC寒天培地で選択し、それぞれ約10⁵個の形質転換株を得た。MK232 株からは8株、YG185 株からは6株、ハローを形成する株を取得することができた。それらの株はすべて同時にテトラサイクリン耐性株であった。それぞれの株（Km^r、Tc^r、Npr^r）からプラスミドを調製し、MT-2株を再形質転換してもその表現型は変化しなかった（Km^r、Tc^r、Npr^r）。

さらに耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子がコードされているか否かを確認するため、形質転換株の菌体外プロテアーゼの諸性質を調べた。その結果、これらのプロテアーゼは金属プロテアーゼの阻害剤であるEDTAによって阻害を受けたが、セリンプロテアーゼの阻害剤であるPMSFによっては阻害されなかった。また至適pHは7~8を示し、これらのことから中性（金属）プロテアーゼであると結論された。また65°C、15分間の熱処理を加えても、これらのプロテアーゼは活性低下が認められず、耐熱性のプロテアーゼであった。これらの結果から、*B. stearothermophilus* MK232 株および YG185 株由来耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子(*nprM*)が枯草菌中にクローン化されたことが明らかとなった。

nprM 遺伝子を有する組換えプラスミドを pTZ232（MK232 株由来）および pTZ185（YG185株由来）とそれぞれ命名した。pTZ232は *B. stearothermophilus* MK232 株由来の遺伝子5.5Md を含んでいた。pTZ232の制限酵素地図を図2-1に示す。1.2Mdの *Sal* I - *Pst* I 断片を欠失させたとき、プロテアーゼ活性は失われなかったが、2.0Mdの *Bam* H I - *Pst* I 断片や、1.5Mdの *Hpa* I - *Pst* I を pTZ232から欠失させたときは、プロテアーゼ活性は見出せなくなった。これらの結果から、*nprM* 遺伝子は pTZ232の *Hin* d III - *Pvu* II 付近にコードされているものと考えられた。

一方、pTZ185を用い同様の解析を行ったところ、全く同じ結果が得られた。このことより、後の解析は親株であるMK232 由来の pTZ232を用いた。

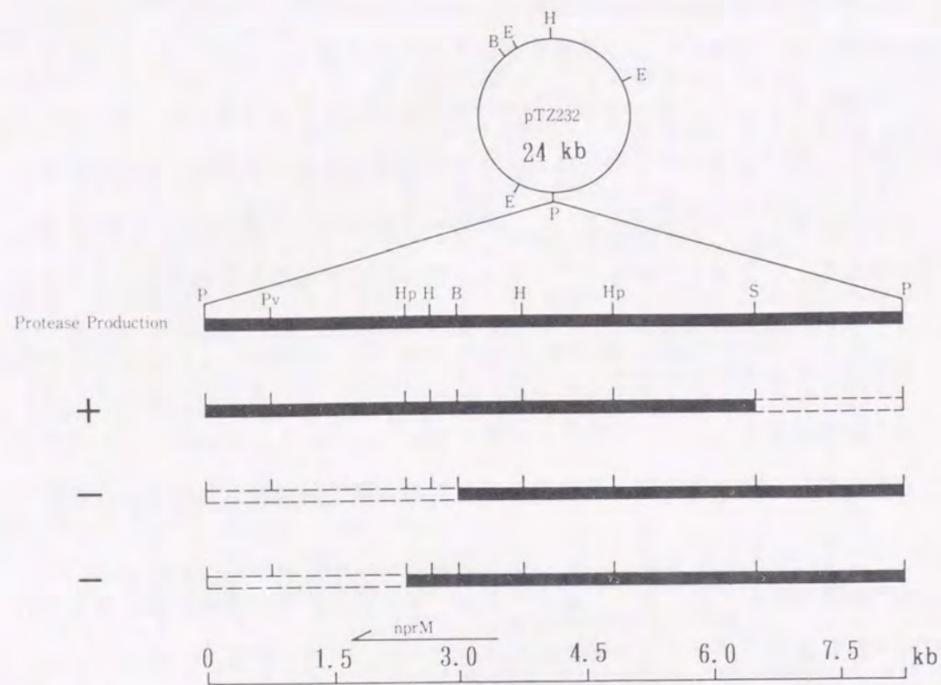


図2-1. プラスミドpTZ232およびその誘導体の制限酵素地図。黒太線は *B. stearothermophilus* MK232 由来 DNA。破線は欠失部分を示す。制限酵素部位の *Bam* H I、*Eco* R I、*Hin* d III、*Hpa* I、*Pst* I、*Pvu* II、および *SaI* I はそれぞれ B、E、H、Hp、P、Pv、および S で示す。nprM 遺伝子の位置と転写方向は矢印で示す。

2.3.2. nprM 遺伝子の塩基配列決定

nprM 遺伝子とその周辺領域の塩基配列を、ジデオキシ法を用いて決定した(図2-2)。その塩基配列中には唯一の大きな読み取り枠(ORF)が存在し、それは1656塩基(552アミノ酸残基)から成り立っていた。シャイン-ダルガノ(SD)配列が、翻訳開始部位(ATG)から12bp上流に見出された(42)。

またTakagi等によってクローニングされた耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子(nprT)(24)のプロモーター配列(-35領域:TTTCC, -10領域:TATTT)と非常によく似た領域がみられ、この領域がnprM 遺伝子のプロモーター配列と予想された

```

CATGCATAGGAAAATGTGAAAACCGTAAGGAATTATCAACTATATCAGACTCTATTTTCCCAATACAAATA
-100'
-35 region

CTGTAATATTTGTGTAAATATTCTAATAACAAAGAAATAAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGAAATGGAAA
-10 region
SD

+1
ATGAAAAGGAAAATGAAAATGAAATTACGATCGTTGGTGTTCAGCAGGACTAGCGGCCCAAGTATTTTACCT
MetLysArgLysMetLysMetLysLeuArgSerPheGlyValAlaAlaGlyLeuAlaAlaGlnValPheLeuPro
1 25
TACAATCGGCTGGCTTCATCGGAAACGTTACATGGAACCAACAATTTCAAACCCTCAATTCATCTCCGGTGA
TyrAsnArgLeuAlaSerThrGluHisValThrTrpAsnGlnGlnPheGlnThrProGlnPheIleSerGlyAsp
100 50
CTGCTGAAAAGTGAATGGCAATCCCGAGAAAGAACTCGTCTATCAATATGTTGAAAAAACAAGAAATTTAAA
ArgLeuLysValAsnGlyThrSerProGluGluLeuValTyrGlnTyrValGluLysAsnGluAsnLysPheLys
200 75
TTTCAATGAAAACGCTAAGGATACTCTACAATTGAAAGAAAAGAAATGATAACCTTGGTMTTACGTTTATCGGC
PheHisGluAsnAlaLysAspThrLeuGlnLeuLysGluLysLysAsnAspAsnLeuGlyPheThrPheMetArg
300 100
TTCCAACAAACGTATAAAGGATTCCTGTGTTGGACAGGTAGTAAGTGCACGCGTAAAGATGGCAGCCTGACG
PheGlnGlnThrTyrLysGlyIleProValPheGlyGlnValValThrAlaHisValLysAspGlySerLeuThr
400 125
GCGCTATCAGGGACACTGATTCCAATTCGGAATTTGGACACGAAAGGATCCTTAAAAACGGGAAGAAATGAGT
AlaLeuSerGlyThrArgIleProIleProAsnLeuAspThrLysGlySerLeuLysSerGlyLysLysLeuSer
500 150
GAGAAACAAACCGCGTGACATGCTGAAAAGATTTAGTGCAAATGTAACAAAGGAAGTACCAGGAATATGAACAG
GluLysGlnAlaArgAspIleAlaGluLysAspLeuValAlaAsnValThrLysGluValProGluTyrGluGln
600 175
GGAAAGACACCGAGTTTGTGTTTATGTCAATGGGACGAGGCTTCTTTAGCGTACGTTGTCAATTTAAACTTT
GlyLysAspThrGluPheValValTyrValAsnGlyAspGluAlaSerLeuAlaTyrValValAsnLeuAsnPhe
700 200
TTAACTCCTGAACCAGGAAACTGGCTGTAATATCATTGATGCCGTAGACGAAAAAATTTTAAATAAATTTAACCA
LeuThrProGluProGlyAsnTrpLeuTyrIleIleAspAlaValAspGlyLysIleLeuAsnLysPheAsnGln
800 225
CTTGACGCGCCAAAACCAGGTGATGTGAAGTCAATACAGGAACATCAACTGTCGAGTGGGAAAGAGGACTACTT
LeuAspAlaAlaLysProGlyAspValLysSerIleThrGlyThrSerThrValGlyValGlyArgGlyValLeu
900 250
GGTGATCAAATAATTAATACAACCTACTCTACGTACTACTATTTACAGATAATACCGTGGAAATGGGATT
GlyAspGlnLysAsnIleAsnThrThrTyrSerThrTyrTyrTyrLeuGlnAspAsnThrArgGlyAsnGlyIle
1000 275
TTCACTGATGATGCGAAATACCGTACGACATTCGCGGGAAGCTTATGGGCAGATGCAGATAACCATTTTTCG
PheThrTyrAspAlaLysTyrArgThrThrLeuProGlySerLeuTrpAlaAspAlaAspAsnGlnPhePheAla
1100 300
AGCTATGATGCTCCAGCGGTGATGCTCAATATTACGCTGTGTGACATATGACTACTATAAAAAATGTTTATAAC
SerTyrAspAlaProAlaValAspAlaHisTyrTyrAlaGlyValThrTyrAspTyrTyrLysAsnValHisAsn
1200 325

```

1000
 CGTCCTCAGTTACGAACGGAAATAATGCAGCTATTAGATCATCCGTTCATTATAGCCAAAGGCTATAAATAACGCATT
 ArgLeuSerTyrAspGlyAsnAsnAlaAlaIleArgSerSerValHisTyrSerGlnGlyTyrAsnAsnAlaPhe
 350
 1100
 TGGAACGGTTCGCAATGGTGTATGGCGATGGTGATGGTCAAACATTTAATCCACTTTCCTGGTGGTATTGATGTG
 TrpAsnGlySerGlnMetValTyrGlyAspGlyAspGlyGlnThrPheIleProLeuSerGlyGlyIleAspVal
 375
 1200
 GTCGCTCATGATTAAACGCATGCCGTAACCGATTATACAGCCGGACTCATTATCAAAAACGAATCTGGTGAATT
 ValAlaHisGluLeuThrHisAlaValThrAspTyrThrAlaGlyLeuIleTyrGlnAsnGluSerGlyAlaIle
 400
 AATGAGGCAATATCTGATAATTTTGGAAACGTTAGTCGAATTTTACGCTAAACAAAAATCCAGATTGGGAAATGGGA
 AsnGluAlaIleSerAspIlePheGlyThrLeuValGluPheTyrAlaAsnLysAsnProAspTrpGluIleGly
 425
 1300
 GAGGATGTGTATACACCTGGTATTTCAGGGGATTCCGTCCTCGATGTCGGATCCGGCAAAGTATGGTGGTATCC
 GluAspValTyrThrProGlyIleSerGlyAspSerLeuArgSerMetSerAspProAlaLysTyrGlyAspPro
 450
 1400
 GATCACTATCAAAGCGCTATACAGGCACGCAAGATAATGGCGGGTTCATCAATAGCGGAATATCAACAAA
 AspHisTyrSerLysArgTyrThrGlyThrGlnAspAsnGlyGlyValHisIleAsnSerGlyIleIleAsnLys
 475
 1500
 GCCGCTTATTTGATTAGCCAAGGCGGTACGCATTACGGTGTGAGTGTGTCGGAATCGGACGCGATAAAATGGGG
 AlaAlaTyrLeuIleSerGlnGlyGlyThrHisTyrGlyValSerValValGlyIleGlyArgAspLysLeuGly
 500
 AAAATTTCTATCGTGCATTAACGCAATAATTAACACCAACGTCCTCAACTTAGCCAACCTCGTGCTGCCGCTGTT
 LysIlePheTyrArgAlaLeuThrGlnTyrLeuThrProThrSerAsnPheSerGlnLeuArgAlaAlaAlaVal
 525
 1600
 CAATCAGCCACTGACTTGTACGGTTCGACAAAGCCAGGAAGTCGCTTCTGTGAAGCAGGCCTTTGATCGCGTAGGG
 GlnSerAlaThrAspLeuTyrGlySerThrSerGlnGluValAlaSerValLysGlnAlaPheAspAlaValGly
 550
 1700
 GTGAAATAAAGTGGTATCTCATCAGTGGGGATTTTTCCTCCACTGATGTTTGTGTTGATCAATGATGTCAG
 ValLys***

図2-2. 中性プロテアーゼ遺伝子 (*nprM*) の塩基配列とアミノ酸配列。
 塩基配列は翻訳開始部位を+1とした。アミノ酸配列は塩基配列の下に示す。成熟蛋白質領域のN末端アミノ酸配列は、エドマン分解法により決定し、アミノ酸配列の下に矢印で示す。アミノ酸配列は、翻訳開始アミノ酸 (Met) を1で示す。予想されるシャイン-ダルガノ配列 (SD) (塩基-18から-12) とプロモーター領域 (-35と-10領域) は塩基配列下に直線で示す。星印 (***) は、ストップコドンを示す。予想される転写終結領域は塩基配列の下に両向き矢印 (→←) で示す。サーモライシンと比べたときのアミノ酸置換を破線で示す。

(-35領域: TTTTCC, -10領域: TATTGT)。この配列はSD配列の約40 bp 上流に位置していた。

塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列には、一連の塩基性アミノ酸 (Lys, Arg) の後方に疎水性アミノ酸コアが続く典型的なシグナル配列が見られた (43)。また逆繰り返し配列とTTTTを含む典型的なターミネーター配列 (CATCAGTGGGGGATTTTTTTCCTCCACTGATGTTTT) がORF直後に見られた。

2.3.3. 菌体外耐熱性中性プロテアーゼのアミノ酸配列

NprMを *B. subtilis* MT-2/pMK1および *B. stearothermophilus* MK232 から分離精製し、これらの精製品を用いてN末端アミノ酸配列の決定を行った。N末端アミノ酸は全自動シーケンサーを用い5サイクル決定した。最初の5つのアミノ酸は Ile-Thr-Gly-Thr-Ser でありこの配列は、ATA (+709 から +711, Ile 図2-2) から始まる配列と完全に一致した。その配列に対応するアミノ酸を矢印で図2-2に示した。

一方、アミノ酸配列から菌体外に分泌されるプロテアーゼの分子量を計算したところ、316 アミノ酸、34,266ダルトンであり第1章、第3節で測定した分子量 (34,000ダルトン) とほぼ一致した。これらの結果から、*nprM* 遺伝子も *Bacillus* 属細菌の生産するプロテアーゼで一般的に見られる長いプレプロ構造 (本酵素の場合には236 アミノ酸) (44) として翻訳されることを示していた。

NprMの塩基配列から推測されるアミノ酸配列をサーモライシンのアミノ酸配列 (34) と比較検討した。その結果、NprMは2つのアミノ酸を除き、サーモライシンと全く同一であった。置換されているアミノ酸残基はAsp37 からAsn37 およびGlu119からGln119であり、いずれもアミノ基が付加されたアミノ酸への置換であった。NprMがサーモライシンに比べ、カゼインを基質とした場合の比活性と耐熱性が高いということは、これらのアミノ酸置換に起因しているものと考えられた。

一方、*B. stearothermophilus* CU21株由来耐熱性中性プロテアーゼ (NprT) との比較を行ったところ、成熟蛋白質領域では高い相同性を示した (85%) が、プレプロ領域においてはそれほど高い相同性は認められなかった (40%) (図2-3)。

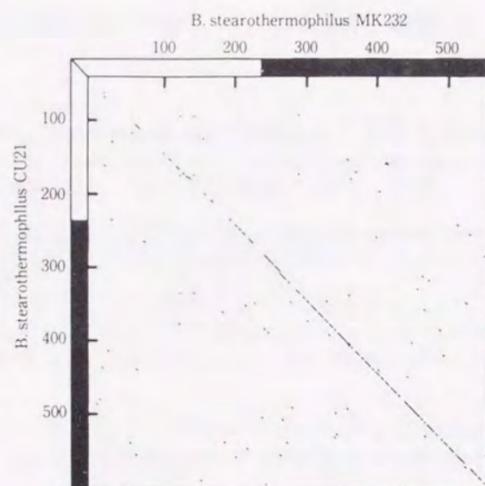


図2-3. コンピューターによる *NprM* と *NprT* のアミノ酸配列の相同性. 白抜きの太線はプレプロ領域、黒の太線は成熟蛋白質領域を示す. 数字はN末端からのアミノ酸数を示す. 最少相同領域の長さは3アミノ酸とした.

2.3.4. *nprM* 遺伝子および *nprT* 遺伝子の枯草菌中での発現

第2章、第3節で示したように *nprM* 遺伝子と *nprT* 遺伝子の有するプロモーター配列は非常によく似た配列であった。しかしながら *B. stearothermophilus* MK232 (*nprM* 遺伝子を有する) と *B. stearothermophilus* CU21 (*nprT* 遺伝子を有する) の親株のプロテアーゼ発現率を比較するとMK232株の方がはるかに多量のプロテアーゼを生産していた。そこで枯草菌を用い両遺伝子を同じ条件で発現させ、各発現量の比較を行った。

nprM および *nprT* 遺伝子を図2-4に示したように、低コピー数プラスミドベクターであるpTB53を用いサブクローニングし枯草菌に導入した。*nprM* および *nprT* 遺伝子を、それぞれpTNM53とpTNT53に命名した。pTNM53とpTNT53を保持する *B. subtilis* MT-2株を24時間、37°Cで同条件で培養したところ、pTNM53を保持する株のほうが約20倍高い活性を示した。一方、生育は両株ともほぼ同様であった(図2-5)。このように親株同様、*B. subtilis* 内においても *nprM* 遺伝子のほうがかなり高い生産性を示した。

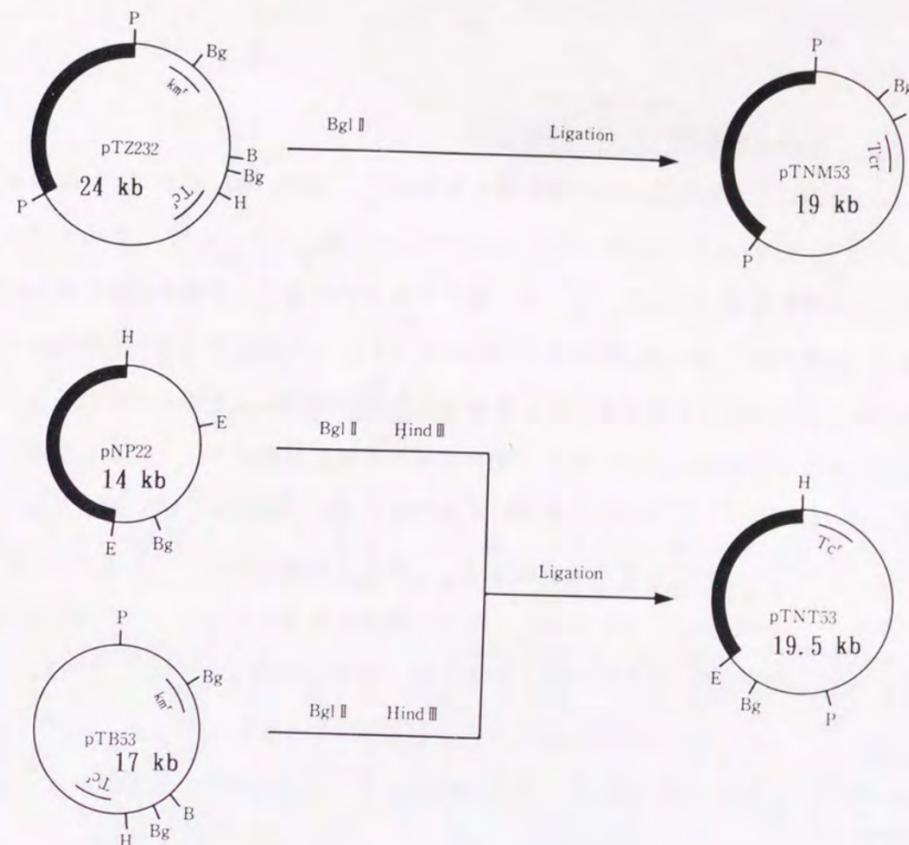


図2-4. pTNM53とpTNT53の構築. pTZ232とpNP22の太線はそれぞれ *B. stearothermophilus* MK232と *B. stearothermophilus* CU21由来DNAである. Km^r と Tc^r はそれぞれカナマイシンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を示す.

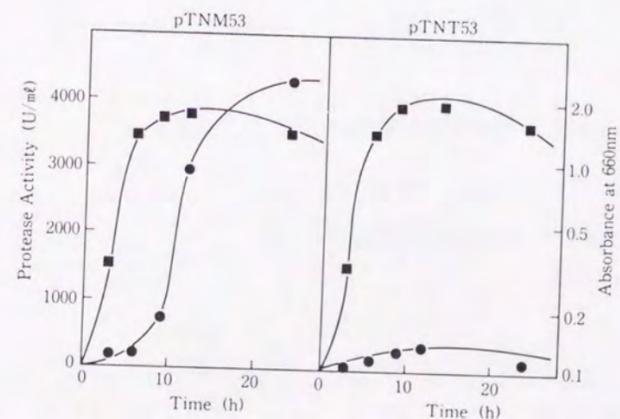


図2-5. pTNM53とpTNT53を保持する *B. subtilis* MT-2の菌体増殖とプロテアーゼ生産における経時変化. 培養は20 μ g/mlのテトラサイクリンを含むL培地を用い37°Cで行った. 培養液中の菌体増殖は■、酵素活性は●、で示す.

