

Title	超好熱始原菌酵素と常温菌酵素の比較研究
Author(s)	古賀, 雄一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/432">https://hdl.handle.net/11094/432</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

工号 8162

# 超好熱始原菌酵素と常温菌酵素の比較研究

古賀雄一

2001

大阪大学大学院工学研究科  
物質・生命工学専攻  
極限生命工学講座

# 超好熱始原菌酵素と常温菌酵素の比較研究

古賀雄一

2001

大阪大学大学院工学研究科  
物質・生命工学専攻  
極限生命工学講座

## 目次

序論		1
第1章		
超好熱始原菌由来 glycerol kinase (Tk-GK) の特性解析		
1-1	背景	7
1-2	材料と方法	9
1-3	結果	13
1-4	考察	21
第2章		
部位特異的変異法による Tk-GK 型イオンペアの大腸菌 GK (Ec-GK) への導入		
3-1	背景	29
3-2	材料と方法	30
3-3	結果と考察	32
第3章		
DNA shuffling による Tk-GK と Ec-GK のキメラ酵素の作成と熱安定性解析		
4-1	背景	36
4-2	材料と方法	37
4-3	結果と考察	40
第4章		
超好熱菌由来 subtilisin 型 protease の特性解析		
2-1	背景	47
2-2	材料と方法	48
2-3	結果	51
4-4	考察	58
総括		62

参考文献	66
本稿に関する論文	73
謝辞	74

## 序論

生命を司る生体機能分子は脂質、核酸、多糖類など様々であるが、その最も代表的なものが、蛋白質である。特に酵素は生体反応の大部分を触媒しており、生命の担い手とも言える。従って、酵素機能を理解する事は、直ちに生命を理解する事に繋がるわけではないが、生命を理解するための重要な手がかりを与えることは間違いない。例えば、ヒトをはじめ多くの生物種のゲノム塩基配列が決定されていく中で、我々の前には膨大な量の配列情報が出現してきた。これらの情報はそれ自体はただの塩基の並びであり、ゲノムを全て読んだところで生物を丸ごと理解する事には成らない。これらのゲノム情報は、そこに何が書き込まれているのかを解きあかし、それがどのような構造をとって、どのように機能を発揮しているかを理解していく事で、はじめて生きてくると考えられる。また、酵素はその高い特異性と反応性のゆえに、工業用触媒としても、高い利用価値が有ると期待されている。しかし、酵素は一般に不安定でその利用範囲が限られてしまっている。有用酵素は主に微生物からスクリーニングしてくることが多いが、酵素を産業的に利用するには、遺伝子クローニング、発現系の構築等によりその生産性を高めるとともに、酵素の持つ諸性質（pH 特性、温度特性、基質特異性など）を作業環境にあわせて、最適化する必要がある。現在得られている構造機能相関に関する知見から酵素の機能を原子レベルで理解し、それに基づいて機能の改良された酵素を設計することが期待されている。

酵素の機能は各酵素分子に特有の立体構造によって生み出されており、その立体構造は酵素を構成しているアミノ酸の配列によって、ほぼ一義的に決まると言われている（アンフィンゼンのドグマ）。従って、原理的にはアミノ酸配列（もしくは遺伝子の塩基配列）が分かれば、そこから構造を、さらに機能までを決定する事ができることになる。しかし実際は、酵素の構造機能相関に関してグローバルな法則は見い出されていないので、デザインした立体構造が、どのようなアミノ酸配列から実現できるのかを予測する事は困難であるのが現状である。科学的な理解のためにも、工学的利用のためにも、構造と機能の相

関に関する知見を蓄積して行くことが、蛋白質研究の大命題である。特に耐熱化機構の研究は、立体構造のフォールディングや構造の維持などにも深いかわりがあり、構造機能相関の研究において、最も根源的な研究といえる、耐熱化機構に関する知見も科学的好奇心の対象であると共に、産業への応用が期待される分野である。

酵素の耐熱性（またはその他の性質）の研究に於いては、酵素に変異を入れて、その結果、耐熱性（他の性質）がどのように変化したか、観察する方法が取られている。それら蛋白質工学的研究では、系統的なアミノ酸置換を site-directed に導入して個々に、安定化因子と関連のあるアミノ酸残基を同定したり、あるいは、全くランダムに変異を導入して安定化酵素を創出したりすることが行われている。しかし、膨大な広がりを見せる蛋白質の適応地形を、まったくの、手探りで進んでいくのでは効率が悪い。自然界には、超好熱菌のように高温環境に生育する生物が存在し、その生産する酵素は高温環境に適応していると考えられる。そこで、これらの超好熱菌酵素と常温菌酵素の構造を比較すれば、熱安定化機構の手本とする事ができる。つまり、目的蛋白質の耐熱性を向上させるためには、常温性酵素と耐熱性酵素の構造を比較して、安定性に違いをもたらすアミノ酸置換を抽出して蛋白質の安定化法の体系化を目指す事により、蛋白質に対する基礎的な理解が深まると共に、耐熱化設計技術の開発もできるようになると期待できる。そのためには、構造と機能を比較するのに適した酵素の選択が必要になってくる。

構造と生化学的機能の系統的な比較研究は構造機能相関を知る上で有効な手段であると考えられるが、常温性酵素と耐熱性酵素を実際に取得して、構造のみならず生化学的な性質まで系統的に比較研究している例はそれほど多くはない。それは主として、このような解析に適したシステムが、まだ、それほど多くは構築されてはいないことによるものと思われる。構造と機能の比較研究を効率良くすすめようと考え、どのような酵素を比較するか、選ぶことが大切である。より良い比較研究系を構築するための対象酵素を選ぶ際の基準は以下ようになる。1. 適切な比較相手が存在する事。耐熱性酵素が取得できても、

常温性の比較対象が無ければならない。比較にはホモログ（オルソログ）を用いる。ある程度、構造、機能に類似性が無いと相違点を比較はできないためである。また、比較対象の構造や機能が良く研究されているものがよい。2. 活性の検出が容易である事。酵素のように、定量的に性能を検出できるものを選ぶ。活性測定系が簡単な物が適している。3. 安定に供給されるものを選ぶ。ネイティブな酵素がたくさん取得できるか、もしくは組み換え蛋白質として安定に生産できるか。精製は可能か。保存できるか。比較する酵素が共に十分量、確保できることが極めて重要である。以上の条件を満たす、耐熱性酵素こそ、比較研究の材料として適していると考えられる。また、耐熱性酵素はそれ自体の有用性が高い、例えば、特異的 DNA の増幅技術である PCR は、もともと、Klenow ポリメラーゼが使用されていて、時間とコストのかかる技術であった。好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来の耐熱性ポリメラーゼが用いられるようになり、PCR は迅速、簡便な技術となり、生命科学に大革命をもたらしたのである。ほかにも、蛋白質や多糖類などの高分子分解酵素の産業利用が広く知られている。

*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 は、鹿児島県小宝島の硫気孔から分離された超好熱始原菌である。その分離元の温度は 102°C、pH は 5.8 である。電子顕微鏡により観察された形態は、直径 1 $\mu$ m の不定球菌で数本の極鞭毛を有している (Fig. 0-1)。KOD1 は硫黄還元従属栄養菌であるため、培地中の硫黄を還元して H<sub>2</sub>S を生産する。生育温度は 65°C から 95°C で至適温度は 90°C である。生育至適 pH は 7.0、生育至適塩濃度は 3% である。KOD1 は GC 含量 (38%) と 16S rRNA の系統解析から *Thermococcales* のメンバーである事が示唆されている。16S rRNA の配列情報が最も似ているのは *Thermococcus celer* であった。本菌からはこれまでに、DNA 複製、転写、翻訳に関わる蛋白質や、様々な代謝反応を触媒する酵素が単離されている (Table 0-1)。これらの蛋白質をはじめとする生体高分子は *T. kodakaraensis* KOD1 の生育しているような高温環境に適応しており、いずれも高い耐熱性を有していた。本菌から単離された酵素の中には PCR や高分子化合物の分解等に利用されているものもあり、今後も有用酵素の単離が期待される。また、有用酵素が全て超好熱菌から単離されるとは



限らない。そこで、超好熱菌由来蛋白質を解析し、他の有用酵素へ応用できるような熱安定化機構を同定するためにも、本菌の生産する酵素の耐熱化機構の解析がのぞまれている。本菌の生産する酵素の幾つかは、バクテリア由来の酵素と高い相同性を有しており、比較研究に適した材料であると言える。これらの材料を使って、実際に有効な比較研究が行えるのか、また、そのシステムにはどのような可能性が見出せるのかを研究した。