2.3.5. NprMの枯草菌を用いた醗酵生産

NprMを遺伝子増幅効果により増産させる目的で、*nprM* 遺伝子をコピー数の異なるプラスミドベクターにサブクローニングした(図2-6)。これらのプラスミド保持株を培養した結果、高コピー数プラスミドベクターであるpUB110を用いた場合、予想に反し高い酵素活性は得られなかった。これはプラスミドが高コピーのため、宿主に過大な負担をかけ、結果として不安定化したものと思われる。実際プラスミド脱落株や *nprM* 欠失プラスミドが多数認められた。しかしながら、低コピー数プラスミドベクターを用いた場合は、pMK1、pMK2共、高い酵素活性を示した。そこでpMK1を有する枯草菌を用い、酵素の醗酵生産について調べた(図2-7)。その結果、6,000 u/ml以上の高い酵素活性を示した。またSDS-PAGEでの培養上清の蛋白質の挙動を分析したところ、酵素活性の上昇に伴い、NprM(34,000ダルトン)のバンドが増大し菌体外に分泌されていることが判った(図2-8)。24時間後には総分泌蛋白質のうちNprM蛋白質が占める割合は、約20%に達していた。

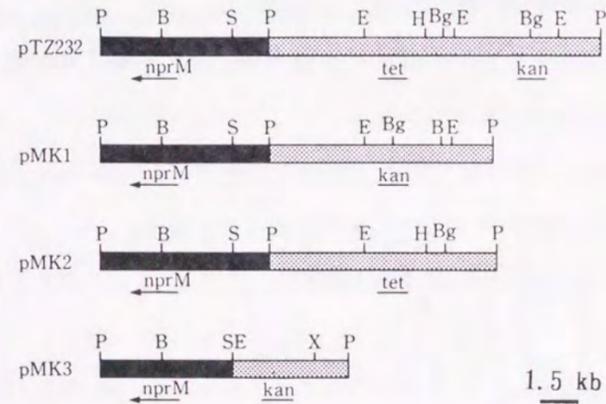


図2-6. pMK1、pMK2、pMK3の構築。黒太線は *B. stearothermophilus* MK232 由来 DNAを示す。pTZ232、pMK1、pMK2はそれぞれ低コピー数プラスミドであるpTB53、pTB51、およびpTB522を用いた。pMK3は高コピー数プラスミドであるpUB110を用いた。制限酵素部位の *Bam* HI、*Bgl* II、*Eco* RI、*Pst* I、*Sal* I、および *Xba* I はそれぞれB、Bg、E、P、S、およびXで示す。*nprM* 遺伝子の位置と転写方向は矢印で示す。カナマイシンとテトラサイクリン遺伝子はそれぞれkanとtetで示す。

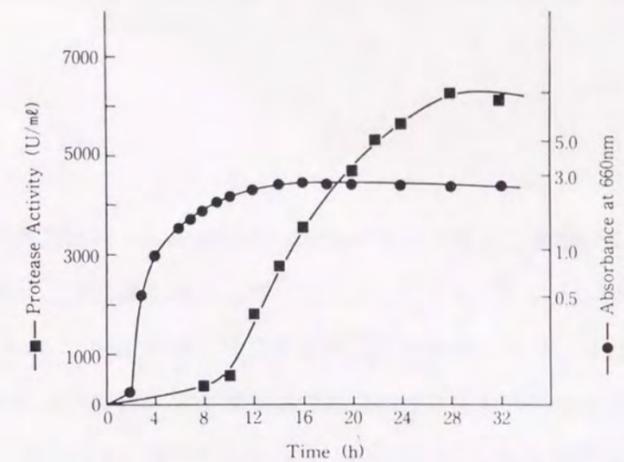


図2-7. pMK1を保持する *B. subtilis* MT-2の菌体増殖とプロテアーゼ生産における経時変化。培養は5 μ g/mlのカナマイシンを含むL培地を用い37°Cで行った。菌体増殖は●、培養液中の酵素活性は■、で示す。

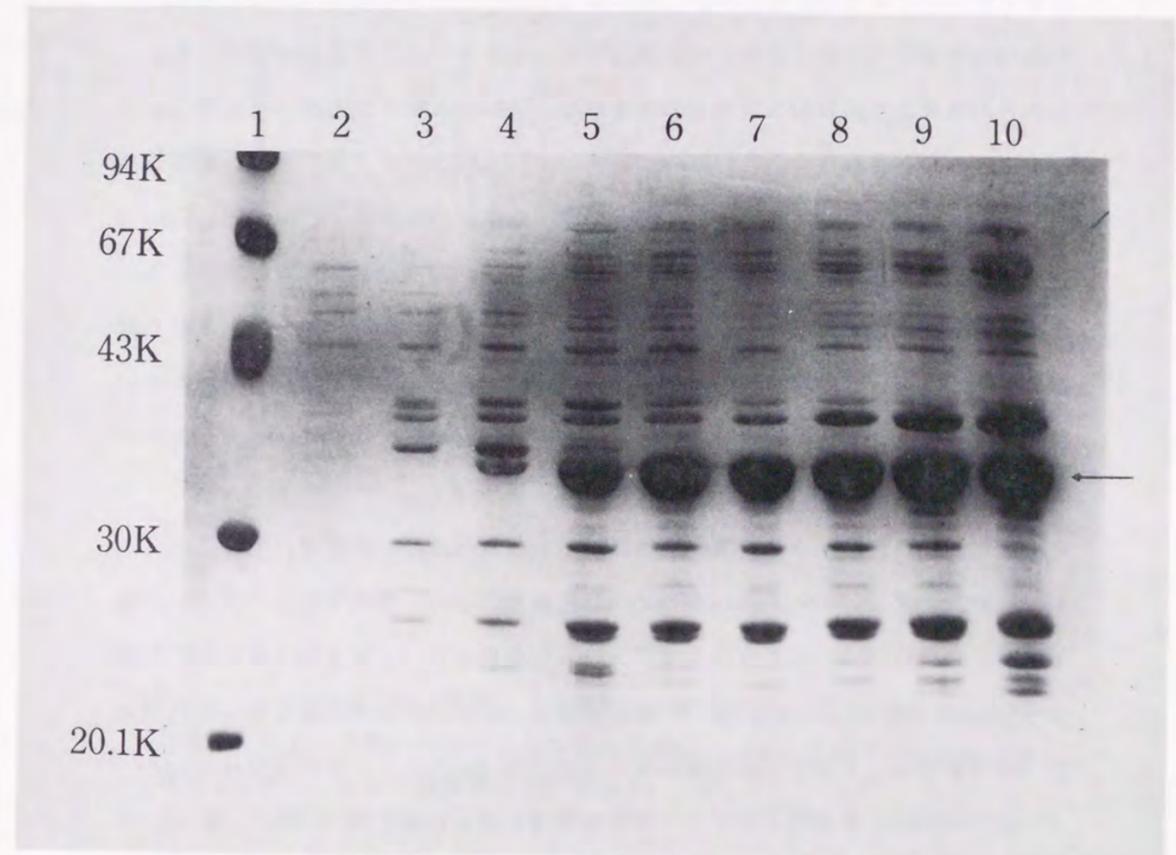


図2-8. *B. subtilis* MT-2/pMK1の培養上清のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動。レーン1:標準蛋白質マーカー(94.0K:phosphorylase b, 67.0K:albumin, 43.0K:ovalbumin, 30.0K:carbonic anhydrase, 20.1K:trypsin inhibitor)。レーン2、3、4、5、6、7、8、9、および10は各培養時間のサンプル(4、6、8、10、12、14、16、20、および24時間)。K:kilodaltons。

第4節 考察

本研究において新規に分離した *B. stearothermophilus* MK232 株の生産する耐熱性中性プロテアーゼはサーモライシンに比べ、耐熱性で約10%、比活性で約40%高かった。これらのアミノ酸配列を比較するため、枯草菌中で *nprM* 遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定したところ、塩基配列から推定したアミノ酸配列は、2つのアミノ酸置換 (Asp37 から Asn37 および Glu119 から Gln119) 以外はサーモライシンのそれと全く相同であった。本酵素の立体構造は別途決定されており、図2-9に示す。ここで示された両アミノ酸置換とも酸性アミノ酸へのアミノ基の付加であり、電荷を持たないアミノ酸になっていた。2つのアミノ酸置換は、Domain A で生じたものであり、Domain B はサーモライシンと全く相同であった。それらの置換は蛋白質の3次構造の変化がなく Domain A 中の静電的バランスに役立っているのかもしれない。さらに Asn37、Gln119 というアミノ酸置換は、静電的バランスの変化と合わせ近傍のアミノ酸との間に水素結合を形成し、結果的に Domain A をさらに安定化したのかもしれない。また Argos 等 (45) による酵素の耐熱化の統計的処理によると、Asp から Asn へのアミノ酸置換は熱安定性を向上させる置換である。これらの置換は、自然界での進化過程において水素結合の付加あるいは良好な静電状態形成可能なアミノ酸置換が生じ、耐熱性、比活性が上昇した一つの例であると思われる。

一般に、好熱性細菌由来の遺伝子における GC 含量は高いと言われている (46, 47, 48)。 *B. stearothermophilus* CU21 株由来、*nprT* 遺伝子のコーディング領域の GC 含量は 58 mol% であり、コドンの3文字目は 72 mol% という高い GC 含量を示した。驚いたことに、*nprM* 遺伝子のコーディング領域における GC 含量は 42 mol% と低く、3文字目はさらに低かった (36 mol%)。この数値は *B. amyloliquefaciens* の中性プロテアーゼ遺伝子 (それぞれ 46 と 49 mol%) (49) や *B. subtilis* の中性プロテアーゼ遺伝子 (それぞれ 44 と 42 mol%) (50) の GC 含量と似た数値であった。しかしながら *NprM* と *NprT* のアミノ酸配列における類似性は非常に高かった (図2-3)。また GC 含量がかなり異なっていたことから、これら2つの遺伝子は進化的に起源が異なっている可能性が強いものと考えられる。

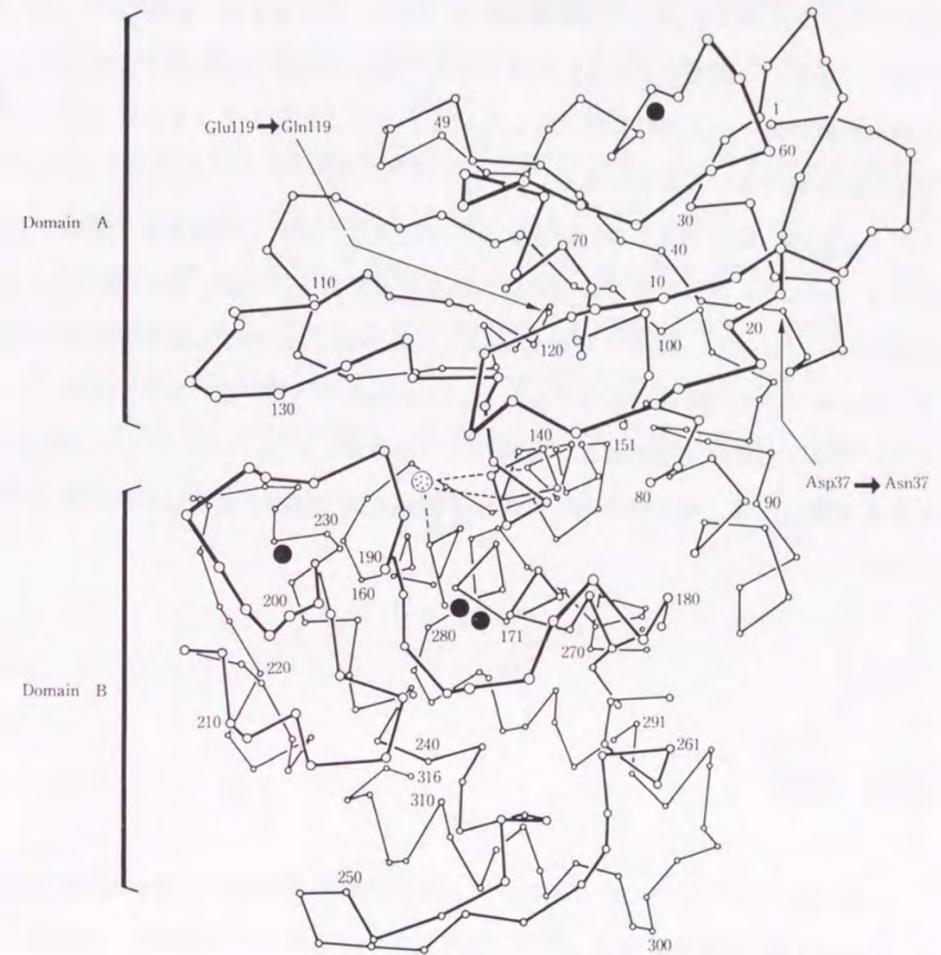


図2-9. *NprM* の3次元構造。白丸は α -炭素を示す。亜鉛原子を点刻丸で示し、アミノ酸とのリガンドを破線で示す。4つのカルシウム原子は黒丸で示す。アミノ酸置換は矢印で示す。

次に *nprM*、*nprT* 遺伝子の発現を枯草菌中で行い比較したところ、同様の条件下で培養を行ったにもかかわらず、酵素生産性は *NprM* のほうが *NprT* に比べ約20倍も高

かった。この違いは、(1) 図2-3で示したように成熟蛋白領域の相同性は高いが、シグナル配列やプロ構造がかなり異なっているため、分泌効率に差が現れた、(2) 両遺伝子のGC含量が大きく異なるため、枯草菌中におけるコドン利用頻度の違いが発現に影響を与えている、などに起因していると考えられるが、今後詳細な検討を行う必要がある。

一方、*nprM* 遺伝子をクローン化することにより、遺伝子増幅効果が期待できた。実際 *B. subtilis* /pMK1 を37°Cで培養した場合の酵素生産性は、約6,000 u/ml (約300 mg/ℓ) に達し、親株である *B. stearothermophilus* MK232 株を同条件で培養した場合に比べ約10倍高い活性を示した。pTB53 のコピー数は約9であり、コピー数に見合った遺伝子増幅効果が現れたものと考えられる。従って、工業的利用を考える場合には、枯草菌を用いた遺伝子組換え体の醗酵がさらに有利であると思われる。

第5節 要約

1. プラスミドベクターとして低コピー数のpTB53 を用い、*B. stearothermophilus* MK232およびYG185 株より耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子、*nprM*、を枯草菌内でクローン化した。
2. *nprM* 遺伝子の全塩基配列を決定したところ、本遺伝子は1,656 塩基 (552 アミノ酸) から成っていた。菌体外に分泌された成熟酵素について、そのN末端アミノ酸配列を決定した結果、N末端から236 アミノ酸はプレプロ構造であり、菌体外酵素は316 アミノ酸 (分子量34,266ダルトン) であることが判明した。サーモライシンと比較した結果、2つのアミノ酸置換 (Asp 37からAsn37 およびGlu119からGln119) を除いて同一であった。
3. *nprM* 遺伝子と相同性の高い *nprT* 遺伝子 (*B. stearothermophilus* CU21

由来の耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子) を用い、同じ低コピー数プラスミドベクターにサブクローン化し、*B. subtilis* における形質発現を比較したところ、*nprM* 遺伝子の方が約20倍高い活性を示した。

4. 遺伝子増幅効果による酵素生産性向上を調べるため、高コピー数および低コピー数プラスミドベクターにサブクローン化し、*B. subtilis* を宿主として生産性を比較したところ、予想に反し低コピー数プラスミドベクターの方が高い活性を示した。すなわち *B. subtilis* MT-2/pMK1 を用いて培養したところ、約6,000 u/ml (約300 mg/ℓ) の酵素を生産することができた。一方、高コピー数プラスミドの場合、宿主に過大な負担をかけ、不安定化していることが示された。

第3章 *nprM* の発現における遺伝子2次構造の役割

第1節 緒言

遺伝子発現は *E. coli* の系を用いて研究が進み、プロモーター配列、SD配列、シグナル配列、遺伝子増幅効果等の解析がなされている。特にプロモーター配列に関しては遺伝子発現と密接に関与している因子と考えられており、*E. coli* においてはその強度と発現の関係は詳細に調べられている (51)。

最近、遺伝子発現を支配する別の因子として遺伝子上の2次構造が注目されている。1982年 Hall 等 (52) は、*E. coli* の発現において mRNA 上の2次構造が翻訳開始を調節しているということを明らかにした。これはSD配列に存在する核酸上の2次構造が翻訳効率に影響を及ぼしていることを示したものである。このように遺伝子発現における核酸上の2次構造は重要な因子として認識されるようになってきた。

好熱菌 *B. stearothermophilus* MK232 株由来耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子 (*nprM*) は、中温菌である *B. subtilis* 内でクローン化され、全塩基配列が明らかにされた (第2章) (53)。またこの遺伝子を保有する *B. subtilis* は親株同様効率良く形質発現させた。一方、Takagi 等 (24) によって分離された好熱菌 *B. stearothermophilus* CU21 株由来耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子 (*nprT*) も *B. subtilis* 内でクローン化され、全塩基配列が決定された。これら両遺伝子を比較すると、塩基配列、アミノ酸配列とも比較的高い相同性が見られた (53)。特にプロモーター領域においては非常に高い類似性があった。また両遺伝子を *B. subtilis* 中において発現させたところ、*nprM* 遺伝子の方が同じ宿主菌、同じコピー数プラスミドにもかかわらず、約20倍高い酵素生産を示した (36, 53)。このように両遺伝子において比較的高い相同性があるにもかかわらず、このような発現の違いが見られるのは遺伝子構造の特性によるものか、またはコドン使用頻度の差異

によるものかその解析は非常に興味を持たれた。そこで第3章において構造遺伝子中の塩基配列の2次構造に着目し、遺伝子発現との関係について解析した。さらに原核生物の遺伝子発現に影響を及ぼすと思われる各領域において、2次構造の強度と遺伝子発現との関係をこれまで報告されているデータをもとに整理、比較した。

第2節 実験材料および方法

使用菌株、ファージ、およびプラスミド

使用した菌株、ファージ、およびプラスミドを表3-1に示した。

表3-1. 使用菌株、ファージおよびプラスミド.

菌株	特性	由来
<i>B. subtilis</i> MT-2	<i>trpC2 leuC7 hsrM hsmM Npr</i>	(54)
<i>Escherichia coli</i>		
K-12 JM109	<i>recA1.Δ(lac pro) endA1 thi-1 i strA gryA97 hsdR17 supE44F traD36 proA⁺ B⁺ lacI^q ZΔM15</i>	(56)
ファージ		
ファージ M13 mp18		(56)
mp19		(56)
プラスミド		
pMK1	Km ^r <i>nprM</i> ⁺	(56)
pUC19	Ap ^r	(56)

Km^r : カナマイシン耐性、Ap^r : アンピシリン耐性

培地

L培地、L寒天培地、およびLC寒天培地を用いた(第1章、第2節記載)。抗生物質として、カナマイシンは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、アンピシリンは $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を用いた。

DNA 操作

DNA は、TE緩衝液(10 mMトリス塩酸塩、0.1 mM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。

プラスミドを大量調製する場合は、第2章、第2節に従い調製、保存した。

オリゴヌクレオチドはDNA合成器(Model 380B, Applied Biosystems Co., Ltd. California, USA)を用い合成した。DNA塩基配列決定はファージM13mp18およびmp19を用いてジデオキシ法(57,58)で行った。

DNAの電気泳動および回収法

DNAの解析には、アガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた(39)。アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルからのDNAの回収は第2章、第2節に従った。

部位特異的変異導入法

Amersham oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system (Amersham Corp., Amersham, England)を用い変異を導入した。*nprM* 遺伝子を有するpMK1のHind III-Sph I断片をファージM13mp18にサブクローン化し一本鎖DNAを調製した。

形質転換

*E. coli*の形質転換はImanaka等の方法(40)に従った。CaCl₂処理したコンピテント細胞はグリセロール(終濃度20%V/V)を加え、-80°Cで凍結保存したものを使用した。形質転換株の選択には、アンピシリン($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)を用いた。

*B. subtilis*のコンピテント細胞はAnagnostopoulosとSpizizenの方法(41)に従って調製した(第2章、第2節)。

プロテアーゼ活性の測定法

カゼインを基質とし第1章、第2節記載の方法に従い測定した。

核酸上の2次構造の検索

核酸上の2次構造の検索はパーソナルコンピュータ NEC PC-9801を用い“GENIAS”(三井情報)を使用し解析した。検索条件は、以下の条件で行った。

Minimum stacking length	: 6 bp
maximum stacking energy	: -15 kcal/mol(-63kJ/mol)
maximum loop-out	: 25 bp

ノーザンプロット

ノーザンプロットはAlwine等の方法(61)に従い、Hybond-N hybridization transfer membranes (Amersham Corp.)を用いて行った。pMK1から*nprM* 遺伝子を含む1,210 bpのBam HI-Aat I DNA断片を分離し、Takara random DNA labeling kit (宝酒造(株))を用いて標識し、ハイブリダイゼーション・プローブとして用いた。プラスミドを保持する*B. subtilis*をL培地にて37°C、24時間培養し、遠心集菌後、全RNAはDuvall等(120)、Shimotsu等(67)の示した、ポイリング法に従い分離した。

核酸上の2次構造掲載論文の検索

核酸上の2次構造掲載論文の検索は、JOISサービス(JICST on-line information system, Tokyo)を利用し、キーワードとして“secondary structure”、“stability of mRNA”、“terminator”、“gene expression”等を用いた。1980-1989年の10年間から約600の論文を選択した。それらの論文の中からmRNA 2次構造の自由エネルギーと遺伝子発現効率との量的関係が記載されているものを選択

した。全てのΔG値の算出は、Tinoco等の方法(62)に従った。

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シーケンスキットは宝酒造(株)より購入した。(α-³²P)-CTPはAmersham Corp.より購入した。他の試薬類については、第1章、第2節で述べた。

第3節 結果

3.3.1. *nprM* 遺伝子中の2次構造の検索および2次構造の伸長、縮小を与える変異導入

同じ宿主、プラスミドに*nprM* および*nprT* 遺伝子を導入しそれらの酵素生産性を調べたところ、*nprM* 遺伝子の方が約20倍高い酵素生産性を示した(53)。両遺伝子ともアミノ酸配列、塩基配列において比較的高い相同性を有しているにもかかわらず遺伝子発現に大きな差が認められた。

一方、両遺伝子のG+C含量を比較すると、*nprM* 遺伝子は42 mol%、*nprT* 遺伝子は58 mol%であった(53)。このように*nprM* 遺伝子は好熱菌由来であるにもかかわらずG+C含量は低く、*Bacillus* 属細菌の中温菌とほぼ同程度であった。そこでこれらG+C含量の差に着目し、両遺伝子内における2次構造の検索を行った(表3-2)。その結果、*nprT* 遺伝子には合計8カ所の領域において2次構造が予測されたが、*nprM* 遺伝子においてはわずか1カ所見られるのみであった。この理由の一つはG+C含量の高い*nprT* 遺伝子においてより安定な2次構造形成が可能であったためだろうと考えられた。

これら核酸上の2次構造が、遺伝子発現に影響を及ぼしているかどうか明らかにするため、*nprM* 遺伝子上に唯一存在する2次構造領域に着目し、アミノ酸配列を変化させずに、2次構造の伸長、縮小を与える変異を導入した。部位特異的変異

導入のために、次の合成DNAを使用した。pMK2として、5'-AGCTATGAC*GCA*CCAGCGGT-3' (Ser-Tyr-Asp-Ala-Pro-Ala)、pMK3として5'-GATGCTCCT*GCA*GTTGATGC-3' (Asp-Ala-Pro-Ala-Val-Asp)を化学合成した(星印を付した塩基について変更した)。

表3-2. *nprM* と*nprT* の2次構造領域.