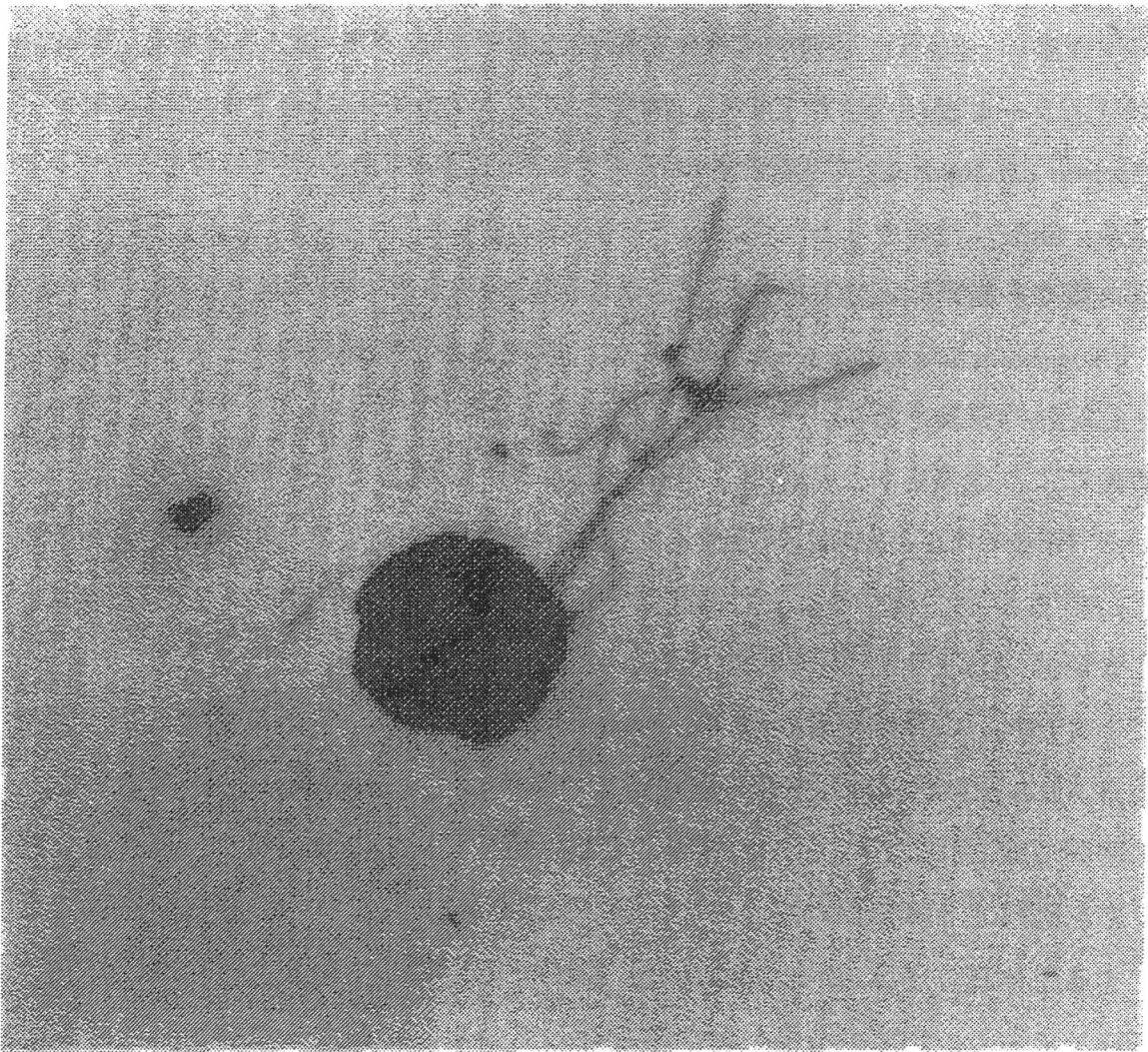


Fig.0-1 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 の電子顕微鏡写真

Table 0-1 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 から単離された蛋白質の例

蛋白質名	
Thiolprotease	蛋白質加水分解
$\alpha$ -Amylase	
4- $\alpha$ -Glucanotransferase	
$\beta$ -Glycosidase	
Aspartyl-tRNA synthetase	Aspartyl-tRNA 合成
TATAbinding protein	転写調節因子
RecA/RAD51 homologue	DNA 修復
Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	
Glutamine synthetase	グルタミン酸合成
DNA polymerase	DNA 鎖合成
Glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
O <sup>6</sup> -methylguanine-DNA methyltransferase	
RNaseHIII	DNA/RNA ハイブリッド RNA の分解
Glycerol kinase	Glycerol のリン酸化
Ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase	
Second subunit of chaperonin	蛋白質フォールディング
Histone	DNA 結合
Flagellin	鞭毛
TBP-interacting protein	転写調節因子
Chitinase	構成多糖の分解
CDC48/VCP homologue	
Intein homing endonucleaseII	DNA の分解
Tryptophan synthase	Tryptophan 合成
DNA ligase	DNA 連結
Subtilisin	蛋白質加水分解

本稿では大腸菌や枯草菌などの常温性生物で良く研究されており、さらに、工業的利用価値も認められている glycerol kinase と subtilisin 様 Ser protease をとりあげて、蛋白質の熱安定化機構、特に熱安定構造を解析する目的で研究を行った。第1章では、*T. kodakaraensis* KOD1 から glycerol kinase (Tk-GK) の遺伝子をクローニングし、その発現、精製系を構築して、構造と機能の研究が進んでいる *E. coli* 由来の glycerol kinase (Ec-GK) と比較した。第2章では、第1章の結果抽出された、安定化効果が示唆される Tk-GK の構造を Ec-GK に、導入した。第3章では、第2章とは異なる視点から、Tk-GK と Ec-GK の比較を行い、Tk-GK の熱安定化因子が局在している可能性が高いことが分かった。第4章では、別の比較系の構築を目指して、*T. kodakaraensis* KOD1 の subtilisin を大量に取得する系を構築し、枯草菌由来の subtilisin E と比較研究をおこなった。

## 第 1 章

### 超好熱始原菌由来 glycerol kinase (Tk-GK) の特性解析

#### 1-1 背景

グリセロールキナーゼ (EC 2.4.1.30; ATP: glycerol 3-phosphotransferase, GK) は、Mg、ATP 依存性の酵素で glycerol をリン酸化して、エネルギー代謝系およびリン脂質合成系における重要な中間代謝物 glycerol-3-phosphate を生成する反応を触媒する (1)。GK はバクテリアからヒトに至るまで多くの生物種に存在しており、GK をコードする数多くの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列が決定されている。それらのなかには、大腸菌 (2)、*Bacillus subtilis* (3)、*Pseudomonas aeruginosa* (4)、*Enterococcus casseliflavus* (5) の *glpK* 遺伝子のほか、*Saccharomyces cerevisiae* の GUT1 遺伝子 (6) やヒトの Xp 遺伝子 (7) が含まれている。さらに、いくつかの生物種の、全ゲノム DNA 配列決定によっても *Archaeoglobus fulgidus* のゲノムデータとして GenBank に AE001044 のアクセッションナンバーで登録されている配列のように GK のアミノ酸配列に関する情報もたらされている。これらのアミノ酸配列を比較すると、GK のアミノ酸配列は比較的よく保存されていることがわかる。例えば、大腸菌の GK とヒトの GK の相同性は 51% もあった。GK は glycerol 代謝経路における重要な酵素であるために生物進化の過程であまり大胆には構造、機能が変化しえなかったのではないかと考えられる。

数ある GK の中であって大腸菌の GK (Ec-GK) は構造、機能ともによく研究されている。この酵素は Glycerol 代謝経路中の律速段階を担っており、二つのアロステリックな阻害剤、 $\text{IIA}^{\text{glc}}$  と Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) によって高度に制御を受けている (8-12)。この酵素は同一サブユニットからなる 4 量体でできているが (13)、蛋白質濃度が低いところでは 2 量体に分かれるといわれている (10)。サブユニットと基質の一つである Glycerol の相互作用が Michaelis-Menten 型速度論に従うのに対し、もう一つの基質である ATP は非共同的な相互作用を示す (8, 11, 14)。速度論的研究と基質結合の研究から酵素を構成している 2 量体のサブユニット同士では、各々、ATP に対する親和力が異なることがわかった (14)。また、リン酸化されていない  $\text{IIA}^{\text{glc}}$ 、ADP、Glycerol-3-phosphate、Glycerol との複合体として、この Ec-GK の結晶構造が 2.6 Å の解像度で解析されている (15, 16)。この結晶解析によれば、GK の活性部位とは離れたところに、分子内 Zn(II) 結合サイトを介して、リン酸化されていない  $\text{IIA}^{\text{glc}}$  が結合していることが分かった。このことから、 $\text{IIA}^{\text{glc}}$  による阻害は広範囲に渡るコンホメーションの変化によって行われていると考えられる。また、2 量体、4 量体の会合状態の違いが FBP による GK の阻害を調整してい

また、2量体、4量体の会合状態の違いがFBPによるGKの阻害を調整していることが考えられている(9)。しかし、IIA<sup>glc</sup>やFBPによるGKのアロステリックな阻害や、ATPの非共同的結合、サブユニット構造の違い等に関する詳細な機構はまだ明らかにされていない。

進化上全ての生物が真核生物、原核生物、始原菌の三つのクラスに分類されることは、良く知られている(17, 18)。そのなかでも特に、超好熱性の始原菌は、生育環境が原始地球環境に類似していると考えられていることから、初期の生命の痕跡を残した生物であると考えられており、同一酵素群のなかで初期の酵素に近いものを産生していると考えられる。従って、真核生物や原核生物のGKとは異なるであろう超好熱始原菌のGKの機能や構造の解析を行うことは、蛋白質や生物の進化、蛋白質の高温環境への適応機構、さらに、原核生物性GKの複雑な特性を理解する上で有効な情報をもたらすと考えられる。しかし、これまでGKは始原菌から単離されていない。そこで、我々は超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来GKの解析を行うこととした。

*T. kodakaraensis* KOD1 は以前は *Pyrococcus* sp. KOD1 と称していたもので、鹿児島県小宝島の硫気坑より分離した菌株である(19)。その生育温度は65°Cから95°Cで生育至適温度は90°Cにもなる。これまでに本菌からは、Thiolprotease(19)、Aspartyl-tRNA synthetase(20, 21)、 $\alpha$ -amylase(22)、glutamate synthase(23)、ribose phosphate pyrophosphokinase(24)、Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase(25)、glutamate synthetase(26)、4- $\alpha$ -glucanotransferase(27)、 $\beta$ -glycosidase、TATA-binding protein(28)、RecA/Rad51 homologue(29)、DNA polymerase(30)、glutamate dehydrogenase(31)、O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase(32)、RNase HIII(33)、ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase(34)、chaperonin(35)、histone(36)、flagellin(37)、TBP interacting protein(38)、Chitinase(39)、CDC48/VCP homologue(40)、intein homing endonucleaseII(41)、Tryptophan synthase(42)、DNA ligase(43)等が解析されている。これらすべての酵素は不可逆的な熱変性に対して極めて安定であることが示されている。さらに、これらの酵素の中の幾つかは、広いヌクレオチド特異性(21)や金属イオン特異性(24)を示す。これら、めずらしい特性は超好熱始原菌に共通の特性と言えるようである。本研究で、我々は *T. kodakaraensis* KOD1 由来のGKと常温性の生物由来GKの構造的、機能的特性の違いを明らかにした。本菌の他の酵素と同様に、この酵素も、バクテリアのものよりも安定で、金属イオンとNTPの選択性に幅広さが認められた。さらに、本酵素は大腸菌由来のものとは異なり、FBPの阻害やATPの非共役的結合を受けない。本研究では、立体構造のモデルを元に本酵素の構造と機能の相関を議論する。

## 1-2 材料と方法

### 1-2-1 Cell と Plasmids

*T. kodakaraensis* KOD1 は鹿児島県小宝島の熱水硫気坑から分離された (19)。遺伝子操作に使った、*Escherichia coli* JM109 [recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, SupE44, relA1,  $\lambda$ -,  $\Delta$ (lac-ProAB)/F', traD36, ProA+B+, lacIqZ $\Delta$ M15.] とプラスミド pUC19 は Toyobo Co., Ltd. から、遺伝子発現のための *E. coli* BL21(DE3) [F-, ompT, hsdSB(rB-mB-), gal, dcm(DE3)] とプラスミド pET8c は Novagen から入手した。

### 1-2-2 材料

制限酵素、DNA polymerase、T4 DNA ligase は Takara Shuzo Co., Ltd から入手した。Glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) と peroxidase (PO) は Toyobo Co., Ltd から分けて頂いた。

### 1-2-3 Tk-GK 遺伝子のクローニング

*Tk-glpK* 遺伝子の部分配列は、5'-TGCTGTTTGGTACGG-3' と 5'-AGCCAGTGCCATAGGTGTTCTTCG-3' という2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを使って、PCR 法によって増幅した。鋳型として使用した染色体 DNA は *T. kodakaraensis* KOD1 の細胞より、salkosyl 溶菌液から抽出した (44)。その結果得られた、318bp の DNA 断片を *Redi prime* DNA labeling system (Amersham) を使用して [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP で標識し、サザンロットやコロニーハイブリダイゼーションのプローブとして使用した。*Tk-glpK* の全長をクローニングするために、*Bam*HI もしくは *Hind*III で染色体 DNA を断片化し 0.8% のアガロースゲル中に電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写し、サザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションは、Rapid-hyb buffer system (Amersham) を使用し、記載されていた条件下で行った。4.0kbp の *Bam*HI 断片が陽性を呈したので、アガロースゲル中の 4kbp 断片が広がっている部分を切り出し、GENECLEAN II kit (Funakoshi Co., Ltd.) を用いて、DNA 断片を精製した。精製した DNA 断片は pUC19 の *Bam*HI サイトに連結し、大腸菌 JM109 を形質転換することでクローニングした。形質転換体の選択は 50 $\mu$ g/ml のアンピシリンを添加した LB 培地 (45) で行った。陽性クローンのスクリーニングはコロニーハイブリダイゼーション法 (46) によって行った。このようにして、*TK-glpK* の全長を含む 4kbp の *Bam*HI 断片を持ったプラスミド pUC4000 を取得した。

PCR は Perkinson-Elmer のサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 2400) と Vent Polymerase (NewEngland Biolabs) を使用した (47)。全てのオ

リゴ DNA は Sawady Technology Co., Ltd. に合成を依頼した。制限酵素による DNA の消化、DNA 断片のアガロースゲル電気泳動、塩化カルシウム法による形質転換、アルカリ抽出によるプラスミド DNA の少量調製は以前に記載されている方法 (48) にしたがった。プラスミドの大量調製は Qiagen plasmid Maxi kit (Qiagen) を使用して調整を行った。塩基配列の決定は ABI PRISM 310 genetic analyzer (Perkin-Elmer) を用い dideoxy-chain termination 法 (49) で決定した。オープンリーディングフレームの同定、相同性検索、アライメントの作成などの塩基配列およびアミノ酸配列の解析には DNASIS (Hitachi Co., Ltd.) を使用した。

#### 1-2-4 大量発現および Tk-GK の精製

5'ATATACCATGGAAAAGTTCGTTCTTTC3' と 5'AATGGATCCATATCAATTTGATTTTGC<sup>ACT</sup>3' のオリゴヌクレオチドの組み合わせによって *Tk-glpK* を増幅した。なお、下線はそれぞれ、*Nco*I、*Bam*HI サイトをあらわし、斜体表記はそれぞれ、開始コドンと終止コドンを表わしている。鋳型には pUC4000 を使った。その結果、およそ 1.5kb の DNA 断片が増幅した。この DNA 断片を *Nco*I、および *Bam*HI で消化し、プラスミド pET8c の *Nco*I-*Bam*HI サイトにクローニングしてプラスミド pET-pkgk を構築した。このプラスミドを使用して、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換することで Tk-GK の大量発現系を構築した。Ec-GK の遺伝子は primer 5'-GGGACAATTACATATGACTGAAAAA-3' と 5'-CGCCGGAATTCTATTATTCGTCGTG-3' の組み合わせで PCR 増幅し、pET ベクターに繋いで発現系 (pET-eglpK) とした。

Tk-GK を大量発現するために、pET-pkgk で形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を 50 μg/ml のアンピシリンを添加した NZCYM 培地 (Novagen) で 37°C で培養し、培地の 600nm の吸光度が 0.6 に達したところで、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度が 1mM になるように添加して、さらに 8 時間培養した。菌体は 6000 × g 10 分の遠心分離によって集菌し、酵素の精製に使った。

菌体は 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) に懸濁し、Branson Ultrasonic Corp. の 450 sonifer モデルで超音波破碎した後 15000 × g で 30 分間遠心分離した。上清は 90°C 30 分の熱処理を行い 15000 × g 30 分の遠心分離を行って宿主大腸菌から持ち込まれたほとんどの蛋白質を沈殿させた。上清は 70% 飽和の硫酸アンモニウム塩で蛋白質を沈殿させた。沈殿は 15000 × g 30 分で集めた後、50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) に懸濁し、同じ平衡化した MonoQ カラム (Pharmacia) に供し、0M から 1M の NaCl 濃度勾配をかけたバッファーを流すと、およそ 0.5M の NaCl 濃度で Tk-GK が単一ピークとし

て溶出した。熱処理以外のすべての精製過程は 4°C で行い、精製の度合は SDS-PAGE で確認した (50)。Ec-GK については、pET-eglpK で BL21(DE3) を形質転換し、得られた形質転換体を用いて大量発現を行った。精製は硫酸分画と Hi-trap Q によって行った。

#### 1-2-5 酵素活性の測定

Tk-GK の酵素活性は 2mM CoCl<sub>2</sub>、3.5mM ATP、4.6mM Glycerol を含む 50mM glycine-NaOH バッファー (pH9.0) 800μl 中で測定した。80°C で 5 分間インキュベーションした後、16μl の 0.5M EDTA を加え水中につけて冷やすことで反応を停止した。反応溶液中の Glycerol-3-phosphate (G-3-P) の量は、glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) と peroxidase (PO) を組み合わせた 37°C の酵素反応によって比色定量した (51)。酵素の反応至適 pH を解析する際は 50mM Tris-HCl バッファー (pH7.5-9.0) と 50mM glycine-NaOH バッファー (pH8.5-11.0) を用いて活性測定を行った。酵素活性は、1 分間に 1μmole の G-3-P を生成する酵素量を 1 ユニットと定義した。比活性は蛋白質 1mg あたりの酵素量とした。

速度論的定数の算出を行う際には、ATP または [<sup>14</sup>C]Glycerol の一方の濃度を 2.0mM に固定したうえで、もう一方の濃度を振った。2.0mM CoCl<sub>2</sub> を含む 50mM Tris-HCl (pH7.5) バッファー 100μl に 0.06μg Tk-GK を加えた溶液を 80°C で 5 分間インキュベーションして酵素反応させた後、0.5M EDTA を 2μl 加え、水中につけて冷やすことで反応を停止した。一定量の反応液を直径 2.4cm の DEAE-cellose ろ紙 (Toyo Roshi Inc.) に載せて乾燥させた後に 0.1M Glycerol で洗い、Instant Imager (Packard) でろ紙上に残った [<sup>14</sup>C]G-3-P の量を測定した。ATP に対する速度論的定数を求めるときは、[<sup>14</sup>C]Glycerol の濃度を 2.0mM に固定し ATP の濃度を 20 から 500μM の範囲で変化させた。Glycerol に対するパラメータをはかるときは、ATP の濃度を 2.0mM に固定し [<sup>14</sup>C]Glycerol の濃度を 50 から 400μM の範囲で変化させた。いずれの場合も G-3-P の生成は Michaelis-Menten の速度論に従い、Lineweaver-Burk plot によって Km 値と kcat 値を求めた。

蛋白質の濃度は 280nm の紫外吸収を測定することにより決定した。アミノ酸分析の結果、A<sub>280</sub>=1.0 の Tk-GK 溶液の蛋白質濃度は 0.45 mg/ml であることが分かったので、Tk-GK の蛋白質濃度は 1mg/ml の時の A<sub>280</sub> の値を 2.2 として計算した。

#### 1-2-6 生化学的特性の解析

分子量は、150mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH8.0) バッファーで平衡化



したゲルろ過カラム HiLoad Superdex 200 (Pharmacia) を用いて推定した。検量線は Standard molecular marker (Bio-Rad) を用いて作成した。N 末端のアミノ酸配列の決定は、Procise™ automated sequencer (Perkin-Elmer model 491) を使って決定した。アミノ酸分析は Hitachi L-8500 automatic amino acid analyzer を使用して、110°C 24 時間、6N 規定 HCl、0.2% (v/v) phenol 中で加水分解して行った。