遺伝子	相対位置 ^a	塩基配列番号 ^b	塩基配列	エネルギー (kJ/mol)
<i>nprM</i>	56	913-918	CCAGCG	-68.2
		941-936	GGTCGC	
<i>nprT</i>	4	104-109	CGCCGA	-72.0
		123-118	GCGGCT	
<i>nprT</i>	18	320-331	ATACCGTGATGC	-117.2
		356-345	TATGGCACTACG	
<i>nprT</i>	41	710-715	GCCGCC	-88.7
		726-721	CGGCGG	
<i>nprT</i>	42	732-739	GCCGGTCG	-75.3
		759-752	CGGCTGGC	
<i>nprT</i>	56	958-963	GACGCC	-68.2
		981-976	CTGCGG	
<i>nprT</i>	66	1109-1115	ACGGCGA	-66.1
		1141-1135	TGCCGTT	
<i>nprT</i>	75	1281-1286	CGCAA	-64.4
		1312-1307	GCGGTT	
<i>nprT</i>	80	1334-1340	TCGCCGG	-92.0
		1370-1366	AGCGGCC	

^a 全ての長さ(プレ、プロおよび成熟蛋白質領域)を100として、N末端側からの相対位置で示す。

^b *nprM* および*nprT* の塩基配列は、参考文献(53)(24)から引用した。上段は5'から3'、下段は3'から5'方向である。

pMK2およびpMK3はそれぞれ新たな制限酵素部位、*Hga* I、*Pst* Iをそれぞれ含むように設計した。変異導入の確認は新たな制限酵素による切断およびDNA塩基配列決定により確認した。図3-1にそれぞれのプラスミドが形成可能な、2次構造を示した。

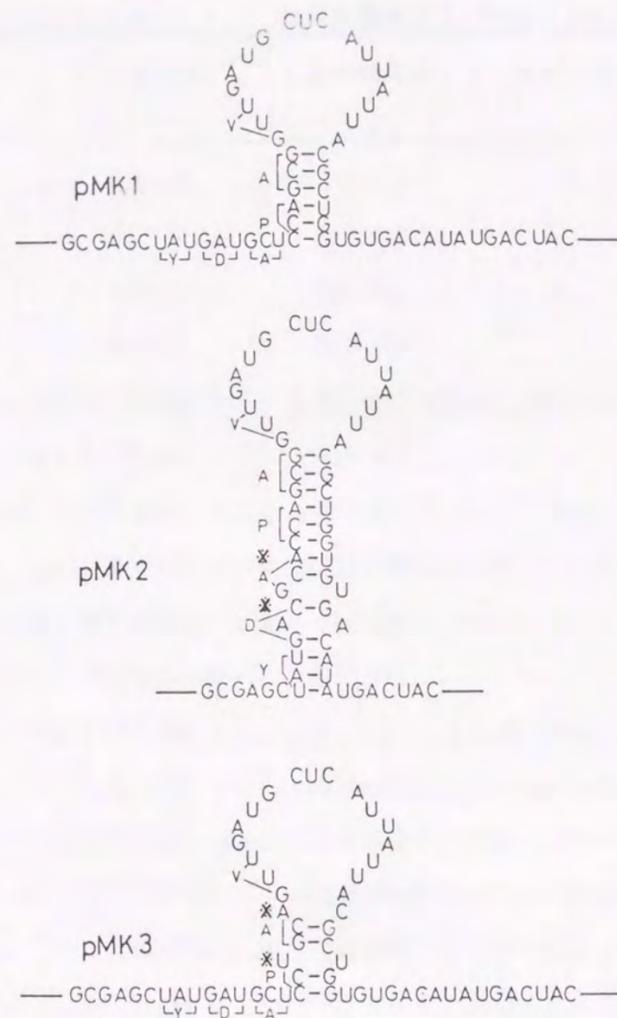


図3-1. pMK1(天然型)、pMK2(部位特異的変異)、およびpMK3(部位特異的変異)における形成可能なmRNAの2次構造。星印は変異の位置を示している。2次構造のエネルギーはTinoco等(62)の方法に従い計算した。pMK1: -16.3Kcal/mol, pMK2: -30.8Kcal/mol, pMK3: -5 Kcal/mol。アミノ酸はAla: A、Asp: D、Pro: P、Val: V、Tyr: Yで示す。

3.3.2. 2次構造の伸長、縮小を与えた *nprM* 遺伝子の発現およびその解析

得られたプラスミド、pMK2、pMK3、および天然型のpMK1をそれぞれ *B. subtilis* MT-2株に導入した。これらの形質転換株をL培地で、37°C、24時間培養し、菌体増殖と酵素活性を測定した(図3-2)。

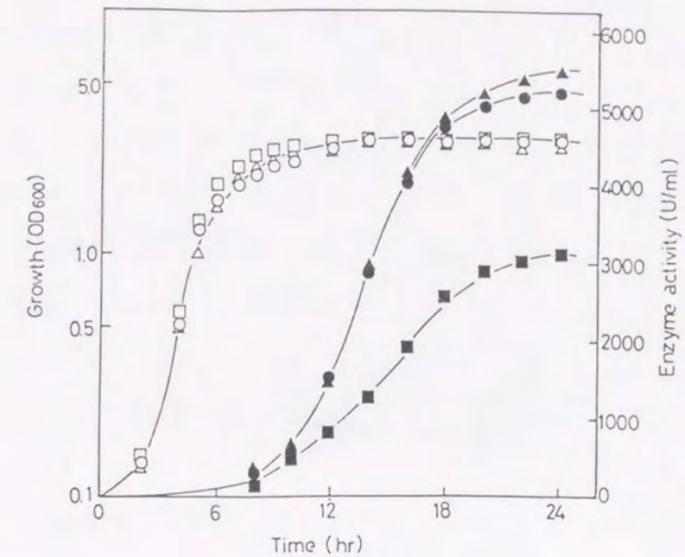


図3-2. pMK1、pMK2、およびpMK3を保持する *B. subtilis* MT-2 の菌体増殖と中性プロテアーゼ生産の経時変化。培養は5 μg/mlのカナマイシンを含むL培地、37°Cで行った。培養上清は酵素活性測定に供した(●: pMK1; ■: pMK2; ▲: pMK3)。菌体増殖は660nmの吸収で測定した(○: pMK1; □: pMK2; △: pMK3)。

その結果、それぞれ3株共、菌体増殖には違いが見られなかった。一方、酵素生産に関しては、2次構造を伸長させたpMK2を保持する株はpMK1保持株に比べ約40%生産性が低下した。逆に、2次構造を縮小させたpMK3保持株はpMK1保持株に比べ約5%活性が上昇した。この結果や、*nprM*、*nprT* 遺伝子の発現結果を考慮すると、構造遺伝子中の2次構造の伸長や縮小が、酵素発現の増減に影響を及ぼすも

のと考えられた。

次に、この構造遺伝子中の2次構造が転写レベルまたは翻訳レベルのいずれに影響を及ぼしているかを理解するため、転写されたmRNAの量をノーザンプロットにより解析した(図3-3)。

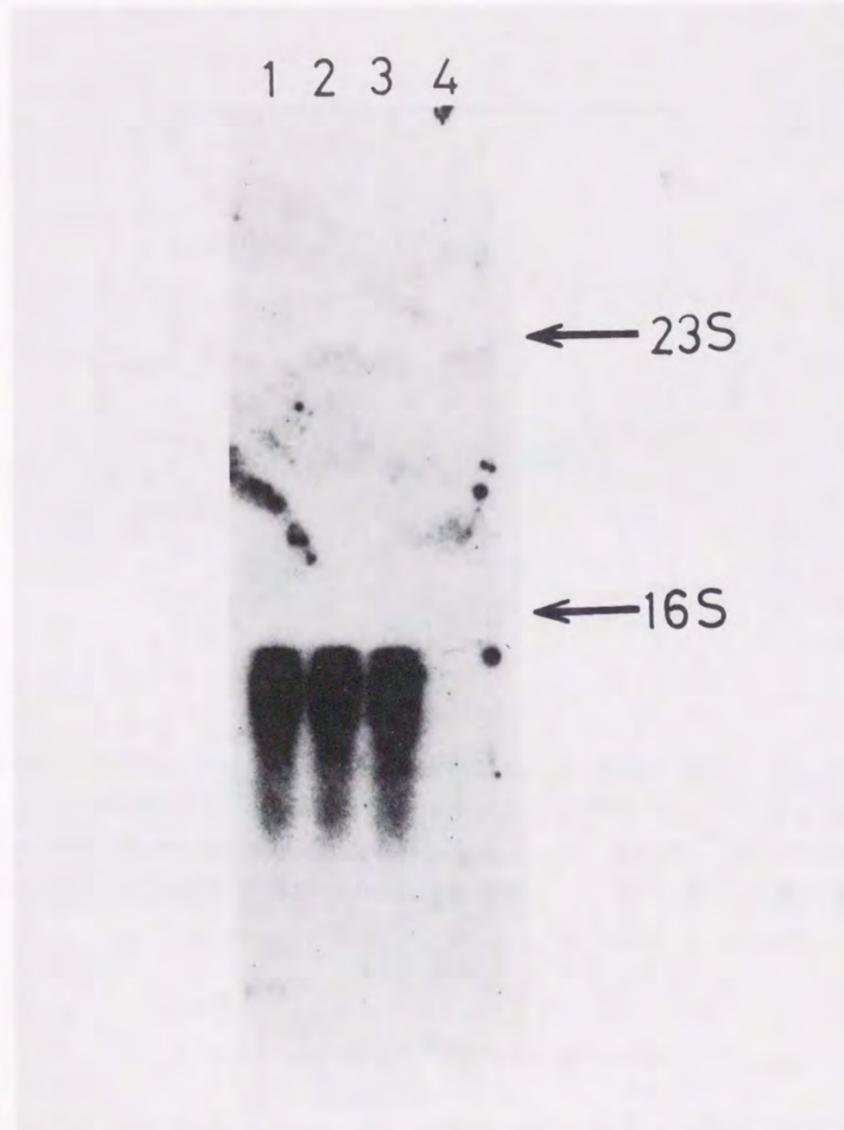


図3-3. *nprM* およびその変異遺伝子のノーザンプロット解析. *nprM* 遺伝子の *Bam* H I - *Hpa* I 断片(1,210bp) をハイブリダイゼーションプローブとして用いた. レーン1: *B. subtilis* MT-2/pMK1 から調製したRNA、2: *B. subtilis* MT-2/pMK2 から調製したRNA、3: *B. subtilis* MT-2/pMK3 から調整したRNA、4: *B. subtilis* MT-2/pTB51から調製したRNA. 16S 及び23S RNA の位置を矢印で示す.

その結果 pMK1、pMK2、および pMK3 を有するいずれの細胞から抽出した場合でも、mRNAの量とそのサイズはほとんど同じであった。つまり転写レベルにおいて、構造遺伝子中の2次構造は影響を与えていないことが明らかとなった。このように転写された mRNA 量はほぼ等しいにもかかわらず、酵素生産性にはかなりの違いが認められたことから、転写された mRNA 上で2次構造が形成され、翻訳レベルで2次構造が遺伝子発現に対し影響を与えたものと思われた。

この実験ではコドン利用が4アミノ酸において異なったが(GAU→GAC、GCU→GCA、CCA→CCU、GCG→GCA)、これらのコドン利用は *B. subtilis* においてよく利用されているもの(63)であり、コドン利用頻度による酵素生産性の低下ではないものと思われた。従って、構造遺伝子上での2次構造は翻訳レベルで影響するものと結論した。すなわち、構造遺伝子mRNA中の2次構造が増しさらに安定化されると、翻訳効率が低下すると考えられる。

3.3.3. 原核生物の遺伝子発現における遺伝子上2次構造強度の生物学的閾値

以上示してきたように、構造遺伝子内における2次構造も遺伝子発現に大きく関与していた。そこで原核生物に的を絞って、核酸上の2次構造の強度と遺伝子発現の関係について調べた。核酸上の2次構造領域として、(1)SD配列付近、(2)構造遺伝子内、(3)転写終結領域(ターミネーター)、および(4)mRNAの安定性、を取り上げた。

まず最初にSD配列付近についての整理、解析を行った。この領域においてmRNA上で2次構造が形成されると、リボソームのSD配列に対する結合能が抑制され、その結果として翻訳が阻害される(52)。これらの現象は原核生物では広く知られている。そこで報告されている各文献値をもとに、縦軸を相対活性、横軸を2次構造の強度としてプロットし、その傾向を見た(図3-4)。

その結果、mRNA上の2次構造強度が ΔG 値で $-5 \sim -6$ Kcal/molよりも強いとき、翻訳効率が著しく低下していることが明らかになった。この2次構造強度は比較的弱いものであるが、SD配列付近の2次構造はこのような弱い構造でも、微妙に遺伝子発現に対し影響を与えているものと思われた。

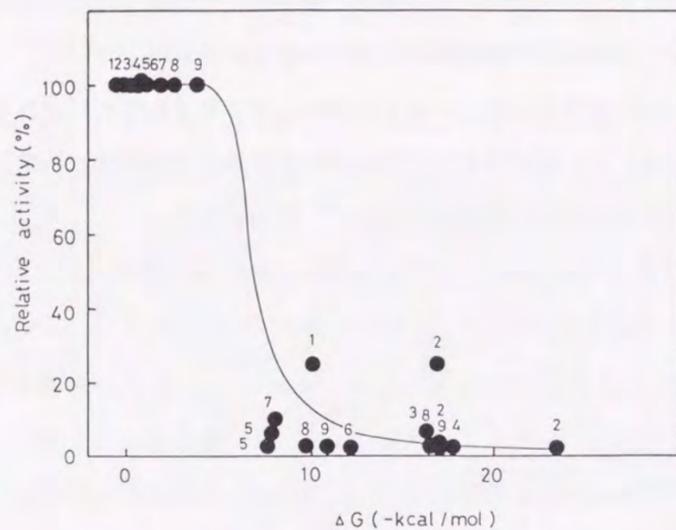


図3-4. S D配列付近におけるmRNA 2次構造の形質発現に及ぼす効果. 図中の数字1、2、3、4、5、6、7、8、および9はそれぞれ(64)、(65)、(66)、(67)、(68)、(52)、(69)、(70)、および(71)の参考文献から引用した. 相対活性は酵素活性または蛋白質発現を示す. 全ての ΔG 値はTinoco等の方法(62)に従い再計算した.

同様に構造遺伝子内の2次構造強度と遺伝子発現との関係について調べた(図3-5). この場合は構造遺伝子内に存在する2次構造の ΔG 値(最小2次構造長: 6 bp、最小2次構造エネルギー: -15 Kcal/mol、最大ループアウト: 15 bp)の総和で示した. 構造遺伝子のORF内に存在する2次構造強度が-20 Kcal/molより強化されると翻訳効率の低下が見られると推測された.

ρ 因子非依存性の転写終結は、逆方向反復塩基配列(inverted repeat sequence)を含むターミネーターの領域において生じる. この場合逆方向反復塩基配列は2次構造を形成する可能性があるため遺伝子発現に影響を与えるものと思われた. そこで転写終結領域についても同様の解析を行った(図3-6). なお完全な転写終結を100%とし縦軸に示した. その結果、2次構造の安定性が減少すると転

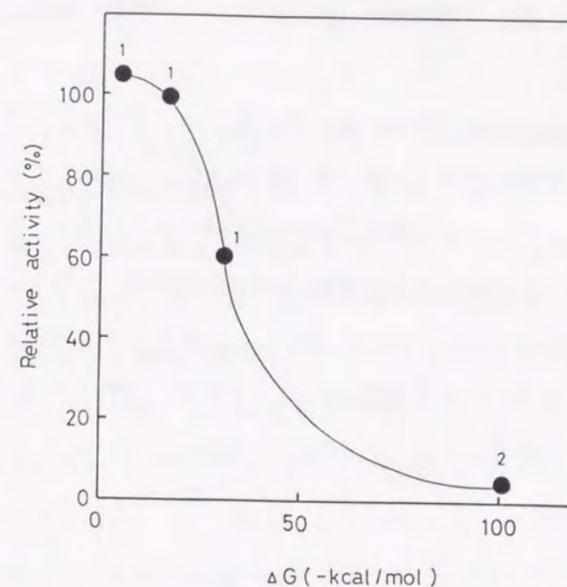


図3-5. 構造遺伝子内におけるmRNA 2次構造の形質発現に及ぼす効果. 図中の数字1および2はそれぞれ(56)および(53, 24)の参考文献から引用した. 相対活性は酵素活性または蛋白質発現を示す. 全ての ΔG 値はTinoco等の方法(62)に従い再計算した.

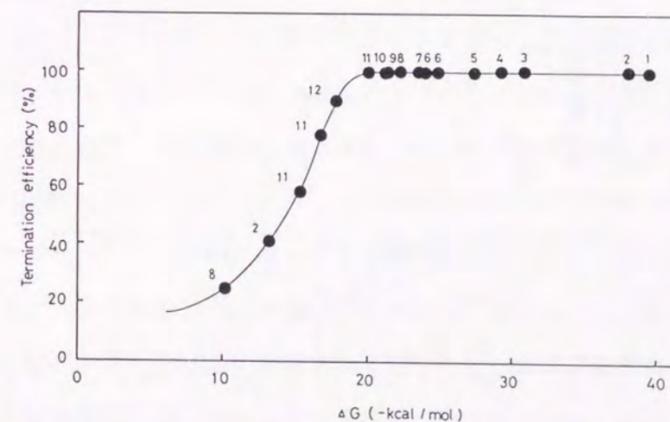


図3-6. ρ 因子非依存性転写終結領域における逆方向反復塩基配列の形質発現に及ぼす効果. 図中の数字1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および12はそれぞれ(47)、(72)、(73)、(74)、(75)、(76)、(77)、(78)、(53)、(79)、(80)、および(81)の参考文献から引用した. 全ての ΔG 値はTinoco等の方法(62)に従い再計算した.

写終結効率も低下した。この場合、自由エネルギーで約-20 Kcal/mol 付近が、
 閾値と予測された。

mRNAの安定性もまた遺伝子発現において重要な因子である。この場合、安定性
 に関し多くの因子が報告されている(82, 83, 84, 85)。特に3'末端付近の2次構
 造が、エキソヌクレアーゼの分解からmRNAを保護するということがよく研究されて
 いる。そこで3'末端付近の2次構造とmRNAの安定性について同様に調べた(図
 3-7)。なお2本鎖RNAのRNase IIIによる分解サイトを形成する2次構造は除
 外した。3'末端付近の2次構造が自由エネルギーで約-20 Kcal/mol より強い
 ときmRNAが非常に安定化されることが明らかになった。

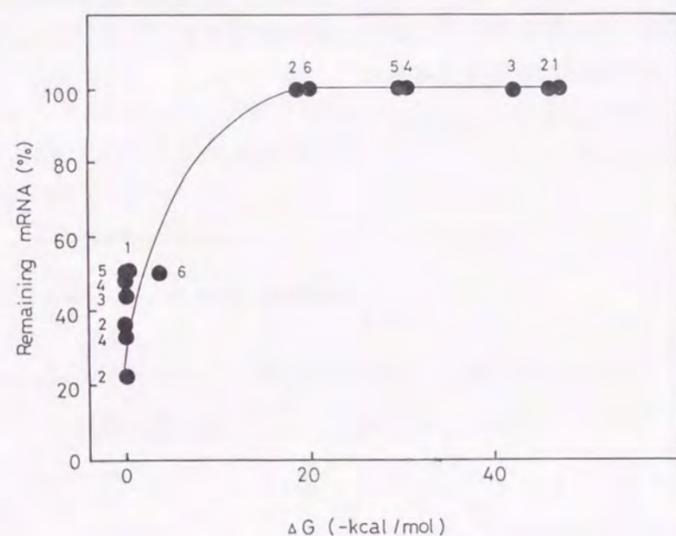


図3-7. mRNAの安定性に及ぼす2次構造の影響。図中の数字1、2、3、
 4、5および6はそれぞれ(82), (83), (74), (73), (84, 85), および(86, 87)
 の参考文献から引用した。全てのΔG値はTinoco等の方法(62)に従い再
 計算した。

第4節 考察

一般的に組換えプラスミドを用いた酵素の生産は、使用したプラスミドのコピー
 数やプロモーターの強度に大きく影響されていると考えられる。さらに、核酸上
 の2次構造により遺伝子発現が大きく影響を受けるということは興味深い。特に
 今回示したように、原核細胞(*B. subtilis*)において構造遺伝子内のmRNA 2次構
 造と遺伝子発現(翻訳)とが密接に関係しているということが実験的に明らかにな
 ったことは意義深いと思われる。この分子機構として次の2つが考えられた。

(1) mRNAが転写される時、構造遺伝子内の2次構造がターミネーターとして作
 用し、転写効率が低下する。(2) 転写されたmRNA上で安定な2次構造を形成し、
 翻訳効率が低下する。これらの疑問を解決するため、それぞれの組換えプラスミ
 ドを保持する株のmRNA転写量を測定したところ、ほとんど差が認められなかつた。
 この結果より構造遺伝子内の2次構造が翻訳効率の低下を引き起こしたものと結論
 された。

このように核酸上の2次構造は、種々の生物また遺伝子内のさまざまな領域おい
 て見られ、その強さは様々である。従って、ここでは原核生物に的を絞って、各領
 域における2次構造の強度と遺伝子発現との関係について報告されているデータ
 を整理し解析した。その結果、SD配列付近の2次構造と遺伝子発現との関係は、
 2次構造の強度として-5~-6 Kcal/mol付近を境として遺伝子発現が増減するこ
 とが明らかに認められた。同様に、構造遺伝子内、転写終結領域、およびmRNAの
 3'末端付近においても解析したところ、-20 Kcal/mol 付近で遺伝子発現が増減
 することが示された。これらの核酸上の2次構造強度は遺伝子発現における閾値
 であると思われる。(事実、*nprT* 遺伝子においては全領域にわたり安定な2次
 構造形成可能な配列があり、遺伝子発現に強く関与しているものと思われた。)
 またここでSD配列付近の閾値が-5~-6 Kcal/molと低いのは、30Sリボソーム
 亜粒子に存在する16S rRNAの3'末端とSD配列とが相互認識するためにmRNA上
 に2次構造があってはならないためであると考えられる。また真核生物におい
 ても同様の現象が観察されたが、その2次構造は原核生物に比べさらに安定であつた
 (SD配列付近においては、-20~-30 Kcal/mol が翻訳阻害には必要であつた)

(86)。これらの知見を基とし、核酸上の2次構造強度を変えることにより、遺伝子発現を調節することが可能になった。

第4節 要約

1. *nprM* 遺伝子のmRNA 2次構造を検索したところ唯一安定な2次構造形成可能領域を発見した。
2. この領域にアミノ酸配列を変えること無く、2次構造の長さを変えた部位特異的変異導入を行った。
3. 2次構造の伸長、縮小を導入したプラスミドを用い、酵素生産を行わせた。その結果、野生型に比べ、2次構造の長さを伸長させたもの、縮小させたものは、それぞれ-40%、+5%の酵素発現量の変化が認められた。なおそれぞれの株における *nprM* 転写量を調べたところ、顕著な差は認められなかった。
4. これまでに原核生物で報告されている核酸上の2次構造強度と遺伝子発現との関係について解析した。SD 配列付近においては-5~-6 Kcal/mol、構造遺伝子内、転写終結領域、および mRNA の安定性に関しては約-20 Kcal/molが生物学的閾値であることが示された。

第4章 *nprM* 遺伝子の有するプロモーター配列の解析

第1節 緒言

プロモーター配列は、遺伝子発現のために必須の領域である。異種遺伝子発現のための宿主としてしばしば利用されている *E. coli* からは数百ものプロモーターが分離され、その配列が決められてきた。特に、-35および-10領域におけるコンセンサス配列は、良く知られている(93)。これらの転写開始反応にはシグマ因子が必要で、*E. coli* の場合 σ^{70} と σ^{32} が報告されている(93)が、最近新しいシグマ因子も発見されている(94)。一方、グラム陽性菌である *B. subtilis* には9種類のシグマ因子が知られており (σ^A 、 σ^B 、 σ^C 、 σ^D 、 σ^E 、 σ^F 、 σ^G 、 σ^H 、および σ^K) (93,95)、それぞれ特異的な時期での発現に関与している(96)。*Bacillus* 属細菌および *E. coli* 由来プロモーターについて種々の解析が進んでいるが、いまだ不明の点多々ある(97,98)。

そこで *B. subtilis*、*B. stearothermophilus* の両宿主間で効率良く発現し、*E. coli* 中でも発現可能な *nprM* の有するプロモーターの解析を行い、さらにこのプロモーターを利用して *E. coli* 中で効率良く働くプロモーター配列の構築を試みた。さらにこれらの知見を基とし、*E. coli* で働く強力かつ制御可能なプロモーター配列の構築を目指した。

第2節 実験材料および方法

使用菌株、ファージ、およびプラスミド

使用した菌株、ファージ、およびプラスミドを表4-1に示した。

表4-1. 使用菌株、ファージおよびプラスミド。

菌株	特性	由来
<i>B. subtilis</i> MT-2	<i>trpC2 leuC7 hsrM hsmM NprM</i>	(54)
<i>Escherichia coli</i>	<i>recA1 Δ(lac pro) endA1 thi-1 i strA</i>	(56)
K-12 JM109	<i>gryA97 hsdR17 supE44F :traD36</i> <i>proA⁺ B⁺ lacI^q ZΔM15</i>	
<hr/>		
ファージ		由来
ファージM13 mp18		(56)
mp19		(56)
<hr/>		
プラスミド	特性	由来
pMK1	<i>Km^r nprM⁺</i>	(56)
pKK232-8	<i>Ap^r</i>	(88)
pUC19	<i>Ap^r</i>	(56)

Km^r : カナマイシン耐性、*Ap^r* : アンピシリン耐性

培地

L培地、L寒天培地、およびLC寒天培地を用いた(第1章、第2節記載)。抗生物質としてカナマイシンは5 μg/ml、アンピシリンは50 μg/mlの濃度を用いた。

形質発現の場合はM9mE培地を用いた(Na₂HPO₄・7H₂O : 12.8g, KH₂PO₄ : 3g, NaCl : 0.5g, NH₄Cl : 1g, yeast extract : 0.2%, MgCl₂ : 1mM, CaCl₂ : 0.1mM, thiamin : 2 μg/ml)。*lac*オペレーターの誘導剤としてIPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)を0.5mMの濃度で用いた。

DNA 操作

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。

プラスミドは、第2章、第2節記載の方法に従い調製し、保存した。

プラスミドpKK232-8(プロモーターを有しないクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を持つ)はPharmacia Co., Ltd. (Uppsala, Sweden)から購入した。オリゴヌクレオチドはDNA合成器(Model 380B, Applied Biosystems Co., Ltd. California, USA)を用い合成した。DNA塩基配列決定はファージM13mp18およびmp19を用いてジデオキシ法(57,58)で行った。

DNAの電気泳動および回収法

DNAの解析には、アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた(39)。アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルからのDNAの回収は、第2章、第2節に従った。

形質転換

*E. coli*の形質転換はImanaka等の方法(40)に従った。CaCl₂処理したコンピテント細胞はグリセロール(終濃度20%V/V)を加え、-80°Cで凍結保存したものを使用した。形質転換株の選択には、アンピシリン(50 μg/ml)を用いた。

*B. subtilis*のコンピテント細胞はAnagnostopoulosとSpizizenの方法(41)に従って調製した(第2章、第2節)。

CAT 活性測定法

CAT(クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ)活性はShaw(99)の方法に従った。酵素活性1単位は1分間に1nMのクロラムフェニコールをアセチル化する酵素量と定義した。

蛋白質濃度の測定

蛋白質濃度はPierce BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical Company Illinois USA)を用いて測定した。標準蛋白質として、結晶牛血清アルブミンを

用いた。

プロテアーゼ活性の測定法

カゼインを基質とし、第1章、第2節記載の方法に従い測定した。

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シーケンスキットは宝酒造(株)より購入した。(α-³²P)-CTPはAmersham Co.より購入した。他の試薬類については、第1章、第2節で述べた。

第3節 結果

4.3.1. *E. coli* 中での *nprM* 遺伝子の発現

耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子をコードする *nprM* 遺伝子は、*B. stearothermophilus* 中のみならず *B. subtilis* 中でも効率良く発現する。従って、この遺伝子は *Bacillus* 属細菌中で効率良く発現するプロモーター配列を有しているものと推測された。また最近、Pesckhe等(98)はグラム陽性菌である *B. subtilis* のあるプロモーターがグラム陰性菌である *E. coli* 中でも機能することを明らかにし、さらにグラム陰性菌由来のあるプロモーターが *Bacillus* 属細菌中で、σ^A 因子を利用して機能することが可能であることを示した。そこでまず *B. stearothermophilus* 由来 *nprM* プロモーターが *E. coli* 内で機能するか否か調べるため、*nprM* 遺伝子をpUC19 にサブクローン化し、*E. coli* 内で複製するプラスミドを得た(図4-1)。次に、*nprM* 遺伝子が *E. coli* 内で発現しているかを見るため、得られたプラスミド、pMK4、を *E. coli* JM109 に導入し、LC培地上でハローの形成を見た。その結果、pMK4を保持するJM109株は明瞭なハローを形成し、プロテアーゼを生産していることが明らかとなった(図4-2)。

この株をApを含むL培地で37°C、24時間培養したところ、培養液上清に約120 u/mlのプロテアーゼ活性が認められた。またこのプロテアーゼは耐熱性中性プロテアーゼであり、NprMであることが確認された。これらのことより、*nprM* 遺伝子は *E. coli* 内でも発現することから、*nprM* プロモーターはいずれかのシグマ因子を利用して *E. coli* 内でも機能するものと思われた。

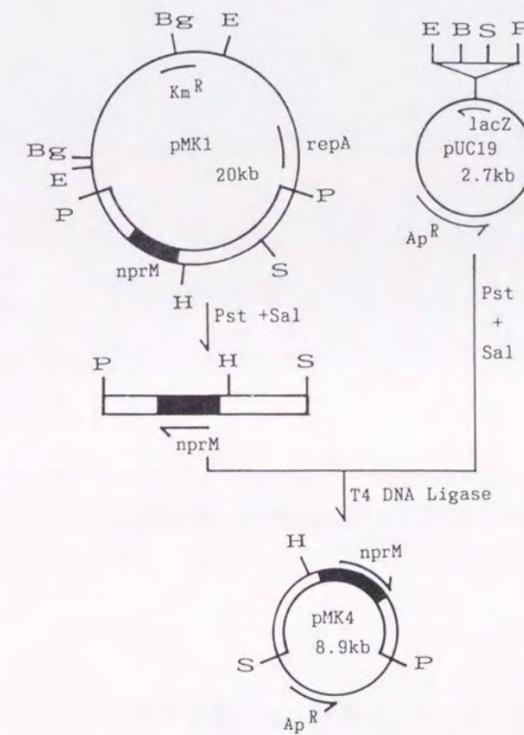


図4-1. プラスミドpMK4の構築. 白と黒の太線は *B. stearothermophilus* MK232 由来DNA を示す. *nprM* 遺伝子の位置と転写方向を矢印で示す. 制限酵素部位の *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hin* d III, *Pst* I および *Sal* I はそれぞれ B, Bg, E, H, P および S で示す. Kan, カナマイシン耐性遺伝子; Amp, アンピシリン耐性遺伝子; *repA*, プラスミドの複製開始点; *lacZ*, β-ガラクトシダーゼ遺伝子.

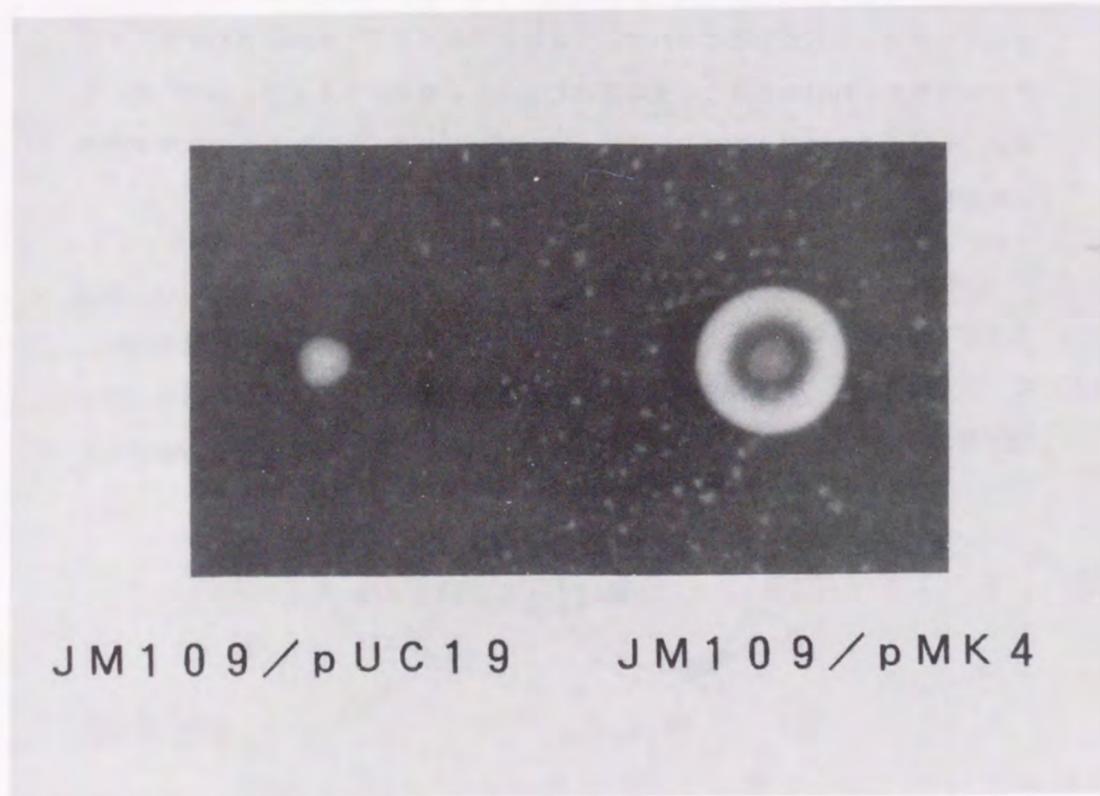


図4-2. *E. coli* JM109/pUC19 およびJM109/pMK4のL Cプレート上での培養。

4.3.2. 改変 *nprM* プロモーターの構築とその強度の比較

Bacillus 属細菌と *E. coli* 由来プロモーター配列の違いを解析するため、*nprM* プロモーターを基本として種々の改変プロモーターをデザインし、化学的に合成した(図4-3)。*nprM* プロモーターは-35領域に5'-TTTCC、-10領域に5'-TATTGTの配列を持ち、さらに-75領域付近にATに富む配列を有しているという特徴を持っている(図4-3)。これは *Bacillus* 属細菌由来の *nprT* (24)、*sdh* (100)、および *spo0A* (101)の-75領域付近で見られる特徴と同様であった。これら-75領域付近のATに富む配列は *Bacillus* 属細菌におい

て、ある活性化因子によって認識される共通の領域かもしれないと考えられる。

No.	5'	AT box	-35 region	-10 region	3'
<i>nprM</i>		GGAAAATGTGAAAAA	CCGTAGGGAATTATCAACTATATCAGACTCTATTTTCC	CAATACAAACTGTAAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-1			TCGACTATATCAGACTCTATTTTCC	CAATACAAACTGTAAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-2			TCGACTATATCAGACTCTATTTTCC	CAATACAAACGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-3			TCGACTATATCAGACTCTATTTGACA	CAATACAAACTGTAAATTTAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-4		TCGACAAAAAA	-----CTATTTTCC	CAATACAAACGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-5		TCGACAAAAAA	-----CTATTTGCT	CAATACAAACGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-6		TCGACAAAAAA	-----CTATTTGACA	CAATACAAACGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-7		TCGACAAAA	-----TCTATTTGACA	CAATACAAACGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-8	TCGAC	AAAATGTGAAAAA	-----TTGACA	TCAGGAAAATTTTCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
09-9	TCGAC	AAAATGTGAAAAA	-----TTGCTT	TCAGGAAAATTTTCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	
<i>lac</i>			TCGACAAA	TGAGCTGTTGACATTAATCATCGGCTGTATAATTTGTTAATTTCTAAATACAAAGAATAAGGAGGAGGATGAAAAATGAAAAGGA	

図4-3. *nprM* プロモーターおよびその誘導体の塩基配列。ATに富む領域(AT box)、-35領域および-10領域は四角形で囲っている。欠失させた塩基配列は点線で示す。*lac* オペレーターは下線で示す。

No. 09-1 は野生型である *nprM* プロモーターの-75領域に存在するAT box を欠失したものである。No. 09-2 はNo. 09-1 の-35領域と *lac* 遺伝子の-10領域とオペレーターを結合させたものである。No. 09-1 の-35領域と-10領域を *E. coli* のコンセンサス配列に変えたものをNo. 09-3 とした。No. 09-4 からNo. 09-7 は、*nprM* プロモーターのATbox を-43領域に付加したものであり、No. 09-4, 09-5, 09-6, および09-7の-35領域はそれぞれ *nprM* プロモーター、T5プロモーター(98)、*E. coli* のコンセンサス配列、および *E. coli* のコンセンサス配列に置換したもの

である。No. 09-8 と09-9は *nprM* プロモーターのATbox を-43領域に付加し、スペーサーとしてT5プロモーターのもの(TCAGGAAAATTTTCTG)、さらにその下流に *lac* オペレーターを結合させたものである。また-35領域はそれぞれ *E. coli* のコンセンサス配列とT5プロモーターのもの(TTGCTT)を用いた。プロモーター活性は、CAT 活性を指標として次のように測定した。プロモーター検索プラスミド(pKK232-8)は *CAT* 遺伝子上流のプロモーター配列を欠くため、外部よりプロモーター活性を有する断片を組み込むことにより *CAT* 遺伝子を発現することができる。そこで図4-3に示す、合成DNA をpKK232-8の *SaI* I と *Hind* III 部位にクローン化した。得られたプラスミドをそれぞれpKK09-1 ~ pKK09-9 およびpKKtacとした。これらのプロモーターを有するプラスミドの特性を図4-4にまとめた。そしてこれらの各プラスミドを *E. coli* JM109 に導入し、さらにM9mE培地を用いて37°C、4時間培養し、IPTGで誘導後さらに2時間培養しCAT 活性を測定した(図4-4)。

Plasmid	Number of A		Spacer length	AT content		Activity (100 u/ml prot.)
	at -43 region	-35 region		of spacer (%)	-10 region	
pKK09-1	0	TTTTCC	18	7.8	TATTGT	9 (3%)
pKK09-2	0	TTTTCC	16	5.0	TATAAT	1.1 (4%)
pKK09-3	0	TTGACA	18	8.3	TATAAT	5.4 (21%)
pKK09-4	7	TTTTCC	16	5.0	TATAAT	3.7 (14%)
pKK09-5	7	TTGCTT	16	5.0	TATAAT	5.0 (19%)
pKK09-6	7	TTGACA	16	5.0	TATAAT	26.9 (103%)
pKK09-7	4	TTGACA	16	5.0	TATAAT	17.9 (68%)
pKK09-8	4+7	TTGACA	17	7.1	TATAAT	20.1 (77%)
pKK09-9	4+7	TTGCTT	17	7.1	TATAAT	27.4 (105%)
pKKtac	3	TTGACA	16	5.6	TATAAT	26.2 (100%)

図4-4. *nprM* プロモーターおよびその誘導体の解析。

その結果、pKK09-1 とpKK09-2 は低いプロモーター活性を示し、pKK09-3, pKK09-4, およびpKK09-5 は中程度のプロモーター活性を示した。これに対しpKK09-6,

pKK09-7, pKK09-8, およびpKK09-9 は高いプロモーター活性を示した。この高プロモーター活性は *E. coli* 内で強力と言われている *tac* プロモーターとほぼ同程度のプロモーター活性であった(102)。pKK09-2 のプロモーター活性は、pKK09-1 と比べると際立った活性上昇は認められなかった。一方、pKK09-1 において、-35と-10領域の両方に、*E. coli* のコンセンサス配列を用いると(pKK09-3)、数倍の活性上昇が確認された。

これらの結果から、*E. coli* のコンセンサス配列において-35領域のほうが、-10領域よりもプロモーター活性により強い影響を与えることが示唆された。*nprM* プロモーターのAT boxを-75領域から-43領域に置き換えたときも、CAT 活性の上昇が認められた(pKK09-2 とpKK09-4 の場合)。また-43領域の連続A配列を減少させたpKK09-7 はpKK09-8 に比べ約70%のプロモーター活性であった。連続A配列をさらに延長させたpKK09-8 とpKK09-9 ではさほどプロモーター活性の上昇が認められなかった。これらの結果から、*E. coli* において-43領域のAT boxはプロモーター活性を増強する因子であると思われた。逆に-75領域におけるAT boxは、*Bacillus* 属細菌のプロモーター活性に何らかの影響を与えているのかもしれないことが予測される。

4.3.3. 改変 *A3* プロモーターの構築とその強度の比較

一連の *nprM* プロモーターの改良において得られた知見を基とし、*E. coli* 内でさらに強力かつ制御可能なプロモーター配列の構築を目指し、T3ファージ由来 *A3* プロモーター(103)を用い、種々の改良を行った。この *A3* プロモーターは、-43領域にAT box を有し、-35と-10領域はそれぞれ5'-TTGACA (*E. coli* のコンセンサス配列)と5'-TACGATという配列を有しており、*E. coli* 内で機能するプロモーターとしては理想的なものの一つと思われた。

図4-5に *A3* プロモーターを基本とした、一連の改良型プロモーターを示した。No.10-1 は野生型の *A3* プロモーターである。No.10-2 は-10領域下流に *lac* オペレーターを組み込んだものである。No.10-3 はNo.10-2 の-10領域を *E. coli* のコンセンサス配列に変えたものである。No.10-4 は-10領域下流に *lac* オペレーターの最小機能領域を組み込んだものである。No.10-2 と10-4のAT

boxを取り除いたものをそれぞれNo. 10-5 および10-6とした。

次に、これらの合成 DNAをpKK232-8にクローン化し、得られたプラスミドをそれぞれpKK10-1, pKK10-2, pKK10-3, pKK10-4, pKK10-5, およびpKK10-6 と命名した。

これらのプラスミドが保持するプロモーターの特性を図4-6にまとめた。これらの各プラスミドを*E. coli* JM109に導入し、先程と同様の方法でCAT 活性を調べた(図4-6)。

No.	5'	AT box	-35 region	-10 region	3'
10-1	TCGAC	TTAAACAA	AGTGGTTGACA	ACATGAAGTAAGCACGGTACGAT	GTACCACA
10-2	TCGAC	TTAAACAA	AGTGGTTGACA	ACATGAAGTAAGCACGGTACGAT	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACA
10-3	TCGAC	TTAAACAA	AGTGGTTGACA	ACATGAAGTAAGGCTCGTATAAT	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACA
10-4	TCGAC	TTAAACAA	AGTGGTTGACA	ACATGAAGTAAGCACGGTACGAT	GAATTGTGAGCGGATAACAATTCACA
10-5	TCGAC	-----	TTGACA	ACATGAAGTAAGCACGGTACGAT	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACA
10-6	TCGAC	-----	TTGACA	ACATGAAGTAAGCACGGTACGAT	GAATTGTGAGCGGATAACAATTCACA
<i>lac</i>	TCGAC	AAATGAGCTG	TTGACA	ATTAATCATCGGCTCGTATAAT	GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACA

図4-5. *A3* プロモーターおよびその誘導体の塩基配列。ATに富んだ領域(AT box)、-35領域および-10領域は四角形で囲っている。欠失させた塩基配列は点線で示す。*lac* オペレーターは下線で示す。

Plasmid	Number of A		Spacer length	AT content		Activity (100 u/ml prot.)	
	at -43 region	-35 region		of spacer (%)	-10 region	IPTG (-)	IPTG (+)
pKK10-1	3+3	TTGACA	17	53	TACGAT	470 (179%)	475 (181%)
pKK10-2	3+3	TTGACA	17	53	TACGAT	93 (35%)	900 (344%)
pKK10-3	3+3	TTGACA	17	53	TATAAT	33 (13%)	485 (185%)
pKK10-4	3+3	TTGACA	17	53	TACGAT	28 (11%)	410 (156%)
pKK10-5	0	TTGACA	17	53	TACGAT	37 (14%)	310 (118%)
pKK10-6	0	TTGACA	17	53	TACGAT	22 (8%)	240 (92%)
pKKtac	3	TTGACA	16	56	TATAAT	44 (17%)	262 (100%)

図4-6. *A3* プロモーターおよびその誘導体の特性。

pKK10-1 は予想どおり、IPTG 添加、無添加にかかわらず、強力なプロモーター活性を示し、pKKtacより約2倍高い活性であった。一方、pKK10-2, pKK10-3, およびpKK10-4 は IPTG 存在下において、pKKtacより、約3.5 から1.5 倍高い活性を示した。-43領域にAT boxを欠いたpKK10-5 とpKK10-6 は、AT box を有するpKK10-2 とpKK10-4 に比べ、顕著な活性の低下が認められた。これらの結果、-43領域にAT boxをもち、*A3* プロモーターの下流に*lac* オペレーターを接続したpKK10-2 がIPTG存在下で最も効率良く形質発現することが示された。

第4節 考察

好熱菌由来 *nprM* プロモーターは中温菌の *B. subtilis* 中でも効率良く発現し、またグラム陰性菌である *E. coli* 内でも機能することが確認できた。この *nprM* プロモーターを化学合成し、CAT 活性を指標としてプロモーターの強度を測定したところ、かなり低いプロモーター活性であった。これは種や属が異なることによるため低プロモーター活性であったものと思われた。次にこの *nprM* プロモーターを基本とし、種々の改良型プロモーターを設計し、発現を見たところ、*E. coli* 内で働くプロモーターの中で強力といわれている *tac* プロモーターとはほぼ同程度の強いプロモーターを構築することができた。これら一連の改良において、-35領域の *E. coli* コンセンサス配列(TTGACA)がプロモーター活性と特に深く関連していることが示された。また-43領域にAT box を付加することにより、さらにプロモーター活性を増強することが可能であった。*nprM* プロモーターにおいて-75領域に連続A配列が見出されたが、この配列は *E. coli* 中での-43領域と同様、*Bacillus* 属細菌由来プロモーターの強化に重要な役割を果たす領域かもしれない。

次に、*E. coli* 内で機能する強力かつ制御可能なプロモーターの構築を行った。基本となるプロモーターとしてT3ファージ由来 *A3* プロモーターを用いたところ、従来 *E. coli* 内で機能する強いプロモーターとして知られていた *tac* プロモ

ーターよりもかなり強力なプロモーターを構築することができた。さらに *lac* オペレーターを-10領域下流に連結することにより、IPTGにより誘導可能なプロモーターを構築することができた。これら一連の改良において *lac* オペレーターを連結することにより、プロモーター活性の低下は見られなかった。

ここで構築したプロモーターを利用し、*E. coli* 内で異種遺伝子を発現させることにより、従来の *tac* プロモーターを用いた発現よりもかなりの高発現が期待できる。また *Bacillus* 属細菌のプロモーターにおいて、-75領域等で改良を加えることにより *Bacillus* 属細菌中で機能する強力なプロモーターを構築できるものと考えられる。

第5節 要約

1. 好熱菌由来 *nprM* プロモーターはグラム陰性菌である *E. coli* 内でも機能した。
2. *nprM* プロモーターを基本として種々の改良型プロモーターを設計し、大腸菌中で発現させたところ、-35領域を *E. coli* のコンセンサス配列に変えることにより活性の増強が見られた。また-43領域に *nprM* プロモーター由来 AT box を付加することによりさらに活性増強が可能であった。
3. T3ファージ由来 *A3* プロモーターを基本とし、強力かつ制御可能なプロモーター配列を設計し発現させたところ *tac* プロモーターよりも約3倍強い活性を有するプロモーターを構築することができた。

第5章 蛋白質工学による NprM の 改変

第1節 緒言

従来から酵素の活性を上昇させるため、化学修飾等の手法を用いた試みが数多く行われてきた。しかしながらこれらの手法は、酵素の機能解析などには適しているが、実際の応用においてはその収率の低さや、多くの操作が必要なことからほとんど利用されていないのが実情である。

蛋白質工学的手法の確立により、クローン化された酵素遺伝子を用いて容易に塩基置換ができ、任意のアミノ酸を変換、導入することが可能となった。それに伴い、従来では解析不可能であった各アミノ酸残基の役割など基礎的研究が進展するだけでなく、応用面においても、酵素の安定性、比活性の上昇、さらには至適pHの移行等、人工設計に基く酵素の改良が行われるようになってきた(20, 104, 105)。

本研究において、APM合成用にスクリーニングしたNprMは、サーモライシンと非常によく似た配列を有していた(Asp37→Asn およびGlu119→Gln)が、比活性、耐熱性において違いが認められた(第1章)。このようにわずか2アミノ酸置換の影響によって、酵素の性質が変化したことは、重要な位置にあるアミノ酸を1個ないし数個置換させることで十分、酵素機能の改変、改質が可能であることを示唆している。第2章に記載したように、*nprM* 遺伝子のクローン化および塩基配列決定は終了しており、またNprMの立体構造も判明していることから、この酵素においても蛋白質工学的手法を用い酵素機能を改変し、より有用な酵素を創製することが可能となった。そこでNprMの立体構造からアミノ酸置換部位を選定し、酵素蛋白質の安定性向上、比活性の上昇等を付与するなど、その改質を試みた。

第2節 実験材料および方法

使用菌株、ファージ、およびプラスミド

使用した菌株、ファージ、およびプラスミドを表5-1に示した。

表5-1. 使用菌株、ファージおよびプラスミド.