#### 1-2-7 CD 測定

CD スペクトルは J-720W spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Ltd.) を用いて、0.5M NaCl を含んだ 50mM Na-phosphate バッファー (pH7.9) を使用して、30°C で測定した。短波長 UV (200-260nm) 領域は蛋白質濃度 0.13mg/ml の酵素を 2mm のセルを用いて測定した。長波長 UV (350-320nm) 領域は 0.25mg/ml の酵素を 10mm のセルを用いて測定した。 $\theta$  はアミノ酸の平均分子量 110 を使って算出した。

#### 1-2-8 Tk-GK の 3 次元モデルの構築

Tk-GK の 3 次構造のモデルは主鎖に関しては、loop search 法 (52) を、側鎖のコンホメーションに関しては dead-end elimination 法 (53)、そして構造を緻密にするためには AMBER force field (54) を用いる conformation energy minimization 法 (55) を使って行った。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 Tk-GK 遺伝子のクローニングと塩基配列

多くの GK のアミノ酸配列中に見られる保存配列は Tk-GK にも保存されており、*Tk-glpK* 遺伝子中の保存配列に相当する部分の塩基配列は大腸菌の GK のものと類似性が高いと仮定して、15-25 塩基のオリゴヌクレオチド DNA を大腸菌の GK 遺伝子を元に設計し、*Tk-glpK* を PCR によって増幅させるためのプライマーとして使った。各プライマーを組み合わせ、PCR を行った結果、大腸菌の GK で 161 から 166 番目と 261 から 269 番目のアミノ酸配列に相当する部分の塩基配列に相当するプライマーの組み合わせで、KOD1 の染色体 DNA から 318bp の DNA 断片が増幅した。この DNA 断片の塩基配列を決定した結果、GK 遺伝子の部分配列であることが確認され、それは、Tk-GK の 157 から 263 番目のアミノ酸に相当する部分の塩基配列であった。塩基配列決定の結果、塩基配列中に *Hind*III サイトが存在したことから *Hind*III 2.0kbp の断片が *Tk-glpK* の 5' 末端側の一部しか含んでいないことが分かった。それに対し、*Bam*HI 4.0kbp の DNA 断片は *Tk-glpK* の全長を含んでいた。KOD1 のリボソーム結合サイトに相当する 16S rRNA の 3' 末端の 4 番目から 10 番目の塩基配列の相補配列 5'AGGTGAT3'を同定し、開始コドンを探したところ、リボソーム結合部の 6 塩基下流に AUG のコドンが見つかった。これによって、予想される蛋白質は 497 アミノ酸残基からなり、分子量は 55902 と予想された。TATA BOX 様配列 (5'TTAAAAA3', A box) は開始コドンの 67 塩基上流に見つかった。また、ターミネーター配列は終止コドンの 30 塩基下流にみられた。*Tk-glpK* の塩基配列は GenBank に ABO12099 で登録している。

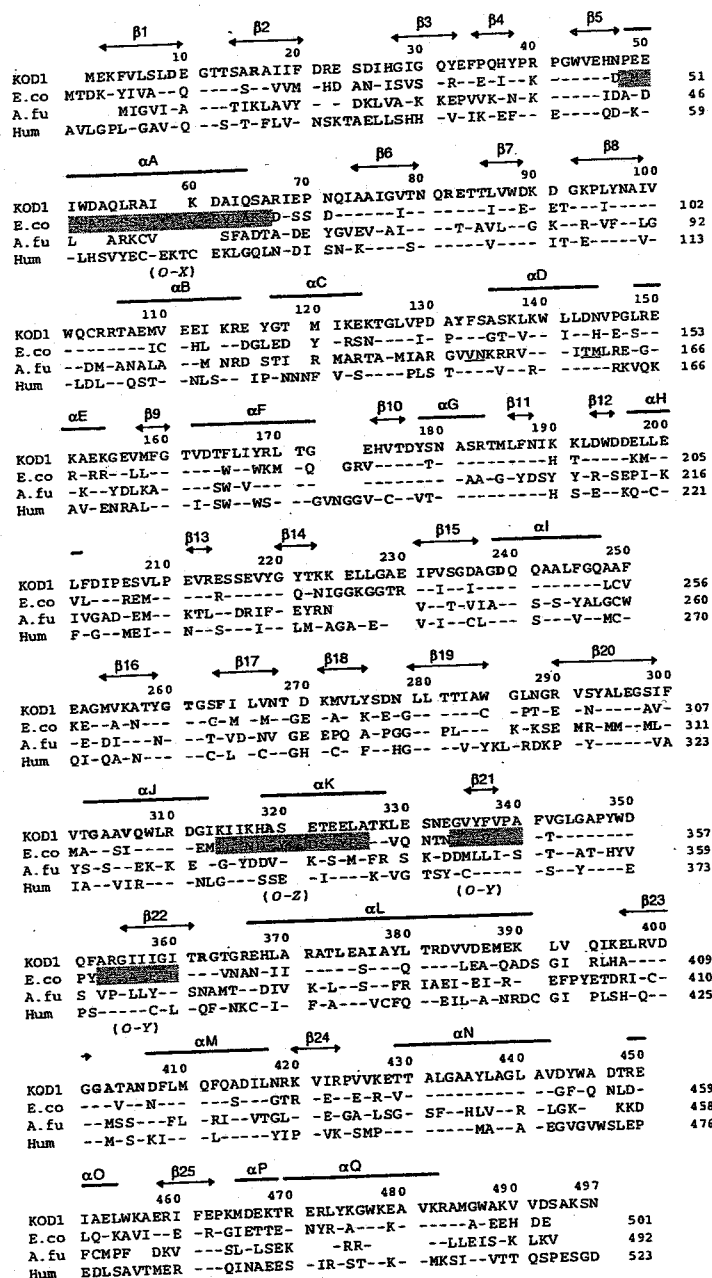


Fig.1-1 Tk-GK (KOD1)、Ec-GK (E.co)、*A.fulgidus* GK (A.fu)、及び human GK (Hum) のアミノ酸配列比較

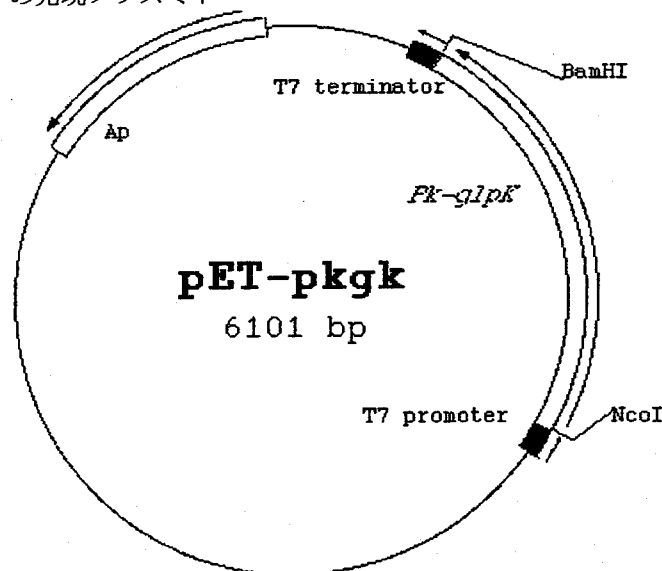
### 1-3-2 アミノ酸配列の比較

Fig.1-1 に、塩基配列から予測される Tk-GK のアミノ酸配列と Ec-GK、*Archaeoglobus fulgidus* の GK、ヒトの GK のアミノ酸配列を比較した。これらのアミノ酸配列は細菌、始原菌、真核生物の代表として選んだものである。Ec-GK のアミノ酸配列が最も Tk-GK と相同性が高く 57%であった。*Archaeoglobus fulgidus* の GK と Tk-GK の相同性は 36%、ヒトの GK と Tk-GK の相同性は 47%であった。Ec-GK において  $Mg^{2+}$ 、ADP、Glycerol の結合する部位を構成するアミノ酸残基 (15) は Tk-GK においても Ile313 を除いて全て保存されていた。Tk-GK のアミノ酸配列中で Glycerol に結合すると予想されるアミノ酸残基は Arg82、Glu83、Trp101、Tyr132、Asp239、Phe264 である。Asp9 と、Asp239 は活性中心で金属イオンが結合するところでもある。ADP が結合するのは、Arg16、Gly260、Gln307、Ala319、Leu374、Ile377、Gly402、Ala403、Asn406 である。大腸菌の GK において、アデニンが結合できる疎水的ポケットを形成している Ile313 は Tk-GK では Val に置換されていた。

### 1-3-3 大量発現及び精製

生化学的特性の解析を行うための Tk-GK の調製を容易にするために、T7 プロモーターで *Tk-glpK* を発現させるプラスミド pET-pkgk を構築した (Fig.1-2)。このプラスミドで大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、アンピシリン耐性を獲得

Fig. 1-2 *Tk-glpK* の発現プラスミド



The localizations and directions of the T7 promoter, *Pk-glpK* gene, T7 terminator, and the  $\beta$ -lactamase gene (Ap) are shown by arrows. The locations of the *NcoI* and *BamHI* sites are also shown. The size of the plasmid is indicated.

させた。IPTG の添加で遺伝子の発現を誘導したところ、目的の蛋白質は菌体内に最も大量に蓄積した (Fig.1-3) 。 Fig.1-3 に示す SDS-PAGE から、蛋白質の生産量は大体 40mg/ml と見積もられた。菌体破碎後の可溶性画分と全菌体を SDS に溶かしたものを SDS-PAGE で比較することにより目的の蛋白質は可溶性画分に存在することが確認された。菌体破碎液からわずか、2 段階の精製過程を踏むだけで 30-40%の収率で目的蛋白質の精製標品が得られた。精製した蛋白質は SDS-PAGE で分子量 55000Da のシングルバンドとして確認された (Fig.1-3) 。

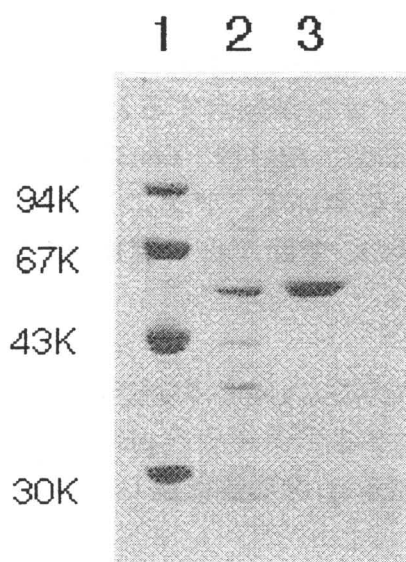


Fig.1-3 SDS-PAGE による Tk-GK の純度検定

Samples were subjected to electrophoresis on a 10 % polyacrylamide gel in the presence of SDS. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, a low molecular weight marker kit (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) containing phosphorylase b (94K), bovine serum albumin (67K), ovalbumin (43K), carbonic anhydrase (30K), trypsin inhibitor (20K), and  $\beta$ -lactalbumin (14K); lane 2, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) transformant with pET-pkgk; lane 3, purified Tk-GK.

#### 1-3-4 生化学的特性

Tk-GK の塩基配列から予想されるアミノ酸配列が正しいかどうか確かめるために、蛋白質の N 末端アミノ酸配列とアミノ酸組成を決定した。N 末端から 10 アミノ酸残基までの配列は MEKFLSLDE で塩基配列からの予想と一致していた。

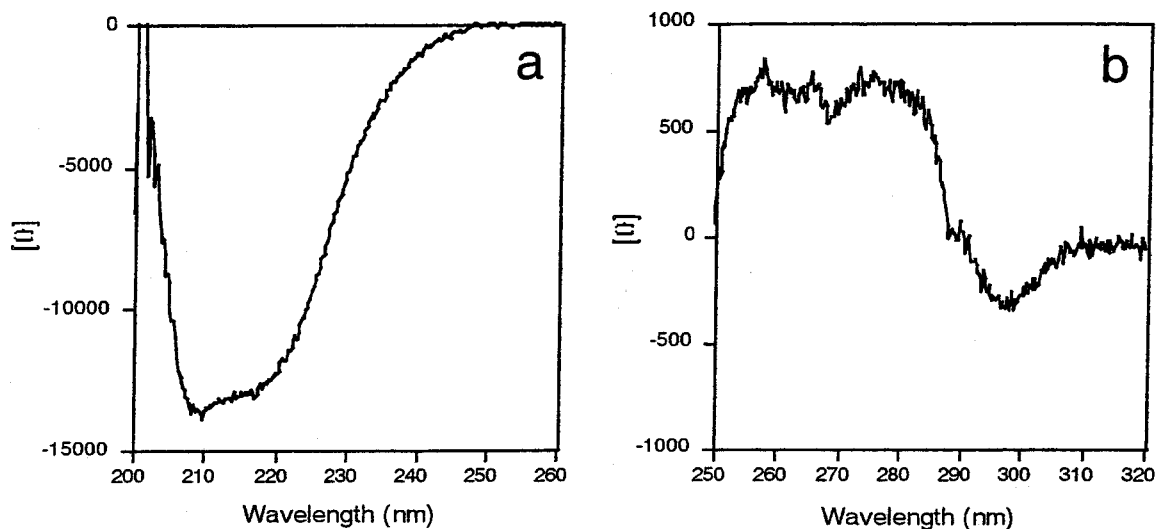
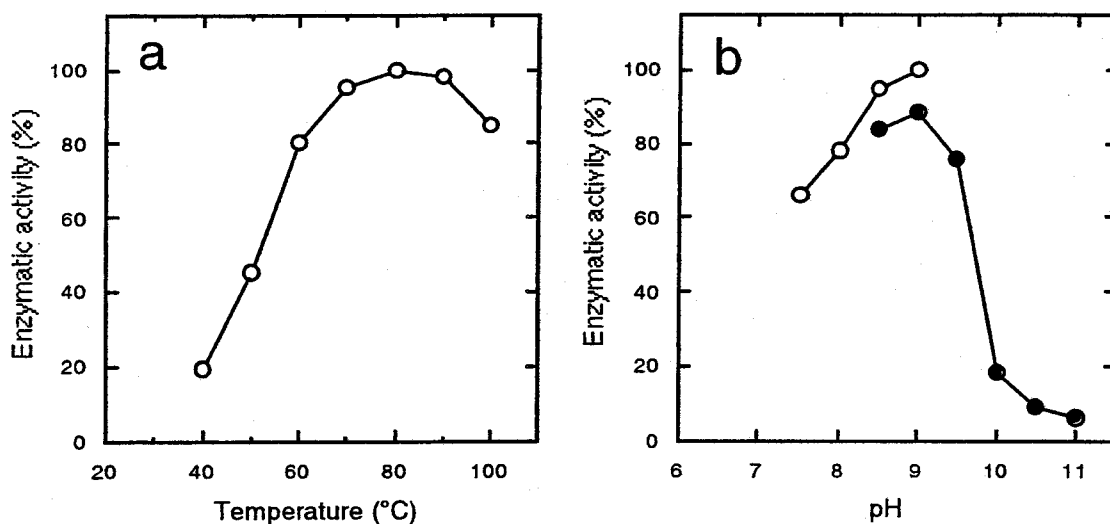


Fig.1-4 Tk-GK の短波長領域 (a) 及び長波長領域 (b) の CD スペクトル

The CD spectra were measured in 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.9) containing 0.5 M NaCl at 30 °C. The mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , is given in units of  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ .

Fig.1-5 Tk-GK 活性の温度依存性 (a) と pH 依存性 (b)



(a) The enzymatic activity was determined in 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0) containing 2 mM  $\text{CoCl}_2$ , 4.6 mM glycerol, and 3.5 mM ATP at the temperatures indicated. The enzymatic activities relative to that determined at 80 °C are shown. (b) The enzymatic activity was determined in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0) (open circle) or 50 mM glycine-NaOH (pH 8.5-11.0) (closed circle) containing 2 mM  $\text{CoCl}_2$ , 4.6 mM glycerol, and 3.5 mM ATP at 80 °C. The enzymatic activities relative to that determined in 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) are shown. In both cases, the amount of glycerol-3-phosphate was colorimetrically determined at 37 °C as described previously (51).

ゲルろ過によって推定した、溶液状態での分子量は 125000Da であった。このことから、本酵素は 2 量体を形成していることが示唆された。短波長の紫外線 CD スペクトルでは波長 210nm に  $\theta$  の極小値 -13600 があり、220nm の  $\theta$ 、-12500 とあわせて幅広い谷が形成されることが観察された (Fig.1-4a)。長波長側では、260nm と 275nm に  $\theta$  の値が 700 の幅広いピークが観察され、さらに 290nm には  $\theta$  値 400 の極小部分が観察された (Fig.1-4b)。Wu らの方法によって蛋白質分子中のヘリックス含有率は 32.5% と計算された (56)。

### 1-3-5 酵素活性

酵素活性の温度依存性、pH 依存性を解析した結果、本酵素の反応至適温度は 80°C (Fig.1-5a)、反応至適 pH は 9.0 (Fig.1-5b) であった。二価の陽イオンが存在しないと活性を示さないことから、本酵素の活性には二価の陽イオンが必要であることが示唆された。最も適当な金属イオンを検索するために、CaCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、SrCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub> などの金属イオン存在下、pH 9.0、温度 80°C で活性を測定した。結果を Table1 にしめす。本酵素の活性は Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> の存在下で最も高い酵素活性を示し、その強さは Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 存在下の場合のおよそ 2 倍であった。その他の金属イオンの存在下では比較的活性が低かったり、なかったりであった。0.5-4mM で金属イオンの濃度を変えて活性を測定したところ、金属イオンの種類に関係なく 1-2mM で最も高い酵素活性を示した。最も高い酵素活性を示す条件は、2.0mM CoCl<sub>2</sub> 存在下 80°C pH9.0 で 450units/mg の活性を示した。0.5M NaCl または KCl の存在下での酵素活性は塩を含まない条件での酵素活性とほぼ同じ値を示したことから、本酵素の活性に塩の存在は影響しないことがわかった。

本酵素の活性測定溶液中の ATP を GTP、CTP、UTP、ITP と置き換えてヌクレオチド三リン酸に対する選択性の広さを二価陽イオンの選択性の広さに加えて検討した。各々 3.3mM GTP、CTP、UTP、ITP で測定した際の活性は 3.5mM ATP で測定した活性の 3.4%、15.9%、12.1%、14.2% であった。この結果から、本酵素は ATP のほかのヌクレオチド三リン酸をリン酸源として利用できることを示唆する。Ec-GK は 4 量体を形成しているときには FBP の阻害を受ける一方で、2 量体を形成しているときには FBP の阻害を受けないということがわかっている (9, 12)。これを踏まえて、Tk-GK の活性における FBP の阻害効果を検討した。20mM FBP の添加によっても酵素の活性は 71% の活性が残っていた。これは、Tk-GK が FBP の阻害を受けていないことを示している。

G-3-P を生産するための Tk-GK の基質は、Glycerol と ATP の二つである。このため、Tk-GK のカイネティックパラメータを決定するためには、二つの基質のうち的一方が過剰量存在するなかで測定した。たとえば、Glycerol に対

する  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を求める際には、ATP の濃度を 2.0mM に固定して、Glycerol の濃度を変化させて活性を測定した。パラメータの測定結果、ATP と Glycerol に対する  $K_m$  値は各々、15.4 $\mu$ mol と 111 $\mu$ mol であった。 $k_{cat}$  は 940 sec<sup>-1</sup> であった。

Table 1-1

The enzymatic activity was determined in 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0) containing various divalent cations, 4.6 mM glycerol, and 3.5 mM ATP at 80 °C. The amount of glycerol-3-phosphate was colorimetrically determined at 37 °C as described previously (51). The relative activities were calculated by dividing the enzymatic activities determined in the presence of various divalent cations by that determined in the presence of the Co<sup>2+</sup> ion.