菌株	特性	由来
<i>B. subtilis</i> MT-2	<i>trpC2 leuC7 hsrM hsmM Npr</i>	(54)
<i>Escherichia coli</i>		
K-12 JM109	<i>recA1 Δ(lac pro) endA1 thi-1 i strA</i> <i>gryA97 hsdR17 supE44 F :traD36</i> <i>proA⁺ B⁺ lacI^q ZΔM15</i>	(53)
ファージ	特性	由来
ファージM13 mp18		(56)
mp19		(56)
プラスミド	特性	由来
pMK1	Km ^r <i>nprM⁺</i>	(56)
pMK4	Ap ^r <i>nprM⁺</i>	(56)
pUC19	Ap ^r	(56)

Km^r : カナマイシン耐性、Ap^r : アンピシリン耐性

培地

L培地、L寒天培地、およびLC寒天培地を用いた(第1章、第2節記載)。抗生物質としてカナマイシンは5 μg/ml、アンピシリンは50 μg/mlの濃度を用いた。

菌体外プロテアーゼの精製

各変異型酵素の培養上清は硫酸アンモニウム(60%飽和)による塩析後、10mlの緩衝液(50 mM トリス塩酸、5 mM CaCl₂ pH7.5)に溶解し、Butyl-Toyopearl 650M(疎水クロマト)およびHPLC TSK gel G-2000swを用い完全に単一ピークになるまで精製した。精製の溶離液はButyl-Toyopearl 650Mの場合は、20mM トリス塩酸、10mM CaCl₂、5%飽和硫酸アモニウム pH7.5を用い、TSK gel G-2000swの場合は、50 mM トリス塩酸、5 mM CaCl₂ pH7.5を用いた。天然型の精製例を図5-1に示す。

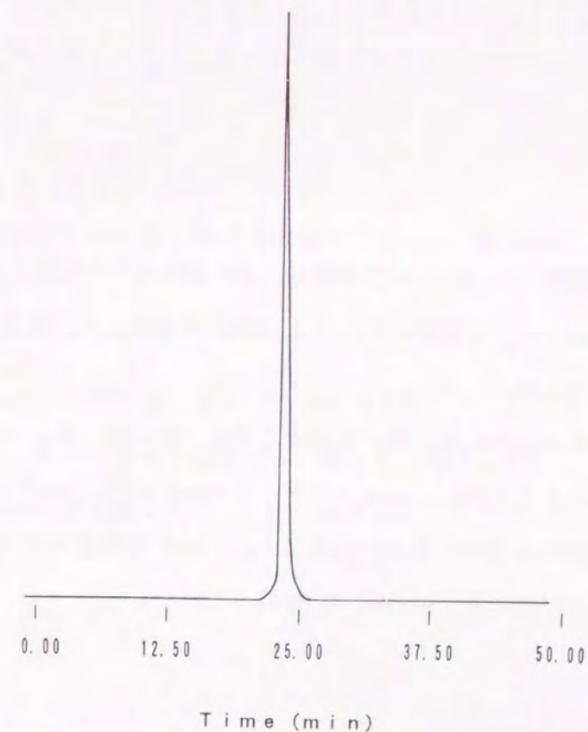


図5-1. 野生型 *NprM* の精製品の HPLC による分析. 分析カラムに SK-gel G-2000sw(ゲル濾過クロマトグラフィー、東ソー社製)を用いた。

N末端アミノ酸配列の決定には、自己消化を防ぐため、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。遠心分離(15,000×g、30分)で沈殿を回収後、0.8 mlの蟻酸に溶解した。透析による脱塩後、TSK gel DEAE 5PW(イオン交換クロマトグラフィー)にかけピークを回収した。溶離液は、A液: 50 mM トリス塩酸、5 mM CaCl₂ pH7.5、B液: 50 mM トリス塩酸、5 mM CaCl₂ 0.5M NaCl pH7.5、A→B 60分リニアグラジエントで行った。得られた精製試料を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りプロテアーゼN末端のアミノ酸配列を決定した。分析にはアプライド・バイオシステム社製モデル470A気相式アミノ酸シーケンサーを使用した。フェニルチオヒダントイン誘導体となったアミノ酸をHPLCにより解析した。

DNA 操作

DNA は、TE緩衝液(10 mM トリス塩酸塩、0.1 mM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。

プラスミドの大量調製は第2章、第2節記載の方法に従った。

オリゴヌクレオチドはDNAシンセサイザー(Model 380B, Applied Biosystems Co., Ltd. California, USA)を用い合成した。DNA塩基配列はファージM13mp18およびmp19を用いジデオキシ法(57,58)で行った。

DNAの電気泳動および回収法

DNAの解析には、アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った(59)。アガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲルからのDNAの回収は第2章、第2節記載の方法に従った。

部位特異的変異導入法

nprM 遺伝子を有するpMK1のHind III-Sph I断片をファージM13mp18にサブクローニングし一本鎖DNAを調製した。その後、Amersham oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system (Amersham Corp., Amersham, England)を用い変異を導入した。

形質転換

*E. coli*の形質転換はImanaka等の方法(40)に従った。CaCl₂処理したコンピテント細胞はグリセロール(終濃度20%V/V)を加え、-80℃で凍結保存したものを使用した。形質転換株の選択には、アンピシリン(50 μg/ml)含有寒天培地を用いた。

*B. subtilis*のコンピテント細胞はAnagnostopoulosとSpizizenの方法(41)に従って調製した(第2章、第2節)。

プロテアーゼ活性の測定法

カゼインを基質とし第1章、第2節記載の方法に従い測定した。

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シーケンスキットは宝酒造(株)より購入した。(α-³²P)-CTPはアマーシャムより購入した。他の試薬類については、第1章、第2節で述べた。

第3節 結果

5.3.1. 変異導入プラスミドの構築

蛋白質工学を利用して変異を導入する際、*E. coli*中では多コピー数のプラスミドが構築されており利用しやすいが、本実験で用いた *Bacillus* 属細菌用の発現系

は低コピー数のベクターであることから(56)、安定で効率良く発現するが、*E. coli* プラスミドに比べ分子量も相当大きく変異導入に直接使用するのは不向きである。そこで *E. coli* の常用ベクターである pUC19 と組み合わせることにより効率良く、しかもバックグラウンドが出現することを極力抑さえた変異を導入する系を構築した(図5-2)。

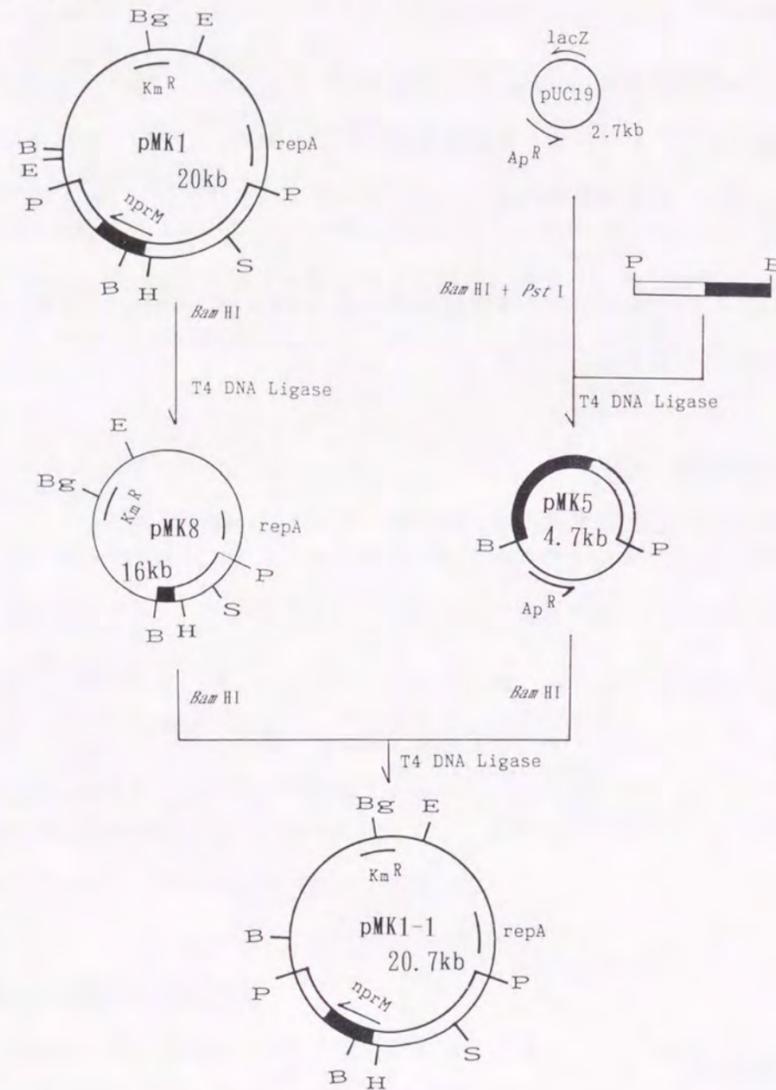


図5-2. プラスミドpMK8, pMK5, およびpMK1-1の構築. 白と黒の太線は *B. stearothermophilus* MK232 由来DNAを示す. *nprM* 遺伝子の位置と転写方向を矢印で示す. 制限酵素部位の *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I および *Sal* I はそれぞれB, Bg, E, H, PおよびSで示す. Kan, カナマイシン耐性遺伝子; Amp, アンピシリン耐性遺伝子; *repA*, プラスミドの複製開始点; *lacZ*, β -ガラクトシダーゼ遺伝子.

変異の導入は、pMK1から変異を導入する断片を抽出し、M13ファージにクローニング後、目的の変異を導入した。変異の導入された断片はM13のRFから抽出し、pMK5と断片交換した後、図5-2に示した方法に従いpMK5をpMK8にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド(pMK1-1)を用いて *B. subtilis* を形質転換し、LC寒天培地上でのハロー形成の有無によりプロテアーゼ生産能を判定した。

5.3.2. 活性中心におけるアミノ酸置換を導入したNprMの創製

サーモライシンは第2章で述べたように、その立体構造や、活性中心などが詳細に解析されている(33, 34, 35)。活性中心を構成するのは、亜鉛を中心としGlu143とHis231であり、この電子リレーがペプチド結合切断に利用されると考えられている(図5-3)。

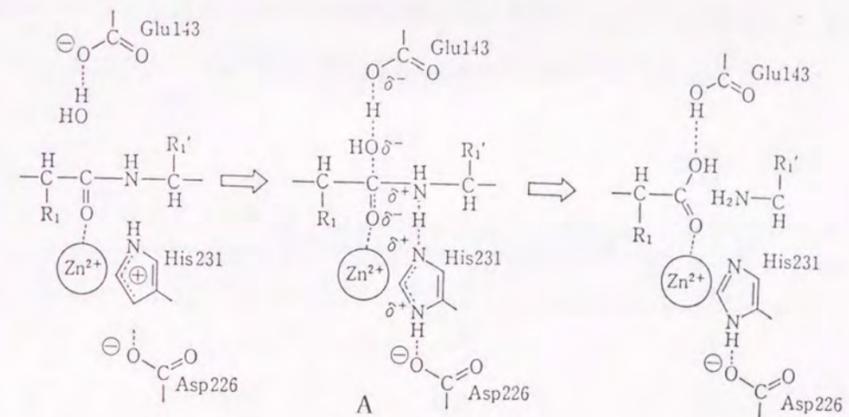


図5-3. サーモライシンの切断過程モデル. Aはアシル中間体を示す.

予想されている活性中心部分を直接変化させることにより、この領域が活性中心であるかどうかを調べることにした。そこでNprMの場合にも活性中心の一つであると予想されるGlu143の部位を、側鎖の長さを変えたAsp およびアミノ基を付加したGlnに置換した。合成DNAとして5'-TCGCTCATGATTTAACGCATGC (E143Q用) および5'-TCGCTCATCAGTTAACGCA

TGC (E143D 用) (共に下線で示した塩基が置換する塩基) を作成し変異の導入を行った。作成した変異型プラスミド pMK1 (E143Q) および pMK1 (E143D) を *B. subtilis* MT-2株に導入しハローの有無を見た。その結果、2種の変異を導入した変異体は全くハローを形成しなかった。このことから143のグルタミン酸は活性に必須のアミノ酸残基であり、このアミノ酸をアスパラギン酸とグルタミンに置換することによりプロテアーゼ活性が完全に消失したものと思われた。

5.3.3. サブサイトにおけるアミノ酸置換を付与したNprMの創製

サーモライシンはMatthews等によりX線解析が行われ、その立体構造が明らかにされると共に、基質の結合部位、活性中心等が決定されている(106, 111)。そこでこれらの情報をNprMに適応し、基質結合部位(サブサイト)のアミノ酸置換を導入することにより基質との親和性を上昇させ、プロテアーゼ活性を上昇させることを計画した。表5-2にサブサイトの位置を示す。なおプロテアーゼ活性部位のサブサイトと基質のアミノ酸残基の命名を示す模式図を図5-4に示す。

表5-2. NprMにおけるサブサイトの位置。

位置	アミノ酸	サブサイト
114	Phe	S 1
115	Trp	S 2
130	Phe	S 1' S 2'
133	Leu	S 1'
139	Val	S 1'
188	Ile	S 1'
189	Gly	S 1'
192	Val	S 1'
202	Leu	S 1' S 2'

これらの情報から、基質とより密接に相互作用していると思われるF114およびW115について各種変異の導入を試みた。変異を導入するアミノ酸として、疎水性アミノ酸であるアラニン(A)、電荷のない親水性アミノ酸であるグルタミン(Q)、正電荷を有するアミノ酸であるリジン(K)、負電荷を有するアミノ酸であるグルタミン酸(E)を各アミノ酸群の代表とした。

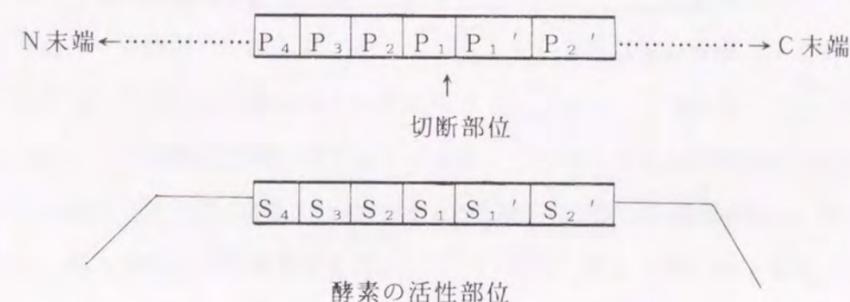


図5-4. プロテアーゼの活性部位のサブサイトと基質のアミノ酸残基の命名を示す模式図。矢印は切断(水解)される基質のペプチド結合(被切断結合)を示す。

合成DNAとして5'-AATAACGCAGCTTGGAAACGGT (F114A用)、5'-AATAACGCACAATGGAAACGGT (F114Q用)、5'-AATAACGCAAAATGGAAACGGT (F114K用)、5'-AATAACGCAGAAATGGAAACGGT (F114E用)、5'-AACGCATTTGCGAACGGTTTCG (W115A用)、5'-AACGCATTTCCAGAACGGTTTCG (W115Q用)、5'-AACGCATTTAAGAACGGTTTCG (W115K用)、および5'-AACGCATTTGAGAACGGTTTCG (W115E用) (共に下線で示した塩基が置換する塩基) を作成し変異の導入を行った。作成し

た変異型プラスミドpMK1 (F114A)、pMK1 (F114Q)、pMK1 (F114K)、pMK1(F114E)、pMK1 (W115A)、pMK1 (W115Q)、pMK1 (W115K)およびpMK1 (W115E)を*B. subtilis* MT-2株に導入し培養した後、変異型酵素を取得した。表5-3にカゼインを基質としたときの比活性を示した。

表5-3. サブサイトにアミノ酸置換を導入した時の各酵素の比活性.

酵素	比活性 u/mg protein
NprM (天然型)	27,000 (100%)
F114A	36,500 (135%)
F114Q	27,000 (100%)
F114K	27,000 (100%)
F114E	N D
W115A	N D
W115Q	N D
W115K	N D
W115E	N D

N D : 形質転換株においてハローを形成しなかったもの.

S2サイトであるW115における4種のアミノ酸置換においては、ハローを形成する形質転換株は得られなかった。従って、このサイトはプロテアーゼ活性に重要な役割を果たしているものと推測された。一方、S1サイトであるF114においては、F114E以外の3種のアミノ酸置換でハローを形成する形質転換株が得られた。特に、アラニンに置換したF114Aは天然型に比べ約35%の比活性上昇が認められた。

5.3.4. ドメイン間における自由度の増減を付与したNprMの創製

NprMは2つのドメインから成り(図2-9)、そのドメイン間のクレフトに活性

中心や基質の結合部位が存在する(33, 34, 35, 106, 107, 108)。またこのドメイン間は α -ヘリックスで連結されており、その中には-Gly135-Gly136-がある(図2-9)。そこでこの領域の近傍にさらに側鎖の短いグリシンを導入し、両ドメイン間の自由度を増大させること、またグリシンを他のアミノ酸に置換することによりドメイン間の自由度を減少させることを計画した。

具体的には、両ドメイン間にはイソロイシンが137番目に存在し、この残基を側鎖の短いグリシンに置換することによる自由度の増加、また136番目のグリシンをセリンに換えること(中温菌のプロテアーゼの場合Ser136であることも考慮)による自由度の減少を試みた。

合成DNAとして5'-TTCTGGTGGTGGGGATGTGGTTCG (I137G用)および5'-ACTTTCTGGTTCGATTGATGTGG (G136S用)(共に下線で示した塩基が置換する塩基)を作成し変異の導入を行った。作成した変異型プラスミドpMK1 (I137G)およびpMK1 (G136S)を*B. subtilis* MT-2株に導入し培養した後、変異型酵素を取得した。表5-4にカゼインを基質としたときの比活性を示した。

表5-4. ドメイン間の自由度を変化させた時の各酵素の比活性.

酵素	比活性 u/mg protein
NprM (天然型)	27,000 (100%)
I137G	19,000 (70%)
G136S	16,500 (60%)

このようにいずれの変異導入の場合もかなり比活性の低下が認められた。両ドメイン間のゆらぎの増減の導入を試みたが、酵素活性増強には直接結びつかなかった。

5.3.5. チロシンをトリプトファンに置換したNprMの創製

Blumberg とVallee(109) はN-hydroxysuccimide esterを用いてサーモライシンを化学修飾すると、Fur-Gly-Leu-NH₂ を基質にした場合、約70倍も活性増強がなされることを報告している。この化学修飾はチロシンの水酸基にN-hydroxysuccimide ester が付加されたもので、チロシンの側鎖が増大したことによる効果が考えられた。そこで蛋白質工学的にこの化学修飾を再現させることを計画した。置換するアミノ酸はチロシンより側鎖の大きい唯一のアミノ酸であるトリプトファンとし、また溶液中で化学修飾をうけることから置換するチロシン残基は活性中心付近で、しかも側鎖が表面に現れているものを NprM の立体構造を参考にし選択した。

その結果、図5-5に示すアミノ酸残基が表面に出ており、また比較的活性中心に近いため、それらのアミノ酸残基をトリプトファンに置換した。

合成DNA としてY110W (5'-GCCAAGGCTGGAATAACGCA-3')、Y151W (5'-TAACCGATTGGACAGCCGGA-3')、Y157W (5'-GACTCATTTGGCAAAACGAA-3')、Y193W (5'-AGGATGTGTGGACACCTGGT-3')、Y211W (5'-CGGAAAGTGGGGTGATCCA-3')、Y217W (5'-CAGATCACTGGTCAAAGCGC-3')、及びY221W (5'-CAAAGCGCTGGACAGGCACG-3') を作製した。()は変異導入のための合成DNA を示し、下線部分が置換するアミノ酸に対応する。

作成した変異型プラスミドpMK1 (Y110W)、pMK1 (Y151W)、pMK1 (Y157W)、pMK1 (Y193W)、pMK1 (Y211W)、pMK1 (Y217W)、及びpMK1 (Y221W)を *B. subtilis* MT-2株に導入し培養した後、変異型酵素を取得した。表5-5にカゼインを基質としたときの比活性を示した。

このように110番目及び211番目のチロシンをトリプトファンに置換することにより明らかにカゼインに対する比活性が向上した(それぞれ60%と50%)。逆にY151Wの場合、ハロー形成株は得られなかった。

次に重複のアミノ酸置換による効果を見るため、Y110W を中心にしY211W とY221W の複数個の置換を導入した。作成した変異型プラスミドpMK1 (Y110W, Y211W)、pMK1 (Y110W, Y221W)、pMK1 (Y211W, Y221W)、及びpMK1 (Y110W, Y211W, Y221W)を *B.*

subtilis MT-2株に導入し培養した後、変異型酵素を取得した。表5-6にカゼインを基質としたときの比活性を示した。

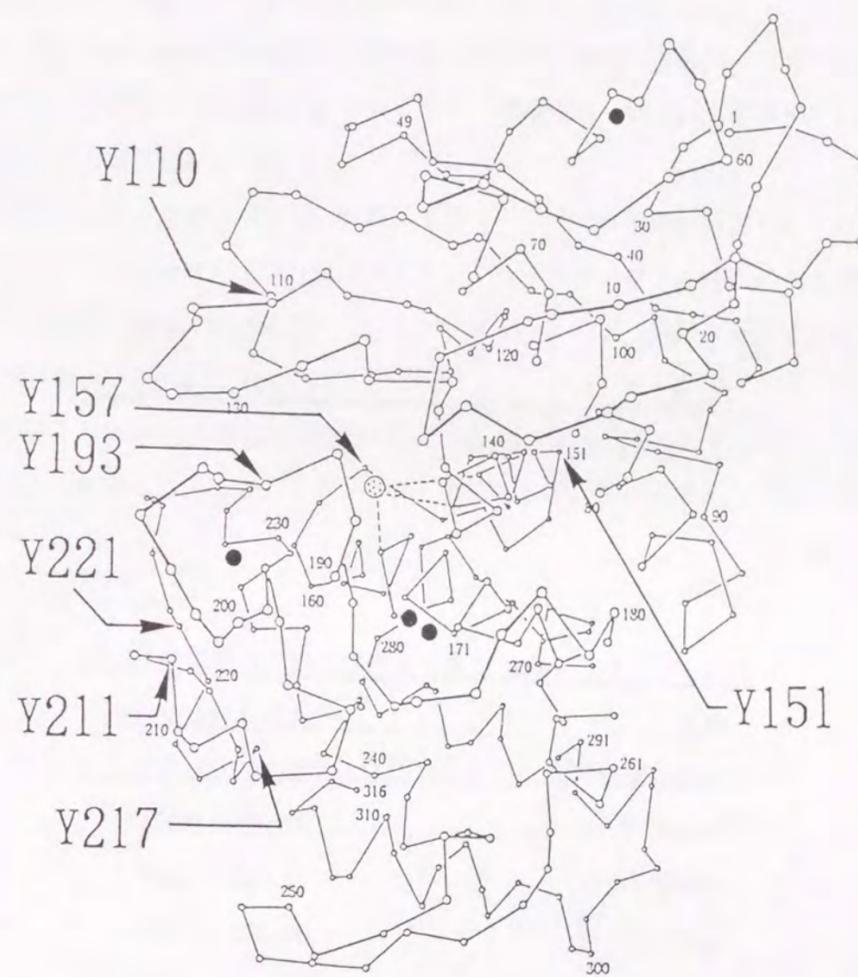


図5-5. NprMの3次元構造。白丸は α -炭素を示す。亜鉛原子を点刻丸で示し、アミノ酸とのリガンドを破線で示す。4つのカルシウム原子は黒丸で示す。置換したチロシン(Y)は矢印で示す。

表5-5. Tyr をTrp に置換した時の各酵素の比活性.