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	0.6
MgCl <sub>2</sub>	2.0	49.3
CaCl <sub>2</sub>	2.0	4.0
ZnCl <sub>2</sub>	2.0	99.3
CoCl <sub>2</sub>	2.0	100
FeCl <sub>2</sub>	2.0	<0.1
CuSO <sub>4</sub>	2.0	4.0
MnCl <sub>2</sub>	2.0	78.0
NiCl <sub>2</sub>	2.0	57.3
SrCl <sub>2</sub>	2.0	0.3
BaCl <sub>2</sub>	2.0	0.2

### 1-3-6 熱失活

蛋白質濃度 2.7 $\mu$ g/ml の 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) 中で 90°Cあるいは 100°Cで加熱して、Tk-GK の熱に対する不可逆的な熱失活の解析をおこなった。適当な時間加熱したのち、水中で冷却し不可逆的な変性をしなかった酵素の残存活性を測定した。Fig.1-6 に示すように、90°Cでは完全に熱変性に耐性を示した。100°C、30 分の加熱によって 50%の酵素活性が失われるという経時的な残存活性の低下が見られた。Ec-GK は 55°C20 分の熱処理により約 50% の酵素活性を失うので、Tk-GK は明らかに熱安定性が高いといえる。



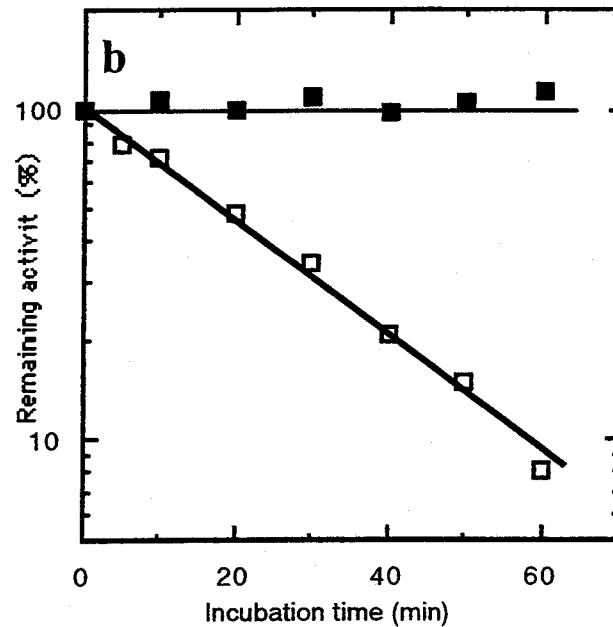
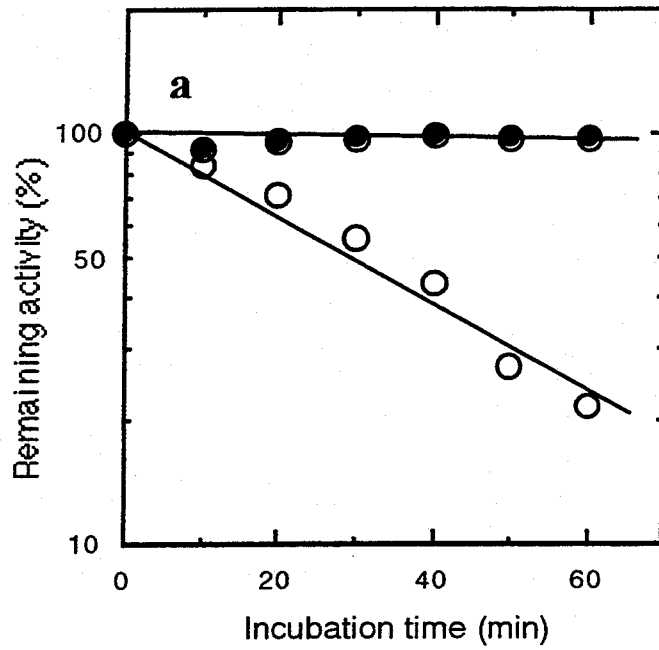


Fig.1-6 Tk-GK の不可逆的熱変性に対する安定性

With appropriate intervals, an aliquot of the enzyme solution was withdrawn and determined for remaining activity. The remaining activity is shown as a function of incubation time. (a) The solution containing Tk-GK at 2.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) was incubated at 90°C (closed circle) or 100°C (open circle). (b) The solution containing Ec-GK at 2.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in same buffer was incubated at 40°C (closed square) or 50°C (open square).

## 1-4 考察

### 1-4-1 組み換え蛋白質の精製

大腸菌からの組み換え Tk-GK の精製収率は 30-40%であった。これは大腸菌からの持ち込み蛋白質を除くために行った熱処理後の沈殿に、50%以上の Tk-GK が抱き込まれてしまっているためであると考えられる。SDS-PAGE の示す結果からも、およそ 50%の Tk-GK が熱処理後の不溶性画分にでてきていることが分かる。Tk-GK は (Fig.1-6) に示すように 90°Cで全く変性しないので、熱処理によって沈殿することはありえないのだが、大腸菌蛋白質が変性して沈殿する際に共沈してしまったことが考えられる。等電点を測定した結果 pI は 4.97 であり Tk-GK は酸性蛋白質であった。そこで、熱処理後の上清を陰イオン交換カラム (MonoQ) に供して精製を行ったところ、80%の収率で精製標品が得られた。

Ec-GK では N 末端の Met 残基が削られているが、Tk-GK の組み換え蛋白質では Met は残っていた。これは、2 番目のアミノ酸残基が Met を削るか否かを決定しているというこれまでの報告 (57) を裏付けている。この報告によれば、N 末端から 2 番目のアミノ酸残基が Ala、Ser、Gly、Pro、Thr、Val であるときに 1 番目のアミノ酸である Met は削られる。一方、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Lys が 2 番目のアミノ酸残基であるときには、Met は削られない。Ec-GK では 2 番目のアミノ酸残基が Thr であるのに対し、Tk-GK では 2 番目のアミノ酸残基が Glu であることは、この報告の通りであることを示している。しかし、天然の Tk-GK が N 末端に Met を持つかどうかは今後確かめる必要のある問題である。

### 1-4-2 Tk-GK の酵素活性

大腸菌の GK の Glycerol に対する Km 値は 1.3 $\mu$ M (58) とか 7 $\mu$ M (11) とか 10 $\mu$ M (8) などと様々に報告されている。また、ATP と酵素の非共同的な相互作用があるため、ATP に対する Km 値は 2 つ存在しその値は、ATP の濃度が低いときと高いときとでは、それぞれ 60 $\mu$ M、900 $\mu$ M(11)もしくは 80-100 $\mu$ M と 400-500 $\mu$ M (8) であると報告されている。ATP の濃度が 4mM であるとしている Hayasi と Lin の報告 (58) は、ATP の濃度が高い場合の値であると考えられる。興味深いことに、Tk-GK は ATP に対して非共役的な相互作用を行っていないようである。本酵素の ATP に対する Km 値は 15.4 $\mu$ M で大腸菌の値よりも小さい。これは、ATP と酵素の結合が、Tk-GK では Ec-GK よりも強いということを表わしている。一方 Glycerol に対する Km 値は 111 $\mu$ M と大腸菌のものよりも大きく、結合力が弱いことを示している。サブユニット構造の違いや活性部位のコンホメーションの違いがこれらの酵素の結合親和力の

差に関係していると考えられる。

Tk-GK の比活性 (450units/mg) は Ec-GK の比活性 1004units/mg (8) と比較しうる範囲にあるので、Tk-GK の 80°Cでの活性と Ec-GK の温和な条件での活性の効率は良く似ているといえる。酵素分子の部分的な不安定さが活性部位のコンホメーションを多様化し酵素としての機能を有効なものとしている (59-61)。このことから、80°Cにおける Tk-GK の構造柔軟性と、Ec-GK の温和な温度での構造柔軟性はよく似ているのではないだろうか。Tk-GK の活性が 40°C で低い (Fig.1-5a) のは Tk-GK が低い温度では安定であり過ぎるために活性に必要な柔軟性を失うためではないかと考えられる。

大腸菌の GK はリン酸の供給源として ATP しか利用できないことが分かっている (58)。それに対し Tk-GK は、ATP を用いた場合に比べて低いものの ATP 以外のヌクレオチド三リン酸をリン酸源として活性を示すことが分かった。Ec-GK の活性部位で adenine が結合する疎水的ポケットを形成するアミノ酸残基は 313 番目の Ile が Tk-GK では Val に置換されている以外は完全に保存されている。このアミノ酸残基が Tk-GK の ATP に対する特異性の低さに関係しているのかもしれない。Tk-GK の他にも rat の肝臓由来 GK (62) や *Candida mycoderma* (63) 由来 GK で ATP 以外のヌクレオチド三リン酸が利用されることが分かっている。しかしながら、これらの酵素のアミノ酸配列に関する情報は報告されていないので、これらの酵素においても 313 番目のアミノ酸が Val に置換されているかどうかについてはわからない。

1mM の EDTA 存在下でも活性を有する、*Thermus flavus* の GK (64) を除いて、全ての GK は活性に 2 価の金属イオンを要求する。大腸菌においては、Mg<sup>2+</sup> イオンが最も適した金属イオンであり、Mn<sup>2+</sup> イオンだけがこれに変わり、GK を活性化しうるということが分かっている (58)。一方、Tk-GK は、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> イオンによって活性化されることが分かった。*T. kodakaraensis* KOD1 から分離された蛋白質は、幅広い金属イオンの特異性を示すことがある (24, 65)。これは超好熱菌の蛋白質の特徴の一つかもしれない。