酵素	比活性 u/mg protein
NprM (天然型)	27,000 (100%)
Y110W	42,000 (160%)
Y151W	N D
Y157W	5,000 (20%)
Y193W	21,500 (80%)
Y211W	41,000 (150%)
Y217W	19,000 (70%)
Y221W	13,000 (50%)

N D : 形質転換株においてハローを形成しなかったもの.

表5-6. Tyr をTrp に重複置換した時の各酵素の比活性.

酵素	比活性 u/mg protein
NprM (天然型)	27,000 (100%)
Y110W, Y211W	40,000 (150%)
Y110W, Y221W	41,000 (150%)
Y211W, Y221W	28,000 (100%)
Y110W, Y211W, Y221W	33,000 (120%)

チロシン残基からトリプトファン残基への複数の置換では相乗効果が見られなかった。これらのことより、110番目のチロシン残基からトリプトファン残基への置換がカゼインを基質とした場合、最大の比活性を示した。

5.3.6. 自己分解耐性を付与したNprMの創製

プロテアーゼはその性質から絶えず自己消化という問題がつきまとう(110)。NprMは耐熱性蛋白質であり安定性に優れているが、かなり強い蛋白質分解能も合せ持つことより自己消化をさけて通れない。特にキレート剤存在下においては不安定であり(第1章)、直ちに自己消化される(110)。

そこで、さらにNprMに安定性を付加するため自己分解耐性を付与したNprMの創製を行った。精製したNprMを使い、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.5)を用いて、60℃で一夜自己分解させた。

分解物をウルトラセント-10(分画分子量1万、東ソー社製)を用い、a画分(>1万)、b画分(<1万)と分画した。高速液体クロマトグラフィ(HPLC)、TSK-gel DEAE 5pw(イオン交換クロマトグラフィ、東ソー社製)を用い分析、分取した(図5-6)。

その後、脱塩を兼ねTSK-gel G2000sw(ゲルクロマトグラフィ、東ソー社製)を使用し再精製した。各フラクションを凍結乾燥後、N-末端アミノ酸配列を決定した(表5-7)。

表5-7. 自己分解画分のN-末端アミノ酸.

フラクションNo.	N-末端アミノ酸
I	Tyr-Gln-Asp
II	Leu-Thr-Glu
III	Val-Gln-Tyr
IV	* -----Tyr
V	Tyr-Thr-Thr
VI	Tyr-Ser-Ser
VII	Tyr-Asp-Gly

* 決定出来なかったアミノ酸

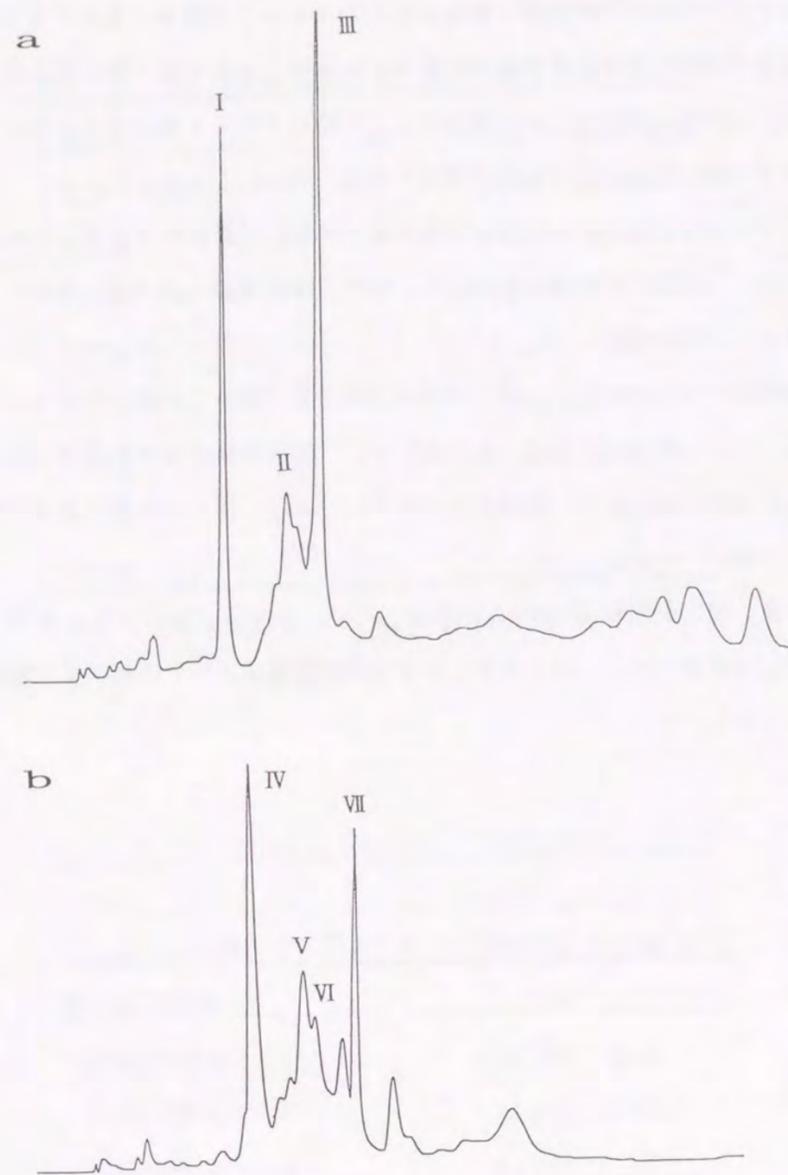


図5-6. NprM自己分解物のHPLCを用いた分析. 分析カラムはTSK-gel DEAE 5pw (イオン交換クロマトグラフィー、東ソー社製)を用いた.
a: 分子量 10,000 以上、b: 分子量 10,000 以下.

フラクションI~VIまでのアミノ酸配列は、NprMのアミノ酸配列に対応するものがなかった。これは、各フラクションの精製が完全に行われていないため(複数の断片が混在している等)ノイズとして分析された場合と、プロテアーゼの自己消化フラグメント同志がある部分において合成反応に利用された場合が考えられるが、詳細は不明である。

そこでフラクションVII (Tyr93-Asp94-Gly95)において自己分解を押さえるべく変異導入を計画した。Tyr93のまゝで自己分解されるということ、またNprMは疎水性アミノ酸を認識し切断する傾向が強いということより、Y93G(Tyr93→Gly)(疎水性の減少、チャージなし)及びY93S(Tyr93→Ser)(疎水性の減少、チャージなし)の変異導入を行った。

合成DNAとして5'-CCGTCTCAGTGGTGACGGAAATA (Y93G用)及び5'-CGTCTCAGTTCCGACGGAAAT (Y93S用)(共に下線で示した部分が置換する塩基)を作成し変異の導入を行った。

作成した変異型プラスミドpMK1 (Y93G)及びpMK1 (Y93S)を*B. subtilis* MT-2株に導入し培養した後、変異型酵素を取得した。表5-8にカゼインを基質としたときの比活性を示した。

表5-8. 自己分解耐性を付与した時の各酵素の比活性.

酵素	比活性 u/mg protein
NprM (天然型)	27,000 (100%)
Y93G	26,000 (95%)
Y93S	22,000 (80%)

その結果、いずれの場合も若干、比活性の低下が認められた。

次に50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5), 5 mM CaCl₂ にそれぞれの酵素を溶解後、80°Cでの安定性を測定した(図5-7)。その結果、明らかに変異型酵素はNprMに比べ高い残存活性を有しており、酵素安定性が上昇したものとされた。

同様の方法により、50°Cにおける安定性を調べたところ、変異型酵素のほうが約3～6%程度高い残存活性を示した(50°C、5時間後)。

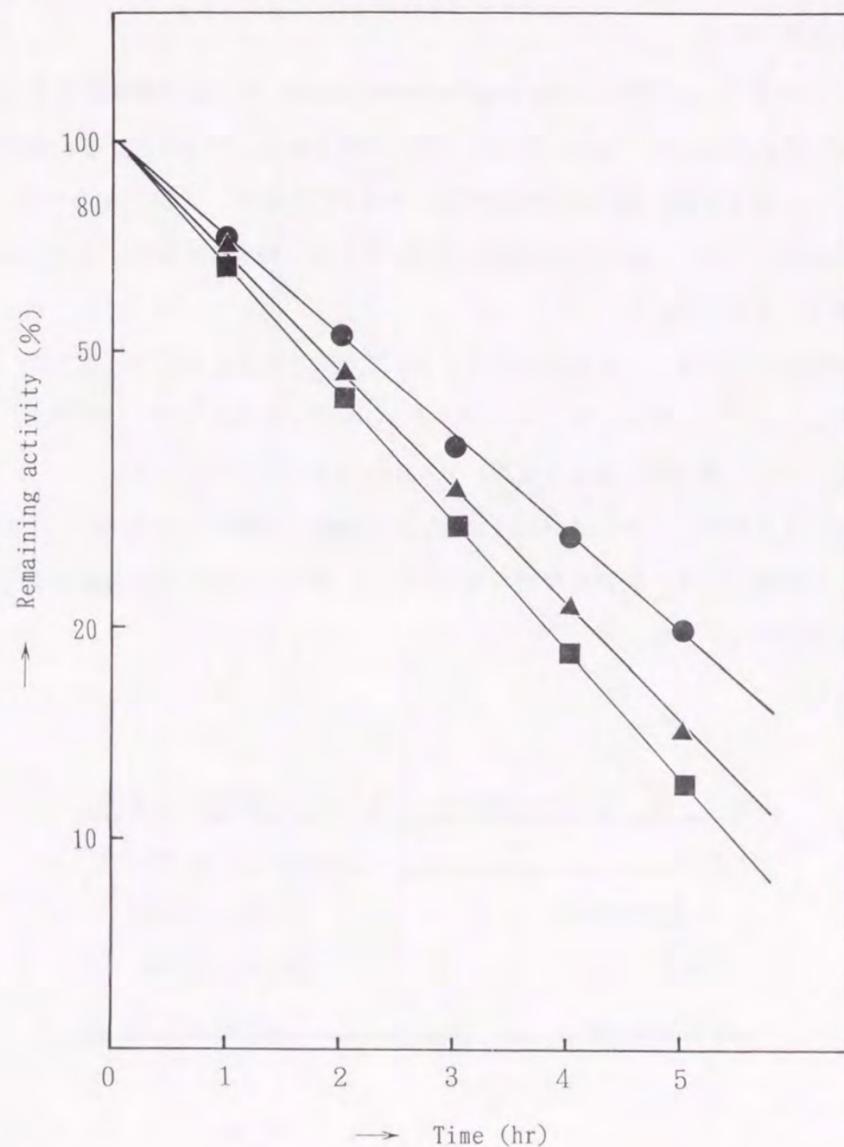


図5-7. 変異型酵素 Y93S、Y93G およびNprMにおける安定性の比較。それぞれ50mMトリス緩衝液(pH7.5), 5mM CaCl₂ に酵素を溶解後、80°Cで保温し残存活性を測定した。●: Y93S、▲: Y93G、■: NprM。

以上の結果から、NprMに比べ自己分解点にアミノ酸置換を導入した変異型酵素のほうが自己分解耐性が付与されたため、酵素の失活が抑えられ、酵素の安定性が上昇したのではないかと考えられた。

一方、これらの変異型酵素を用い、APMの合成を試みたところ、NprMに比べY93Gが約20%高い合成活性を示した(データは示さず)。

第4節 考察

耐熱性中性プロテアーゼNprMを用いて、APM合成をさらに効率良く行わせるため、蛋白質工学の手法を用いて種々の改変型変異酵素の作成を行った。活性中心の1つのアミノ酸であると予想されているGlu143をアスパラギン酸とグルタミンに置換した場合、形質転換株に全くハローが形成されず、プロテアーゼ活性が消失したものと思われた。このように活性中心を直接変化させることは活性を失う可能性が最も高く、なかなか活性上昇に結びつかないと推測された。すなわち他の活性中心であるHis231や亜鉛に配位しているアミノ酸残基などを変化させる場合は、細心の注意を要すると思われる。

一方、基質と結合する部位であるサブサイトを変化させた場合、活性の上昇するものや低下するものなど、ある程度変化に富んだ変異型酵素が得られた。このようにさらに置換するアミノ酸の種類や、他のサブサイトにおける変異導入を試みることにより、これまで以上に活性の上昇した新規酵素が取得できると期待される。

サーモライシンにおいて、BlumbergとVallee(109)は化学修飾による活性上昇を達成している。そこでこの化学修飾を、蛋白質工学的に再現させることを試みた。表面に露出していると予想されるチロシン7残基をトリプトファンに置換したところY110WとY211Wにおいて顕著に比活性の増大が見られた(50~60%)。すなわち110及び211番目における側鎖の増大により比活性増大が達成されたものと考えられた。一方、他の位置でチロシン残基をトリプトファン残基へ置換した場合には、110及び211番目の置換のような結果は得られなかった。このように

化学修飾においてもすべてのチロシン残基が修飾されているのではないと予想された。

A P M 合成の場合、高温（45℃付近）で長時間の反応が必要であり、酵素の安定性が反応の効率を左右し、安定性の高い酵素の取得が望まれている。そこで自己分解耐性を付与した変異酵素の取得を目指し、変異の導入を行った（Y93G 及び Y93S）。これらの変異型酵素は、カゼインを基質とした場合、若干の比活性低下が認められたが、酵素安定性（自己分解耐性）においては特に Y93G が優れた結果を示した。この変異型酵素は実際の A P M 合成反応でも有意に合成効率が高まり（データは示さず）、安定性上昇が効果をもたらしたものと思われた。

今後、このように更に安定性や自己分解を增強した酵素を創製することにより、工業的にもさらに有用な変異型酵素を取得できるかもしれない。

第5節 要約

1. 枯草菌中で効率良く変異を導入するためのプラスミド系を構築した。
2. 活性中心の1つのアミノ酸であるGlu143をアスパラギン酸とグルタミンに置換したところ活性型酵素の取得ができず、プロテアーゼ活性が失われたものと思われた。
3. S1及びS2のサブサイトをアラニン、グルタミン、リジン、及びグルタミン酸の4種類のアミノ酸に置換したところ、Phe114においては変化に富んだ比活性を示す変異型酵素が得られたが、Trp115においては活性型酵素の取得ができず、プロテアーゼ活性が失われたものと思われた。
4. NprMにおいてドメインAとBのゆらぎを変化させるためI137GとG136Sの変異酵素を作成したが、かなりの比活性低下が認められた。

5. 化学修飾の結果を参考にし、表面に露出しているチロシンをトリプトファンに置換したところ約60%近い比活性の上昇が認められた。
6. 酵素安定性を高めるため、自己分解耐性の付与を目指し、Y93GとY93Sの変異酵素を作成したところ若干の比活性低下があったが、安定性を增強することができた。

第6章 耐熱性中性プロテアーゼの枯草菌を用いた醗酵生産における温度効果

第1節 緒言

Bacillus 属細菌は、その旺盛な分泌能を利用して多数の有用酵素を生産するため、重要な有用微生物として認識されている (112, 113, 114)。また、最近では *Bacillus* 属細菌から多くの有用酵素遺伝子がクローニングされその分泌メカニズム、発現様式、蛋白質の構造等が着実に解明されつつある (48, 115, 116, 117)。

第1および2章において、土壌より新規に耐熱性中性プロテアーゼを生産する菌株をスクリーニングし、さらにその酵素遺伝子を *B. subtilis* 内にてクローン化後、全塩基配列を決めその酵素の耐熱性や発現についての解析を進めてきた。その結果 *nprM* 遺伝子はサーモライシンとは2アミノ酸残基異なるだけで、その他は全く同じ配列であることが判明した。また類似の耐熱性中性プロテアーゼをコードする *nprT* 遺伝子との比較から、*nprM* 遺伝子は *nprT* 遺伝子と非常によく似たプロモーター配列を有することも明らかとなった。さらに *nprM* 遺伝子は元株と同属の *B. subtilis* 中でも効率良く発現し、同一条件下の培養において親株より約10倍高い生産能を示した。

一方、親株である *B. stearothermophilus* MK232 株、またMK232 株を用い変異操作を繰り返し、*NprM* 高生産株としたYG185 株等の好熱菌での酵素生産は、菌体増殖に伴い酵素生産を開始するという、いわゆる増殖連動型であった (第1章、第3節)。ところが *nprM* 遺伝子をクローン化した *B. subtilis* を用いて *NprM* の醗酵生産を行ったところ、菌体増殖が終了し定常期に入った後酵素生産が開始されるなど、両宿主間において遺伝子発現型に大きな違いが認められた (第2章、第3節)。

これらの遺伝子発現の違いは同一遺伝子の発現にもかかわらず生じたもので、その解明は非常に興味を持たれた。そこでこれらの違いが、宿主菌による発現の違

いによるものか、*B. subtilis* を用いた組換え菌のためなのか、また他の要因によるものなのか、これらの発現様式の違いの原因を解析することを目的とした。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

実験に使用した菌株およびプラスミドを表6-1に示した。

表6-1. 菌株およびプラスミド.

菌株	特性	文献
<i>B. subtilis</i> MT-2	<i>trpC2 leuC7 hsdR hsdM Npr⁻</i>	(54)
<i>B. subtilis</i> NA-1	<i>hsrM hsmM Amy 1 Npr⁻</i>	(118)

プラスミド	特性	文献
pMK1	Km ^r <i>nprM⁺</i>	(56)
pNP22	Km ^r Tc ^r <i>nprT⁺</i>	(24)
pTBA530	Km ^r Tc ^r <i>amyE⁺</i>	(118)

Km^r : カナマイシン耐性、Tc^r : テトラサイクリン耐性

枯草菌 *B. subtilis* MT-2 および *B. subtilis* NA-1 は組換えプラスミドの宿主として用いた。

培地

B. subtilis の完全培地として第1章、第2節で示した、L培地を用いた。プラスミドpMK1を保持する株を培養する場合は、カナマイシン (Km) を5 μg/mlになるように加えた。またプラスミドpNP22 およびpTBA530 を保持する株を培養する場合は、カナマイシン (Km) 5 μg/mlとテトラサイクリン (Tc) 20 μg/ml

を加えた。

プロテアーゼ活性測定法

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で測定した。

α -アミラーゼ活性測定法

Bernfeldの還元糖定量法（ジニトロサリチル酸法）（118, 119）を用いた。基質にはリン酸緩衝液（40 mM K-Pi、2 mM CaCl₂、pH6.0）に溶解した2%可溶性デンプンを使用した。まずリン酸緩衝液で適当な濃度に希釈した酵素液0.5 mlと基質0.5 mlを混合し、40°Cで3分間反応させた。その後、反応停止液* 1 mlを加え沸騰水中で5分加熱し、水で冷却した後、脱イオン水で希釈してA₅₄₀を測定した。ブランクには、先に停止液を加えた後、基質を添加したものを用いた。

活性の定義は、40°C、3分の反応で1 mg のマルトースを遊離させる酵素を1単位とした。

* 反応停止液の調製

2 N NaOH 20 mlに脱イオン水50 mlを加え、これに1 gの3,5-ジニトロサリチル酸を溶かした。さらに30 gの酒石酸カリウムナトリウムを溶かし、脱イオン水で100 mlにメスアップした。

プラスミドの調製法および枯草菌の形質転換法

プラスミドの調製は、第2章、第2節に述べた方法で行った。枯草菌 *B. subtilis* MT-2 株の形質転換は、第2章、第2節の方法に従い行った。またNA-1株の形質転換は、MT-2株のTF-IおよびTF-IIからアミノ酸を除いたものを用い、同様の培養方法で行った。

試薬

全ての試薬は、ナカライテスク（株）および和光純薬（株）から購入した。

第3節 結果

6.3.1. 高温における枯草菌を用いた *nprM* 遺伝子の発現様式

B. stearothersophilus MK232 由来 *nprM* 遺伝子は親株であるMK232 株中では菌体増殖と共に酵素が分泌生産される（増殖連動型）（第1章、第3節）（36）。

一方、*nprM* 遺伝子をクローン化した *B. subtilis* MT-2株を用いて酵素生産を行ったところ *B. subtilis* 内でも効率良く発現したが、その酵素生産様式は好熱菌の場合とは異なり、菌体増殖が終了してから後に酵素が分泌生産された（第2章、第3節）（53）。これらの違いが生じる理由として、（1）宿主細胞が異なる、

（2）両宿主の培養温度が異なる、（3）*B. stearothersophilus* の場合 *nprM* 遺伝子は染色体DNA上に存在するのに対し、*B. subtilis* では低コピー数（9コピー）プラスミドベクター上にある、などが考えられる。そこでまず *nprM* 遺伝子は好熱菌由来であり遺伝子発現と温度との関係が深いものと推測し、培養温度と遺伝子発現との関係について詳細な解析を行った（図6-1）。

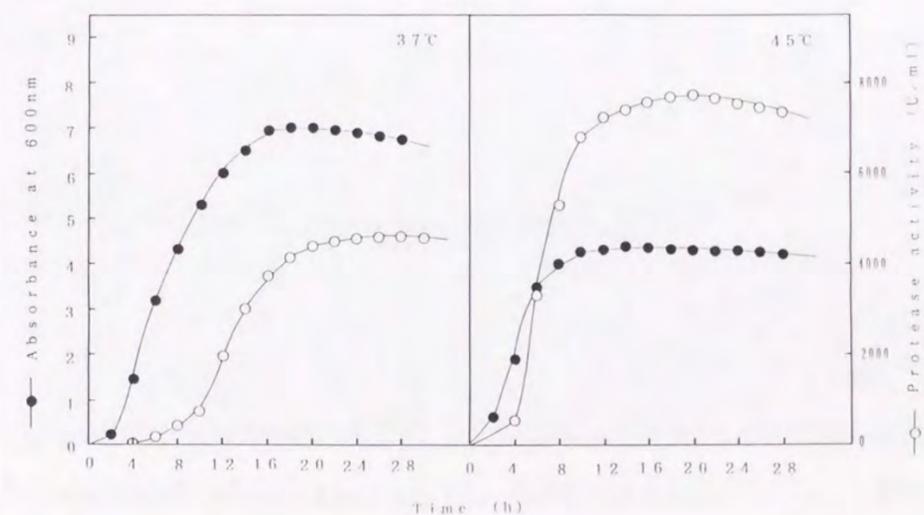


図6-1. *B. subtilis* MT-2/pMK1 の37 および45°Cでの菌体増殖と酵素生産。培養はカナマイシン5 μ g/mlを含むL培地で行った。培養上清は酵素活性測定に供した(○)。菌体増殖(●)は、600nmの吸収で測定した。

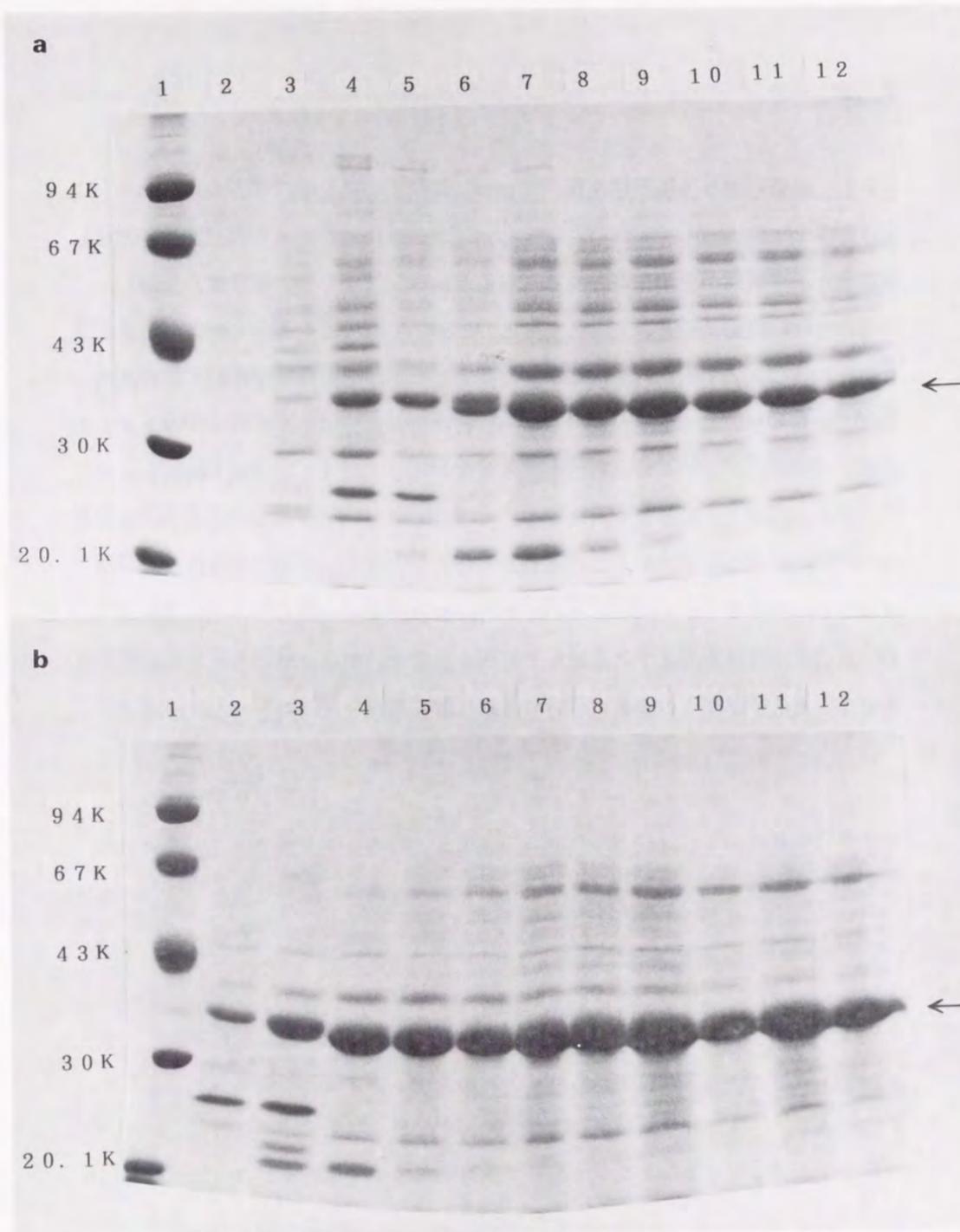


図6-2. *B. subtilis* MT-2/pMK1 の分泌する菌体外蛋白質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析. レーン1: 標準蛋白質マーカー (94.0K: phosphorylase b, 67.0K: albumin, 43.0K: ovalbumin, 30.0K: carbonic anhydrase, 20.1K: trypsin inhibitor). K: kilodaltons. レーン2~12は培養時間を示す (それぞれ4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, および24時間を示す). 培養温度は、37°C (a) と45°C (b) である. 矢印はNprMを示す.