Tk-GK は FBP の阻害に対して比較的耐性がある。これは Tk-GK が 2 量体を形成しているためである。FBP は 4 量体のみを阻害することはすでに Ec-GK において報告されている (9, 12)。これまでに超好熱菌から IIA<sup>glc</sup> の遺伝子や蛋白質は単離されておらず IIA<sup>glc</sup> が Tk-GK を阻害するか否かは分からない。全ゲノムの塩基配列が決められた、*Archaeoglobus fulgidus* においても IIA<sup>glc</sup> のホモログを同定することはできなかった。

### 1-4-3 Tk-GK の安定性

Tk-GK は高い安定性と高温環境に適した酵素機能を有するうえ、大腸菌のアミノ酸配列と高い相同性を有する事から、両者は機能を比較研究して超高温性の蛋白質がどのような機構によって安定化しているか調べるのに、理想的なペアであると思われる。超好熱菌から単離された Glutamate dehydrogenase (66, 67) と indole-3-phosphate synthase (68) の結晶構造をそれぞれ対応する常温性の同種蛋白質の構造と比較したところ、イオンペア (イオンペアネットワーク) の数の増加と分子内空孔の体積の減少が高い安定性と関係していることがわかった。一般的に高温環境から分離された蛋白質は分子の表面に余分なイオンペアを有していることが知られている (69, 70)。Tk-GK のイオンペアの数が大腸菌の GK に比べて増えているかどうかを、調べるために立体構造のモデルを作って Ec-GK の立体構造と比較した (Fig.1-7)。Tk-GK の主鎖の構造は、Ec-GK とアミノ酸配列が良く似ているので Ec-GK の立体構造をもとに予測した。実際、短波長 UV CD スペクトルの測定結果から算出した Tk-GK 立体構造中のヘリックス含有率 32.5%は、大腸菌の結晶構造解析から決められたヘリックス含有率 36.3% (15) と非常に近い値をとっている。両者の構造を比較した結果、Tk-GK の表面にはイオンペアもしくはイオンペアネットワークを形成している荷電アミノ酸残基が、Ec-GK よりも多く存在していた (Fig.1-7)。この結果は、Tk-GK 分子を構成している荷電アミノ酸残基の数が Ec-GK のものよりも多いという結果と矛盾しない。塩基性アミノ酸残基 (Lys, Arg) の含有量は Tk-GK では 12.1%であるのに対して Ec-GK では 10.6%、酸性アミノ酸残基 (Asp, Glu) の数は Tk-GK では 15.3%であるのに対して Ec-GK では 13.3%であった。同様の傾向は *A. fulgidus* 由来の GK とヒト由来 GK にも見られた。荷電アミノ酸残基の含有量は *A. fulgidus* 由来の GK では 27.8%、ヒト由来 GK では 19.2%であった。Barlow と Thornton の方法 (71) によって立体構造モデルから算出した全ての分子内イオンペアの内 Tk-GK または Ec-GK のどちらか一方にのみ見られるイオンペアについて各々 Table1-2 および Table1-3 に記述している。Tk-GK では 24 の独自のイオンペアと 9 のイオンペアネットワークが形成されているのに比べて、大腸菌の GK では独自のイオンペアは 9 でイオンペアネットワークは 3 だけしか形成されていなかった。18 のイオンペアは両者に保存されていた。このようにイオンペアの数の増加が構造の安定化に効いていると考えられる。

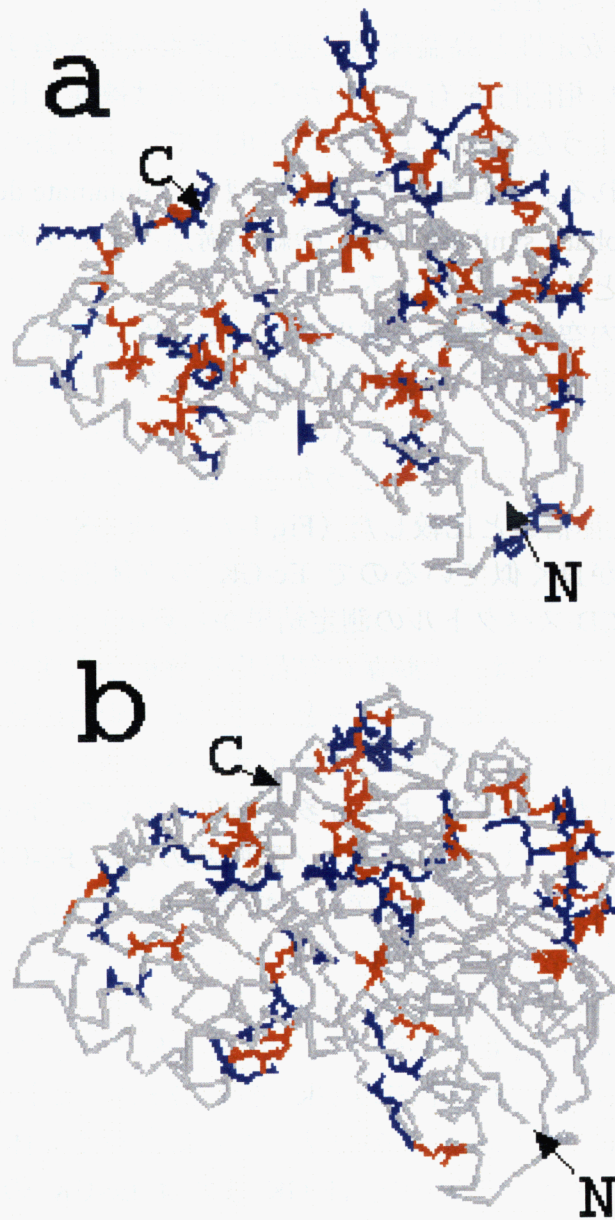


Fig.1-7 Tk-GK の3次構造モデル（上）とEc-GK の結晶構造（下）の比較

A model for the backbone structure of *Pk*-GK (a) and the backbone structure of *E. coli* GK (b), which has been determined by Hurley *et al.* (15), are drawn with the program RasMol. The side chains of the basic and acidic amino acid residues are shown in blue and red, respectively. “N” and “C” represent the NH<sub>2</sub>- and COOH-termini of the molecules. The crystal structure of *E. coli* GK is deposited in the Protein Data Bank with the accession number 1GLB.

**Table 1-2**  
Intramolecular ion pairs ( $\leq 4.0$  Å)\*

Conserved**	Tk-GK	Ec-GK
Arg <sup>17</sup> -Asp <sup>10</sup>	Arg <sup>22</sup> -Glu <sup>23</sup>	Arg <sup>33</sup> -Glu <sup>62</sup>
Arg <sup>83</sup> -Glu <sup>303</sup>	Arg <sup>22</sup> -Glu <sup>450</sup>	His <sup>114</sup> -Glu <sup>110</sup>
Arg <sup>106</sup> -Asp <sup>133</sup>	Arg <sup>67</sup> -Glu <sup>69</sup>	Arg <sup>125</sup> -Glu <sup>121</sup>
Arg <sup>107</sup> -Glu <sup>46</sup>	Lys <sup>122</sup> -Glu <sup>123</sup>	Arg <sup>156</sup> -Glu <sup>153</sup>
Lys <sup>116</sup> -Glu <sup>113</sup>	Lys <sup>124</sup> -Asp <sup>195</sup>	Arg <sup>211</sup> -Asp <sup>198</sup>
Lys <sup>142</sup> -Asp <sup>146</sup>	Lys <sup>124</sup> -Asp <sup>197</sup>	Arg <sup>361</sup> -Glu <sup>497</sup>
Arg <sup>152</sup> -Asp <sup>146</sup>	Lys <sup>139</sup> -Glu <sup>112</sup>	Arg <sup>389</sup> -Glu <sup>393</sup>
Arg <sup>152</sup> -Asp <sup>208</sup>	Lys <sup>154</sup> -Glu <sup>150</sup>	Arg <sup>407</sup> -Glu <sup>431</sup>
Arg <sup>154</sup> -Glu <sup>90</sup>	Arg <sup>169</sup> -Glu <sup>49</sup>	Arg <sup>482</sup> -Glu <sup>478</sup>
Arg <sup>154</sup> -Glu <sup>159</sup>	Lys <sup>190</sup> -Glu <sup>123</sup>	
Arg <sup>188</sup> -Glu <sup>84</sup>	Lys <sup>191</sup> -Asp <sup>193</sup>	
Arg <sup>188</sup> -Glu <sup>303</sup>	His <sup>318</sup> -Glu <sup>321</sup>	
Arg <sup>218</sup> -Glu <sup>216</sup>	Lys <sup>328</sup> -Glu <sup>367</sup>	
Arg <sup>218</sup> -Glu <sup>222</sup>	Arg <sup>382</sup> -Glu <sup>471</sup>	
Arg <sup>317</sup> -Asp <sup>318</sup>	Lys <sup>395</sup> -Glu <sup>396</sup>	
Arg <sup>378</sup> -Glu <sup>382</sup>	Arg <sup>419</sup> -Glu <sup>389</sup>	
Arg <sup>432</sup> -Glu <sup>467</sup>	Lys <sup>420</sup> -Glu <sup>396</sup>	
Lys <sup>487</sup> -Asp <sup>390</sup>	Arg <sup>423</sup> -Asp <sup>407</sup>	
	Arg <sup>449</sup> -Asp <sup>447</sup>	
	Arg <sup>459</sup> -Asp <sup>407</sup>	
	Lys <sup>464</sup> -Glu <sup>462</sup>	
	Arg <sup>470</sup> -Glu <sup>471</sup>	
	Lys <sup>482</sup> -Glu <sup>479</sup>	
	Arg <sup>483</sup> -Glu <sup>479</sup>	

\*The ion pairs formed in *Pk*-GK are hypothetical, because the distance between two ionic residues was calculated according to a model for three-dimensional structure of the enzyme. The conserved ion pairs, as well as the ion pairs that are formed only in *Pk*-GK or *E. coli* GK are listed.