B. subtilis の生育限界温度は、約53°CであることからpMK1 (図2-6) を保持する *B. subtilis* MT-2株を37および45°Cで培養した。図6-1に37および45°Cでの菌体増殖と酵素活性の経時変化を示し、また図6-2に菌体外に分泌された蛋白質をSDS-PAGEで解析したものを示した。

最大菌体濃度は、37°Cでは $OD_{600} = 7.0$ に対し45°Cでは4.4であった。また酵素活性は、37°Cでは4,600 u/mlに対し45°Cでは7,500 u/mlに達した。酵素生産開始時期は、37°Cでは減衰期であったのに対し45°Cでは好熱菌と同じく対数増殖期に移行した (図6-1)。

図6-1に示したように、37°Cでの培養よりも45°Cにおける方がNprMをさらに効率良く分泌生産した。また高温で培養することにより *B. subtilis* MT-2由来の分泌蛋白質は明らかに減少していた (図6-2)。

6.3.2. 各温度における枯草菌を用いた *nprM* 遺伝子の発現およびその発現様式

B. subtilis を宿主とした場合、37および45°Cでの *nprM* 遺伝子発現には、大きな違いが認められた。そこで遺伝子発現に及ぼす培養温度の効果について詳細に検討した。図6-3に30、37、38、39、40、45、および50°Cでの培養における菌体あたりの酵素生産を示した。

その結果、40°Cでは培養開始後、約4時間 (対数増殖期) で酵素生産が開始されたが、39°Cでは約10時間経過後 (減衰期) に酵素生産が開始された。一方、菌体増殖は、39および40°Cでは顕著な差が認められなかった。このように、39および40°Cを境界として、*B. subtilis* を宿主とした場合 *nprM* 遺伝子の発現様式は、明らかに変化し、40°Cでの培養は好熱菌の *nprM* 遺伝子の発現様式に移行することがわかった。また40°Cでの培養は、39°Cでの培養と比べ、菌体あたりの酵素発現量も、顕著に増大した。

各培養温度での菌体増殖と酵素生産の特性を表6-2にまとめた。これらの結果から培養温度を上昇させればさせるほど、酵素生産は上昇するということが明らかになった。そのときの培地中に分泌生産された最大活性は、50°Cでの培養時におけるもので、8,100 u/ml (14時間) にも達した。これは枯草菌生育の至適温度である37°Cの場合と比べると、約2倍近い酵素生産性であった。しかしながら菌

体増殖は、高温時には低下することが明らかになった。

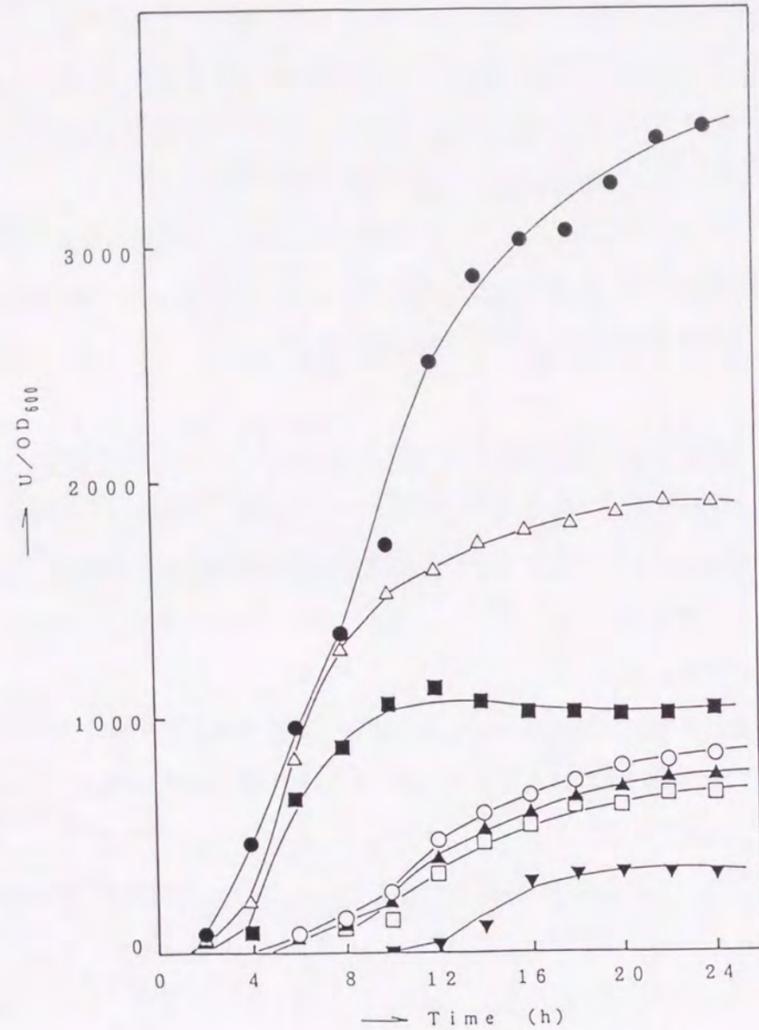


図6-3. 各温度における単位菌体当たりのプロテアーゼ活性. プラスミドpMK1を有する *B. subtilis* MT-2をそれぞれ30°C (▼)、37°C (□)、38°C (▲)、39°C (○)、40°C (■)、45°C (△)、および50°C (●)で培養し測定した。

表6-2. 各温度におけるNprM生産と菌体増殖.

温度 (°C)	最大酵素活性 (u/ml)	菌体当たりの最大酵素活性/OD ₆₀₀	最大菌体濃度 (OD ₆₀₀)	酵素生産開始時期
30	1000(22h)	300 (20h)	6.0 (24h)	減衰期
37	4600(24h)	680 (24h)	7.0 (18h)	減衰期
38	5200(24h)	740 (24h)	7.0 (18h)	減衰期
39	5500(24h)	820 (24h)	7.0 (18h)	減衰期
40	6200(24h)	1100 (24h)	6.4 (18h)	対数増殖期
45	7500(20h)	1900 (12h)	4.4 (10h)	対数増殖期
50	8100(14h)	3500 (24h)	3.5 (10h)	対数増殖期

6.3.3 各温度における枯草菌を用いた *nprT* および *amyE* 遺伝子の発現様式

nprM 以外の好熱菌由来遺伝子もここに示したのと同様の温度効果を示すのかどうかを調べるため、*B. stearothermophilus* CU21株由来の耐熱性中性プロテアーゼ遺伝子 (*nprT*)を用いて *B. subtilis* 内での遺伝子発現における温度効果を調べた。

また中温菌である *B. subtilis* MI113 由来 α -アミラーゼ遺伝子 (*amyE*)についても同様に解析した。

nprT 遺伝子をコードするプラスミド、pNP22 (24)を *B. subtilis* MT-2株に導入した。形質転換株である *B. subtilis* MT-2/pNP22を用い、37および45°Cでの培養を行った。図6-4に示すように *nprT* 遺伝子の発現様式は37および45°Cにおいてはほぼ同様であり、対数増殖期に発現が開始された。これは同じ好熱菌由来 *nprM* 遺伝子とは異なる発現時期であった。また *nprT* 遺伝子の発現は、37°Cよりも45°Cの方が低く、培養における醗酵生産への温度効果は認められなかった。これらの結果から、好熱菌由来遺伝子は全て *nprM* 遺伝子のように、培養温度を上昇させることにより遺伝子発現が増強されるとは限らないということが明らかとなった。同様に中温菌由来 *amyE* 遺伝子をコードするプラスミド、pTBA530 (118)

を *B. subtilis* MT-2株に導入し、形質転換株である *B. subtilis* MT-2/pTBA530を用いて37および45℃での培養を行った(図6-5)。 *amyE* 遺伝子の発現開始時期は37℃においては減衰期であった。また、培養温度上昇に伴い、酵素生産は低下した。

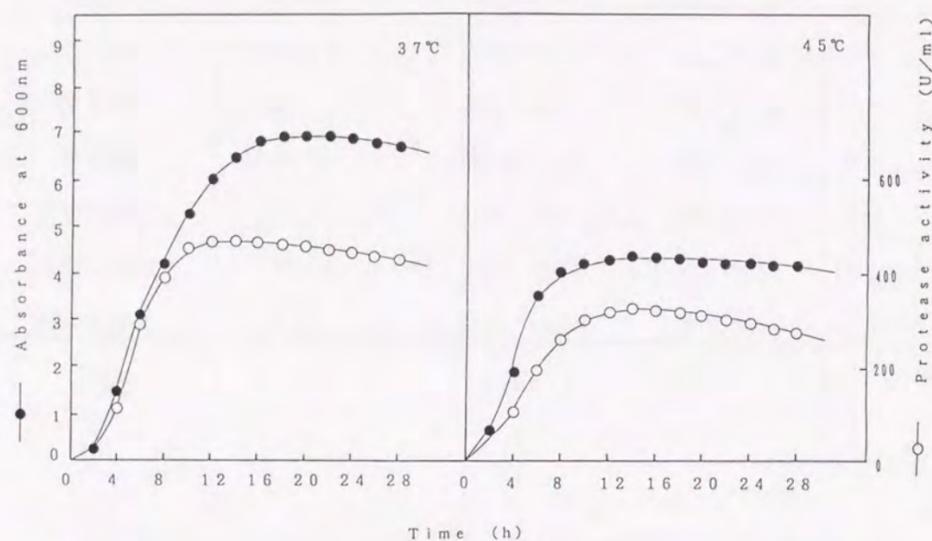


図6-4. *B. subtilis* MT-2/pNP22の37 および45℃での菌体増殖と酵素生産。培養はカナマイシン5 μ g/mlを含むL培地で行った。培養上清は酵素活性測定に供した(○)。菌体増殖(●)は、600nmの吸収で測定した。

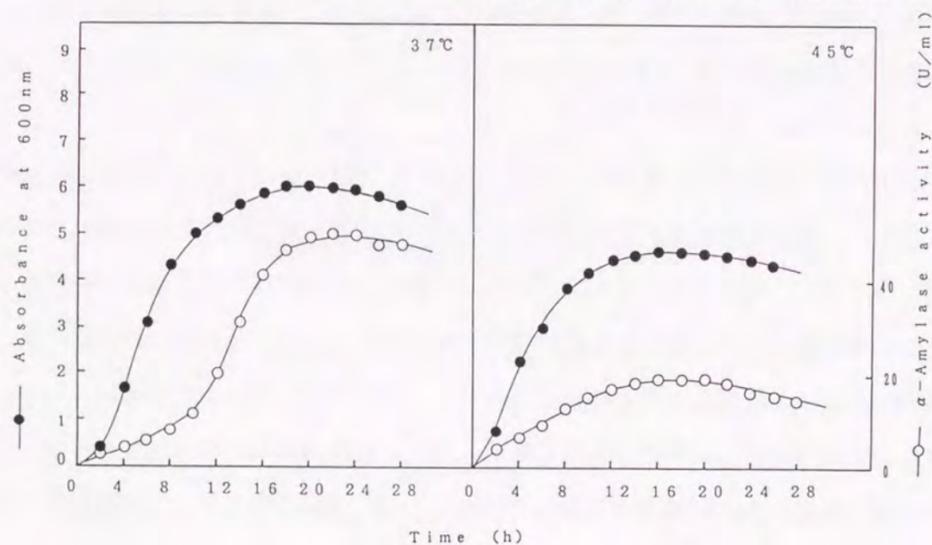


図6-5. *B. subtilis* NA-1/pTBA530の37 および45℃での菌体増殖と酵素生産。培養はカナマイシン5 μ g/mlおよびテトラサイクリン20 μ g/mlを含むL培地で行った。培養上清は酵素活性測定に供した(○)。菌体増殖(●)は、600nmの吸収で測定した。

第4節 考察

好熱菌 *B. stearothermophilus* MK232 株由来 *nprM* 遺伝子は *B. stearothermophilus* だけでなく *B. subtilis* でも効率良く発現した。しかしながら遺伝子発現様式には、かなりの違いが認められた。組換え体である *B. subtilis* MT-2/pMK1を用いた場合、培養温度を39℃から40℃に上昇させると遺伝子発現開始時期が減衰期から対数増殖期に移行した。また酵素生産性は温度上昇と共に増大した。

遺伝子発現増大の理由として、次の可能性が考えられる。

- 1) *nprM* 遺伝子のプロモーターが温度上昇によりさらに効率良く働く。すなわち温度誘導性プロモーターである。実際、*nprM* 遺伝子はATリッチな塩基配列で構成されているため、高温領域において、より転写されやすくなったのではないかと考えられる。
- 2) *B. subtilis* の中には、低温および高温で働く異なったシグマ因子が存在する。
- 3) *nprM* 遺伝子の周辺に調節遺伝子が存在し、それら遺伝子が高温領域においてよく機能した。今後、さらにこれらの解析を進めることは興味深いことと思われる。

次にこれらの現象は、好熱菌由来遺伝子には一般的に見られるかどうかを調べるため、好熱菌である *B. stearothermophilus* CU21由来 *nprT* 遺伝子を用い同様の実験を行った。その結果、*nprT* 遺伝子の場合37および45℃において増殖と連動して発現し *nprM* 遺伝子とは異なった発現様式を示した。これらのことから、培養における温度効果は好熱菌由来遺伝子に共通の現象ではないことが明らかとなった。

さらに中温菌である *B. subtilis* MI113 由来 α -アミラーゼ遺伝子、*amyE* を用いて培養における温度効果が存在するか否かを調べた。その結果 *amyE* 遺伝子の場合 *nprM*、*nprT* 遺伝子のいずれとも違う発現様式を示した。また *amyE* 遺伝子の場合、温度上昇に伴い酵素活性が減少したが、これは *amyE* 遺伝子が中温菌由来ということで高温による蛋白質の変性、分解が起こったものと思われた。

次に遺伝子レベルでの違いを見るため、*nprM*、*nprT* および *amyE* 遺伝子のプロモーター配列の比較を行った(図6-6)。

ここに示したように、*nprM* と *nprT* のプロモーター配列は非常に類似した配列

総括と展望

遺伝子工学の確立、またそれに伴う蛋白質工学の出現により、有用蛋白質の生産、解析、さらにはその改良において強力な手段が得られたといえる。最近、これらの技術は *E. coli* のみにとどまらず、*Bacillus* 属細菌、放線菌といった原核生物から、酵母、動物細胞さらには植物細胞にまで適応範囲が広がり、今後はますます広範囲な研究が期待できる。本研究では、*Bacillus* 属細菌由来耐熱性中性プロテアーゼを研究対象とし、遺伝子工学技術を利用した酵素遺伝子のクローニング、遺伝子解析さらに部位特異的変異導入法を用いた高発現のメカニズムの解明、蛋白質工学技術を利用した酵素の改良、また組換え体を用いた工業生産を目指した醗酵特性の検討を行った。以下にその成果を総括する。

第1章では、アスパルテーム合成のための酵素を生産する菌株のスクリーニングを行った。また種々の変異操作を繰り返し、親株より約2倍生産性の高い *B. stearothermophilus* YG185 株を取得した。さらにこの株から酵素を取得し、諸性質を調べたところ、耐熱性中性プロテアーゼであることが明らかになった。このプロテアーゼは、従来工業的に広く使用されているサーモライシンと非常に類似した性質を示したが、耐熱性、またカゼインを基質とする比活性においてサーモライシンより勝っていた。

第2章では、スクリーニングした菌株から、Imanaka 等の開発した、*B. subtilis* の遺伝子交換系 (23) を利用し、酵素遺伝子のクローニングを行った。クローニングした酵素の構造遺伝子 (*nprM*) の全塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定したところ、2アミノ酸を除き (Asp37 → Asn、Glu119 → Gln)、サーモライシンと全く相同であった。プロモーター配列においては、Takagi 等によってクローニングされた *nprT* 遺伝子 (24) と非常によく似た配列を有していた。さらに菌体外に分泌される酵素のN末端アミノ酸配列を決定したところ、本酵素も *Bacillus* 属細菌由来プロテアーゼに一般的に見られるプレプロ構造を有していることが判明した。またこの *nprM* 遺伝子の発現を酵素活性を指標として調べたところ、

親株同様、同属である *B. subtilis* 中でも効率良く発現した。一方、遺伝子発現量を見るため、同一の醗酵条件下で *nprT* 遺伝子と発現を比較したところ、*nprM* 遺伝子は *nprT* 遺伝子より約20倍も高い発現を示した。さらに *B. subtilis* 中の *nprM* 遺伝子の発現はL培地で、親株 (*B. stearothermophilus* MK232) に比べ約10倍高い酵素生産を示し、プラスミドのコピー数に見合った遺伝子増幅効果が認められた。

第3章では、*nprM* 遺伝子の高発現メカニズムを解明するため、構造遺伝子中の核酸2次構造に着目し、遺伝子発現と2次構造との関係について検討した。耐熱性中性プロテアーゼをコードする *nprM* と *nprT* は非常によく似たアミノ酸配列を有するにもかかわらず、発現率においてはかなりの違いが認められた (第2章)。両遺伝子の塩基配列中の2次構造形成可能領域を検索したところ、*nprT* 遺伝子にはほとんど全ての領域にわたり2次構造形成可能領域が見られたが、*nprM* 遺伝子においては1カ所見られるのみであった。そこでこの *nprM* 遺伝子に存在する2次構造領域に、部位特異的変異導入を行い、アミノ酸配列を変えること無く2次構造の伸長、縮小を与える変異を導入した。その結果、2次構造を伸長させたものは著しい酵素生産性の低下が認められたが、mRNAの転写量においては親株や2次構造を縮小させたものと比べ、変化が認められなかった。このように構造遺伝子内の2次構造と遺伝子発現とは密接に関係していることが明らかとなった。

一方、原核生物を対象として報告されているデータを整理、解析したところ、SD配列付近では-5~6 kcal/mol、その他の領域では-20 kcal/mol 付近で遺伝子発現が増減することが明らかに認められた。

第4章では、*nprM* 遺伝子の有するプロモーター配列を基本とし、*Bacillus* 属と *E. coli* とのプロモーター配列の比較を行った。*nprM* プロモーターを種々改良したところ、-35領域と-43領域 (A+T リッチな領域) が *E. coli* のプロモーター強度と密接に関係していた。また、*nprM* プロモーターにおいても-75領域にATに富んだ領域 (AT box) が見出され、*Bacillus* 属細菌においてもこのような領域が、プロモーター強度に影響を与えているのかもしれない。さらにこのよう

な知見を基とし、*E. coli* 中で機能する強力なプロモーターの構築を目指し、T3 フェージ由来、*A3* プロモーターを基本とし種々の改良型プロモーターの構築を行った。その結果、従来 *E. coli* の中で機能し、また強力と言われている *tac* プロモーターよりもさらに強力なプロモーター（約3倍の強度）を構築することができた。またこれら一連のプロモーターは *lac* オペレーターを結合させることにより、IPTGにより誘導可能な遺伝子発現系を作成することができた。

第5章では、蛋白質工学的手法を用い、アスパルテーム（APM）合成を考慮して、酵素の安定性、比活性上昇を付与した改変型 NprM の創製を目指し、各種アミノ酸置換の導入を行った。活性中心を直接、同類のアミノ酸に置換したところ、活性は完全に消失した。このことから活性中心の重要性と共に、活性上昇のためには活性中心近傍を改良する必要があることが示唆された。次に Matthews 等によって示されたサブサイトでアミノ酸置換を導入したところ、ほとんど活性の見られないもの、また多少比活性の増減したものが得られた。

NprM の3次構造においてドメイン A と B は α -ヘリックスで結ばれている。その領域において自由度を付加させることによる酵素活性上昇を予測し、側鎖の小さなグリシンとセリンを導入したが、これらの変異型酵素は予想とは逆に、比活性の低下が認められた。Blumberg と Vallee はチロシン残基の化学修飾により比活性増強を達成している。そこでこの知見を基として、チロシン残基を側鎖の大きいトリプトファン残基に置換したところ、Y110W と Y211W においてカゼインを基質とした場合、明らかに比活性の増強が認められた。このように化学修飾を蛋白質工学的にある程度再現することが出来ることを示した。

最後に安定性についての改良を試みた。NprM はプロテアーゼであるため、自己分解が生じる。そこで、これを防ぐことにより安定性を上昇させる目的で、自己分解点である Tyr93 にアミノ酸置換の導入を行った。その結果、若干、比活性の低下が認められたが、安定性は明らかに上昇した。

第6章では、*nprM* 遺伝子と *B. subtilis* を用いた酵素の醗酵生産を目指し、従来よりもさらに生産効率を上昇させるため、培養温度の影響を検討した。*nprM*

遺伝子は *B. stearothermophilus* 内では菌体増殖に伴い酵素が連動して発現したが、その遺伝子を保持する *B. subtilis* 内においては菌体増殖が終了した後に酵素が生産された。これらの違いを解析したところ、*nprM* 遺伝子は好熱菌由来ということもあり、*B. subtilis* 中において、培養温度40℃以上でその発現様式が増殖連動型に移動することが判明した。これは *nprM* 遺伝子に特有のものであり、他の好熱菌由来 *nprT* 遺伝子や中温菌由来 *amyE* 遺伝子においては見られなかった。また温度を50℃に上昇させて培養することにより、37℃の時に比べ、約2倍量の酵素を得ることができた。

これら一連の好熱菌由来耐熱性中性プロテアーゼ、NprM、を研究対象とし、生産菌株のスクリーニング、高生産変異株の分離、遺伝子のクローニング、塩基配列の決定、プロモーター領域の解析、高生産メカニズムの解明、APM用新規変異酵素の創製、および培養における温度効果等の研究を行った。このように遺伝子のクローニングは酵素分子の解明から、新規酵素の創製、さらには遺伝子増幅効果による増産まで応用が可能であり、必須の技術となってきた。しかしながら、いまだ *E. coli* を宿主とした技術が中心であり、今後は枯草菌を含め他の宿主に至るまでさらなる研究、技術開発が必要であろう。

一方、有機反応と生体触媒である酵素を組合わせたいわゆるハイブリッドプロセスは、厳密な基質特異性、反応効率の高さがある反面、温度、pH、圧力、溶媒等において限られた条件下のみで作用させなければならない。本研究で示したように、今後は反応に適した酵素のスクリーニングと共に、そうした目的で酵素の改変を行うことが重要な課題になると思われる。酵素の改変においては、その立体構造から適切なアミノ酸置換を導入し酵素を改良することが最良の方法であるが、現在のところ酵素改変において明確な指針がなく、今後の研究の積み重ねにより徐々に明らかにされていくものと考えられる。

本研究では、APM合成においてより適切な酵素の創製を目指し一部の改良を試みたが、著しい改良は行えなかった。これは天然型の酵素が自然界において突然変異を繰り返し、最良の酵素機能として現在の安定性、比活性になったとも考えられる。また1アミノ酸置換では酵素の立体構造が著しく変化せず、複数の部位に

おけるアミノ酸置換が必要なかもしれない。今後さらに多数の変異型酵素の作成によるデータの蓄積と解析によりNprMを構成している個々のアミノ酸の役割がより明確になると思われる。

遺伝子組換え体を用いた酵素、ペプチド等の生産が近年盛んに行われるようになったが、プラスミドの安定性、蛋白質のリフォールディング、プロテアーゼによる分解、異種遺伝子産物による宿主の増殖阻害、糖鎖問題等、解決しなければならない問題が多々ある。本研究においても、*B. subtilis*の組換え体を用いた大量培養の系を確立することが今後残された課題である。さらにますます遺伝子組換え体を用いた工業的醗酵が盛んに行われるようになると思われるが、上述の問題点を解決することが実用化への第一歩であろう。

参考文献

1. K. W. Jackson and J. Tang, Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. *Biochemistry*, **21**, 6620-6625, (1982).
2. C. Nolan, L. S. Hall, G. H. Barlow, and I. I. E. Tribby, Plasminogen activator from human embryonic kidney cell culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **496**, 384-400, (1977).
3. S. Kasai, H. Arimura, M. Nishida, and T. Suyama, Primary structure of single-chain pro-urokinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12382-12389, (1985).
4. M. Ottesen and I. B. Svendsen, The subtilisins. *Methods Enzymol.*, **19**, 199-215, (1970).
5. J. Sekiguchi, N. Tanaka, and O. Okada, Genes affecting the productivity of α -amylase in *Bacillus subtilis* murburg. *J. Bacteriol.*, **121**, 688-694, (1975).
6. S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, and R. B. Helling, Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3240-3244, (1973).
7. H. Malke and J. J. Ferretti, Streptokinase: Cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3557-3561, (1984).
8. T. Sako, S. Sawaki, T. Sakurai, S. Ito, Y. Yoshizawa, and I. Kondo, Cloning and expression of the streptokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 271-277, (1983).
9. D. Pennica, W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. J. Harkins, G. A. Vohar, C. A. Ward, W. F. Bernet, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel, and D. Collen, Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator in *E. coli*. *Nature*, (London), **301**, 214-221, (1983).
10. F. Malpartida and D. A. Hoopwood, Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* (London), **309**, 462-464, (1984).
11. A. M. Maxam and W. Gilbert, Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.*, **65**, 499-560, (1980).
12. F. Sanger and A. R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441-448, (1975).
13. J. R. Cameron, S. M. Panasenko, I. R. Lehman, and R. W. Davis, *In vitro* construction of bacteriophage λ carrying segments of the *Escherichia coli* chromosome: Selection of hybrids containing the gene for DNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3416-3420, (1975).
14. V. Hershey, H. W. Boyer, C. Yanofsky, M. A. Lovett, D. R. Herinksi, Plasmid colE1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3455-3459, (1974).

15. S. I. Feinstein, Y. Chernajovsky, L. Chen, L. Maroteaux, and Y. Mory, Expression of human interferon genes using the *recA* promoter of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 11, 2927-2941, (1983).
16. M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, Y. Taniyama, S. Iwai, K. Kitano, S. Miyamoto, T. Ohgi, Y. Sakuragawa, K. Fujiyama, T. Ikari, M. Kobayashi, T. Miyake, S. Shibahara, A. Ono, T. Ueda, T. Tanaka, H. Baba, T. Miki, A. Sakurai, T. Oishi, O. Chisaka, and K. Matsubara, Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 5956-5960, (1984).
17. A. -J. Zonneveld, H. Veerman, M. E. MacDonald, J. A. v. Mourik, and H. Pannekoek, Structure and function of human tissue-type plasminogen activator (t-PA). *J. Cell. Biochem.* 32, 169-178, (1986).
18. G. Winter, A. R. Fersht, A. I. Wilkinson, M. Zoller, and M. Smith, Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis : tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. *Nature (London)*, 299, 756-758, (1982).
19. L. J. Perry and R. Wetzel, Disulfide bond engineered into T4 lysozyme : stabilization of the protein toward thermal inactivation. *Science*, 226, 555-557, (1984).
20. T. Imanaka, M. Shibazaki, and M. Takagi, A new way of enhancing the thermostability of protease. *Nature (London)*, 324, 695-697, (1986).
21. K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, and T. Hashimoto, Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysin in an organic solvent. *J. Org. Chem.*, 46, 5241-5242, (1981).
22. R. H. Mazur, J. M. Schlatter, and A. H. Goldkamp, Structure-taste relationships of some dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 2684-2691, (1969).
23. T. Imanaka, M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba, Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 149, 824-830, (1982).
24. M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba, Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, 163, 824-831, (1985).
25. H. Yamazaki, K. Ohmura, A. Nakayama, Y. Takeichi, K. Otozaki, M. Yamasaki, G. Tamura, and K. Yamane, α -Amylase genes (*amyR2* and *amyE*) from α -amylase-hyperproducing *Bacillus subtilis* strain : molecular cloning and nucleotide sequences. *J. Bacteriol.*, 156, 327-337, (1983).
26. B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki, Crystalline bacterial protease. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.*, 45, 185-194, (1958).
27. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.), The Williams & Wilkins Company, Baltimore, (1974).
28. K. Weber and M. Osborn, The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412, (1969).
29. U. K. Lamli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 277, 680-685, (1970).
30. M. Bier, in *Separation, Recovery, and Purification in Biotechnology* (J. Asenjo and J. Hong, eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., (1986).
31. P. Schaeffer, *Bacteriol. Rev.*, 33, 48, (1969).
32. S. Endo, Studies on protease by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 40, 346-353, (1962).
33. B. W. Matthews, J. N. Jansonivs, P. M. Colman, B. P. Schoenborn, and D. Dupourque, Three-dimensional structure of thermolysin. *Nature, New Biology*, 238, 37-41, (1972).
34. K. Titani, M. A. Hermodoson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, and H. Neurath, Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature, New Biology*, 238, 35-37, (1972).
35. W. L. Bigbee and F. W. Dahlquist, Magnetic resonance studies of the active-site region of thermolysin. *Biochemistry*, 13, 3542-3549, (1974).
36. M. Kubo, K. Murayama, K. Seto, and T. Imanaka, Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Technol.*, 66, 13-17, (1988).
37. 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、学位論文、大阪大学、(1989)。
38. H. C. Birnboim and J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 7, 1513-1523, (1979).
39. T. Maniatis, E. F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory.
40. T. Imanaka, T. Tanaka, H. Tsunekawa, and S. Aiba, 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, (1981).
41. C. Anagnostopoulos and J. Spizizen, Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 81, 741-746, (1961).
42. J. Shine and L. Dalgarno, The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA : complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1342-1346, (1974).
43. D. Perlman and H. O. Halvorson, A putative signal peptidase recognit-

- ion and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptide. *J. Mol. Biol.*, 167, 391-409, (1983).
44. N. Vasantha, L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula, 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 protein. *J. Bacteriol.*, 159, 811-819, (1984).
 45. P. Argos, M. G. Rossmann, U. M. Greu, H. Zuber, G. Frank, and J. D. Traschin, Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18, 5698-5703, (1979).
 46. Y. Kagawa, H. Nojima, N. Nukiwa, M. Ishizaki, T. Nakajima, T. Yasuhara, T. Tanaka, and T. Oshima, High guanine plus cytosine content in the third letter of codons of an extreme thermophile. *J. Biol. Chem.*, 259, 2956-2960, (1984).
 47. R. Nakajima, T. Imanaka, and S. Aiba, Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene. *J. Bacteriol.*, 163, 404-409, (1985).
 48. G. Winter, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, and D. G. Barker, The amino acid sequence of the tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, 132, 383-387, (1983).
 49. M. Takagi and T. Imanaka, Role of the pre-pro-region of neutral protease in secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 71-76, (1989).
 50. M. Yang, E. Ferrari, and D. J. Henner, Cloning of the neutral protease of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an *in vitro* derived deletion mutation. *J. Bacteriol.*, 160, 15-21, (1984).
 51. J. D. Watson, "Molecular Biology of the Gene", 3rd Ed., Benjamin, New York (1976).
 52. M. N. Hall, M. De'barbouille, and M. Schwartz, A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature (London)*, 295, 616-618, (1982).
 53. M. Kubo and T. Imanaka, Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1883-1892, (1983).
 54. M. Fujii, M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba, 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).
 55. T. Imanaka, M. Fujii, and S. Aiba, Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J. Bacteriol.*, 146, 1091-1097, (1981).
 56. M. Kubo, and T. Imanaka, mRNA secondary structure in an open reading frame reduces translation efficiency in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 171, 4080-4082, (1989).
 57. J. Messing, New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101, 20-78, (1983).
 58. F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5463-5467, (1977).
 59. 姫野 毅、*Bacillus* 属細菌の蛋白質分泌に関する基礎的研究、学位論文、大阪大学、(1987)。
 60. T. Maniatis, E. E. Fritsch, and J. Sambrook, *in* Molecular Cloning, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York, (1982).
 61. J. C. Alwine, D. J. Kemp, B. A. Parker, J. Reiser, J. Renart, G. R. Stark, and G. M. Wahl, Detection of specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper. *Methods Enzymol.*, 68, 220-242, (1979).
 62. I. Tinoco, Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levine, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crother, and J. Grella, Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature (London), New Biol.*, 246, 40-41, (1973).
 63. N. Ogasawara, Markedly unbiased codon usage in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 40, 145-150, (1985).
 64. Y. Hibino, T. Miyake, Y. Kobayashi, M. Ohmori, T. Miki, R. Matsumoto, N. Numao, and K. Kondo, Enhanced expression of human pro-urokinase cDNA in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 329-336, (1988).
 65. P. Stanssens, E. Remaut, and W. Fiers, Alteration upstream from the Shine-Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression. *Gene*, 36, 211-223, (1985).
 66. Y. Xian-Ming, L. M. Munson, and W. S. Reznikoff, Molecular cloning and sequence analysis of *trp-lac* fusion deletion. *J. Mol. Biol.*, 172, 355-362, (1984).
 67. H. Shimotsu, M. Kuroda, C. Yanofsky, and D. J. Henner, Novel form of transcription attenuation regulates expression of *Bacillus subtilis* tryptophan operon. *J. Bacteriol.*, 166, 461-471, (1986).
 68. C. R. Wood, M. A. Boss, T. P. Patel, and J. S. Emtage, The influence of messenger RNA secondary structure on expression of an immunoglobulin heavy chain in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 12, 3937-3950, (1984).
 69. R. A. Hallewell, F. R. Masiarz, R. C. Najirian, J. P. Puma, M. R. Quiroga, A. Randolph, R. Sanchez-Pwscador, C. J. Scandella, B. Smith, K. S. Steimer, and G. T. Mullenbach, Human Cu Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high level of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res.*, 13, 2017-2034, (1985).
 70. K. C. Cone, and D. A. Steege, Functional analysis of *lac* repressor re-start sites in translational initiation and reinitiation. *J. Mol. Biol.*, 186, 733-742, (1985).

71. N. Lee, S. Zhang, J. Cozzitorto, J. Yang, and D. Testa, Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon α in *Escherichia coli*. *Gene*, **58**, 77-86, (1987).
72. B. S. Dehoff, J. K. Lee, T. J. Donhue, R. I. Gumpert, and S. Kaplan. *In vivo* analysis of *puf* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides* after deletion of a putative intercistronic transcription termination. *J. Bacteriol.*, **170**, 4681-4692, (1988).
73. H. C. Wong and S. Chang, Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3233-3237, (1986).
74. G. Belanger and G. Gingras, Structure and expression of *puf* operon messenger RNA in *Rhodospirillum rubum*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7639-7645, (1988).
75. M. Oda, A. Sugihara, and K. Furukawa, Cloning and nucleotide sequence of histidase and regulatory genes in the *Bacillus subtilis hut* operon and positive regulation of the operon. *J. Bacteriol.*, **170**, 3199-3205, (1988).
76. N. Vasantha, L. D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula, 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 protein. *J. Bacteriol.*, **159**, 811-819, (1984).
77. N. R. Novva, K. Nakamura, and M. Inouye, Gene structure of the *ompA* protein, a major surface protein of *Escherichia coli* required for cell-cell interaction. *J. Mol. Biol.*, **143**, 317-328, (1980).
78. F. Yamao, S. Iwagami, Y. Azumi, A. Muto, S. Osawa, N. Fujita, and A. Ishihara, Evolutionary dynamics of tryptophan tRNA in *Mycoplasma capricolum*. *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 364-369, (1988).
79. K. Nakamura, R. M. Pirtle, I. L. Pirtle, K. Takeishi, and M. Inouye, Messenger ribonucleic acid of the lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.*, **255**, 210-216, (1980).
80. G. E. Christie, P. J. Farnham, and T. Platt, Synthetic sites for transcription and a functional comparison with tryptophan operon termination site *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4180-4184, (1981).
81. S. Mahadavan and A. Wright, A bacterial gene involved in transcription attenuation at rho-independent terminator in *bgl* operon *E. coli*. *Cell*, **50**, 485-494, (1987).
82. C. Klug, C. W. Adams, J. Belasco, B. Doerge, and S. N. Cohen, Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *EMBO J.*, **6**, 3515-3520, (1987).
83. J. G. Belasco, T. Beatty, C. W. Adams, A. Gabin, and S. N. Cohen, Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulatus* results from segmental differences in stability within polycistronic *rxcA* transcript. *Cell*, **40**, 171-181, (1985).
84. E. Merino, B. Becerril, F. Valle, and F. Boliver, Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. *Gene*, **58**, 305-309, (1987).
85. S. F. Newbary, N. H. Smith, and C. F. Higgins, Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell*, **51**, 1131-1143, (1987).
86. J. E. Mott, J. L. Galloway, T. Platt, Maturation of *Escherichia coli* tryptophan operon mRNA: evidence for 3' exonucleolytic processing after rho-dependent termination. *EMBO J.*, **4**, 1887-1891, (1985).
87. A. M. Wu, G. E. Christie, and T. Platt, Tandem termination sites in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2913-2917, (1981).
88. I. E. Bergman and G. Brawerman, Control of Breakdown of the polyadenylate sequence in mammalian polyribosomes: Role of poly (adenylic acid)-protein interactions. *Biochemistry*, **16**, 259-264, (1977).
89. G. Huez, C. Bruck, and Y. Cleuter, Translational stability of native and deadenylated rabbit globin mRNA injected into HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 908-911, (1981).
90. C. Albercht, A. Krowczynska, and G. Brawerman, Configuration of β -globin messenger RNA in rabbit reticulocytes. *J. Mol. Biol.*, **178**, 881-896, (1984).
91. M. Piechaczyk, J. Yang, J. Blanchard, P. Jeanteur, and K. B. Marcu, Posttranscriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated *c-myc* RNAs in murine plasma cell tumors. *Cell*, **42**, 589-597, (1985).
92. M. Kubo, Y. Higo, and T. Imanaka, Biological threshold values of prokaryotic gene expression which is controlled by the DNA inverted repeat sequence and the mRNA secondary structure. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 305-307, (1990).
93. D. J. Galas, M. Eggert, and M. S. Waterman, Rigorous pattern-recognition methods for DNA sequences. Analysis of promoter sequences from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **186**, 117-128, (1985).
94. A. J. Ninfa, L. J. Reitzer, and B. Magasanik, Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell*, **50**, 1039-1046, (1987).
95. Y. Fujita, Regulation of *Bacillus subtilis* sporulation. *Biseibutu* (in Japanese), **5**, 301-312, (1989).
96. S. -L. Wang, C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi, The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from σ^{37} promoter *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1184-1188, (1984).
97. C. P. Moran Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero, and R. Losick, Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 339-346, (1982).

98. U. Peschke, V. Beuck, H. Bujard, R. Gentz, and S. LeGrice, Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 186, 547-555, (1985).
99. W. V. Shaw, Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.*, 43, 737-755, (1975).
100. L. Melin, K. Magnusson, and L. Rutberg, Identification of the promoter of the *Bacillus subtilis* *sdh* operon. *J. Bacteriol.*, 169, 3232-3236, (1987).
101. F. A. Ferrari, K. Trach, D. LeCoq, J. Spence, E. Ferrari, and J. A. Hoch, Characterization of the *spoA* locus and its deduced product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2647-2651, (1985).
102. H. A. deBoer, L. J. Comstock, and M. Vesser, The *tac* promoter : a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 21-25, (1983).
103. J. E. Brown, J. N. Bailey, and W. T. McAllister, Sequence of a region near the left end of bacteriophage T3 DNA that contains three promoters for the *E. coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 14, 4696, (1986).
104. M. Matsumura, W. J. Becktel, M. Levitt, and B. W. Matthews, Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6562-6566, (1989).
105. A. J. Russell and A. R. Fersht, Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature (London)*, 328, 496-500, (1987).
106. W. R. Kester and B. W. Matthews, Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin : implications for the mechanism of catalysis. *Biochemistry*, 16, 2506-2516, (1977).
107. K. Morihara and H. Tsuzuki, Thermolysin : kinetic study with oligopeptides. *Eur. J. Biochem.*, 15, 374-380, (1970).
108. P. M. Coleman, J. N. Jansonius, and B. W. Matthews, The structure of thermolysin : an electron density map at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 70, 701-724, (1972).
109. S. Blumberg and B. L. Vallee, Superactivation of thermolysin by acylation with amino acid N-hydroxysuccinimide esters. *Biochemistry*, 14, 2410-2419, (1975).
110. A. Fontana, G. Fassina, C. Vita, D. Dalzoppo, M. Zamai, and M. Zambonin, Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry*, 25, 1847-1851, (1986).
111. M. A. Holmes and B. W. Matthews, Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 160, 623-639, (1982).
112. H. Uehara, Y. Yoneda, K. Yamane, and B. Maruo, Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis* : transformation of high protease productivity. *J. Bacteriol.*, 119, 82-91, (1974).
113. K. Yamaguchi, H. Matsuzaki, and B. Maruo, Participation of a regulator gene in the α -amylase production of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 97-107, (1969).
114. T. B. Higerd, J. A. Hoch, and J. Spizizen, Hyper protease-producing mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 112, 1026-1028, (1972).
115. T. Himeno, T. Imanaka, and S. Aiba, Nucleotide sequence of the penicillinase repressor gene *penP* and *penI* of *Bacillus licheniformis* and regulation of *penP* and *penI* by the repressor. *J. Bacteriol.*, 168, 1128-1132, (1986).
116. T. Kuriki and T. Imanaka, Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1531-1559, (1989).
117. M. Yamada, M. Kubo, T. Miyake, R. Sakaguchi, Y. Higo, and T. Imanaka, Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia* : construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene*, 99, 109-114, (1991).
118. 西矢 芳昭、*Bacillus subtilis* α -アミラーゼの分泌生産に関する研究、修士論文、大阪大学、(1987)。
119. P. Bernfeld, Enzymes of carbohydrate metabolism. Amylase α and β . *Methods Enzymol.*, 1, 149-158, (1955).
120. E. J. Duvall, D. M. Williams, S. Mongkolsuk, and P. S. Lovett, Regulatory regions that control expression of two chloramphenicol-inducible *cat* genes cloned in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 158, 784-790, (1984).
121. M. Kubo and T. Imanaka, Effect of cultivation temperatures on the expression of thermophilic and mesophilic enzyme genes in *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 193-197, (1991).

本論文に関する報告

1. M. Kubo, K. Murayama, K. Seto, and T. Imanaka, Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Fermentation Technology*, 66, 13-17, (1988).
2. M. Kubo and T. Imanaka, Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of General Microbiology*, 134, 1883-1892, (1988).
3. M. Kubo and T. Imanaka, mRNA secondary structure in an open reading frame reduces translation efficiency in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 171, 4080-4082, (1989).
4. M. Kubo, Y. Higo, and T. Imanaka, Biological threshold values of procaryotic gene expression which is controlled by the DNA inverted repeat sequence and the mRNA secondary structure. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69, 305-307, (1990).
5. M. Yamada, M. Kubo, T. Miyake, R. Sakaguchi, Y. Higo, and T. Imanaka, Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene*, 99, 109-114, (1991).
6. M. Kubo and T. Imanaka, Effect of cultivation temperatures on the expression of thermophilic and mesophilic enzyme genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72, 193-197, (1991).
7. M. Kubo, Y. Mitsuda, M. Takagi, and T. Imanaka, Alteration of specific

activity and stability on thermostable neutral protease by site-directed mutagenesis. *submitting*.

8. 久保 幹, 肥後裕仁, 耐熱性中性プロテアーゼ (アスパルテーム合成酵素) 遺伝子のバチルス属細菌における発現及び遺伝的解析, 東ソー研究報告, 33巻, 101-112, (1989).

謝 辞

この研究は、大阪大学工学部醗酵工学科教授 今中忠行先生の下で行われたものであり、終始変わらぬ情熱のある激励と御指導、御鞭撻を賜りましたことを心から感謝致します。

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応用生物工学科 大嶋泰治教授、菅 健一教授、並びに大阪大学工学部生物学国際交流センター 吉田敏臣教授に感謝致します。

本研究の開始におきまして多大なる御協力と有益な御助言をもって御指導いただきました大阪大学名誉教授（現 東京電気大学教授）合葉修一先生に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数々の実験方法、また有益な討論を通し御指導いただきました大阪大学工学部醗酵工学科助手 高木昌宏博士に感謝致します。

本論文をまとめるに当たり、有益な討論を賜りました東ソー株式会社、竹本久雄氏、村山敬一氏に感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり大阪大学工学部醗酵工学科 合葉研究室、および今中研究室において研究の機会を与えていただきました、東ソー株式会社、瀬戸弘司博士に感謝致します。