\*\*The ion pairs formed in *E. coli* GK are listed as representatives for those formed in common. All of these residues, except for Arg<sup>154</sup> and Glu<sup>90</sup> which are replaced by Lys<sup>151</sup> and Asp<sup>89</sup> in *Pk*-GK, respectively, are conserved in *Pk*-GK.

**Table 1-3**  
Intramolecular ion-pair networks ( $\leq 4.0$  Å)

Tk-GK	Ec-GK
Arg <sup>82</sup> -Glu <sup>296</sup> -Arg <sup>183</sup> -Glu <sup>83</sup>	Arg <sup>83</sup> -Glu <sup>303</sup> -Arg <sup>188</sup> -Glu <sup>84</sup>
Glu <sup>112</sup> -Lys <sup>139</sup> -Asp <sup>143</sup> -Arg <sup>149</sup> -Asp <sup>203</sup>	Lys <sup>142</sup> -Asp <sup>146</sup> -Arg <sup>152</sup> -Asp <sup>208</sup>
Asp <sup>89</sup> -Lys <sup>151</sup> -Glu <sup>156</sup>	Glu <sup>90</sup> -Arg <sup>154</sup> -Glu <sup>159</sup>
Glu <sup>23</sup> -Arg <sup>22</sup> -Glu <sup>450</sup>	
Lys <sup>122</sup> -Glu <sup>123</sup> -Lys <sup>190</sup>	
Arg <sup>382</sup> -Glu <sup>471</sup> -Arg <sup>470</sup>	
Lys <sup>395</sup> -Glu <sup>396</sup> -Lys <sup>420</sup>	
Glu <sup>458</sup> -Arg <sup>423</sup> -Asp <sup>407</sup> -Arg <sup>459</sup>	
Lys <sup>482</sup> -Glu <sup>479</sup> -Arg <sup>483</sup>	

The ion-pair networks that are formed in *Pk*-GK or *E. coli* GK are listed.

耐熱性の蛋白質が常温性の蛋白質よりも多くの Pro 残基をループ構造中にもっていることはこれまでも報告されている (71, 72)。実際、大腸菌の RNaseHI の  $\alpha$ ヘリックスと  $\beta$ シートの間の 62 番目の His は *T. thermophilus* の RNaseHI では Pro に置換されているが、この Pro は *T. thermophilus* の RNaseHI の安定化に寄与すると考えられている (73, 74)。Matthews らの報告 (75) によれば  $\beta$ シートやターン構造、ループ構造中の Pro 残基以外のアミノ酸から Pro 残基への置換は変性状態のエントロピーを下げることから蛋白質の構造を安定化する。Tk-GK と Ec-GK は各々 15 と 14 の Pro 残基を持っている。Tk-GK と Ec-GK のアミノ酸配列 (Fig.1-1) を比較すると 11 の Pro 残基は両者に保存されていたが、Tk-GK にのみ見られる 4 つの Pro 残基のうち 3 つ (Pro35, Pro70, Pro146) は各々  $\beta$ 3 と  $\beta$ 4、 $\alpha$ A と  $\beta$ 6、 $\alpha$ D と  $\alpha$ E の間のループ構造中に存在していた。Ec-GK の対応するアミノ酸はそれぞれ Glu36、Ser71、Glu149 であった。それに対し、Ec-GK では Tk-GK の Leu287 にあたる Pro294 だけがループ構造中に存在していた。従って、これらの Pro 残基が Tk-GK の安定化に寄与する可能性も示唆された。

#### 1-4-4 Tk-GK のサブユニット構造

Ec-GK は 0.01mg/ml 以下の低濃度では 2 量体と 4 量体の平衡状態にあり、0.1mg/ml 以下の濃度では 4 量体で存在することが報告されている (10)。Ec-GK の 4 量体の結晶構造 (15) を Fig.1-8 に模式的にしめした。GK にはサブユニット O-X、O-Y、O-Z 界面での 3 種類のサブユニット間相互作用が存在する。O-Y による相互作用によって各々のサブユニットの溶媒との界面が分子内に埋ること、Y サブユニットの Arg369 (Tk-GK では Arg362) 残基の側鎖が O サブユニットに深く突き刺さっていることから、4 量体と 2 量体の平衡は 4 量体が O-Y の 2 量体に分かれることによって起こっていると考えられている (15)。

しかし、本研究においてアガロースゲルビーズによるゲルろ過で Tk-GK の溶液中の会合状態を決定したところ、Tk-GK は、0.5mg/ml 以上の濃度でも 2 量体で存在していた。同じ条件で Ec-GK の会合状態を決定したところ、Tk-GK と同様の結果となった。これは、本来なら 4 量体を形成するのに必要なサブユニット界面の内、結合力の弱い O-X、O-Z 界面の相互作用が、本研究の条件下ではさらに弱められてしまったためではないかと考えられる。

Tk-GK と Ec-GK のアミノ酸配列 (Fig.1-1) を比較すると O-Y の界面部分に相当するアミノ酸領域 (Ec-GK の 341-347、361-367) は Tk-GK でも良く保存されていた。O-X の界面部分に相当するアミノ酸領域 (Ec-GK の 49-68) と、O-Z の界面部分に相当するアミノ酸領域 (Ec-GK の 321-333) はあまり保存されていなかった。また、Ec-GK における Ala65 $\rightarrow$ Thr、Asp72 $\rightarrow$ Asn の変異が 4

量体と2量体の平衡を2量体側にシフトすること(12)、Tk-GKではこれらのアミノ酸残基はGln(Gln64)とAsn(Asn71)に置き換わっていることから、Tk-GKはEc-GK同様、O-Yの2量体を形成していると考えられる。

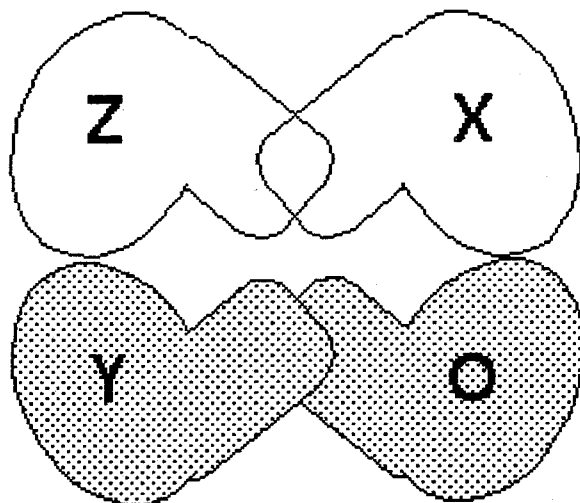


Fig.1-8 Ec-GK の4次構造の模式図

The subunit-subunit interactions in the tetrameric structure of *E. coli* GK are schematically shown. The subunits, X, Y, and Z are related to the subunit O by a two fold rotation about the X, Y, and Z axes, respectively. The active-site of each subunit is designated by a solid square. The dimeric structure (O-Y dimer) shaded is expected to represent that of Tk-GK.

#### 1-4-5 *glp* Regulon

大腸菌の染色体DNAにおいては、5つのオペロンがGlycerol regulon (*glp*)を構成している(76)。*glpK*は、細胞膜でGlycerolの取り入れを促す膜蛋白質をコードしている*glpF*とともに、このオペロンの一つである*glpFK*オペロンを構成している。この*glpFK*オペロンは*Bacillus subtilis*染色体DNA上でも見つかっている(77)。しかし、*Tk-glpK*の上流領域では*glpF*は存在していないことがわかった。代わりにGlycerophosphodiester phosphodiesteraseに相動的な蛋白質をコードする遺伝子が存在していた。大腸菌と*B. subtilis*染色体DNA上ではGlycerophosphodiester phosphodiesteraseをコードしている*glpQ*はGlycerol-3-phosphate permease(76, 78)をコードしている*glpT*とともに*glpTQ*オペロンを形成している。このことから、*T. kodakaraensis* KOD1のGlycerol代謝経路を構成する遺伝子の構造が、大腸菌や*B. subtilis*とは異なっていると考えられる。



#### 1-4-6 診断薬としての GK の利用

GK は診断薬として血清中の中性脂肪や膵臓からのリパーゼの解析に使われている。この解析ではリパーゼによって中性脂肪が分解してできた、Glycerol の量を GK、GPO、PO の触媒活性を利用して比色定量して行っている。Tk-GK はこれまで単離されている GK の中で最も耐熱性の高い GK であるといえる。*Thermus flavus* からも耐熱性の GK が単離されているが、70°C、30 分の加熱によって 80%の活性が失活してしまうことがわかっている (67)。熱に対する安定性が高く、長期保存でも失活しにくいことから、Tk-GK は前述の解析に最も適した酵素であると考えられる。

## 第 2 章

### 部位特異的変異法による Tk-GK 型イオンペアの大腸菌 GK (Ec-GK) への導入

#### 2-1 背景

第 1 章で、超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 由来の glycerol kinase (Tk-GK) は大腸菌由来の glycerol kinase (Ec-GK) と比べて非常に高い熱安定性を有しており、また、構造が良く似ている事を示した (79)。Ec-GK の立体構造に基づいて Tk-GK の立体構造モデルを作成すると Tk-GK の分子表面において荷電アミノ酸残基の数が増加していることがわかった。これらの荷電残基の多くは互いに対になる電荷のアミノ酸側鎖を 4Å 以内に有しており、これらの荷電側鎖が静電的引力によるイオンペアを形成している事が示唆されている。Tk-GK と Ec-GK の分子表面におけるイオンペアの数を比較すると、Ec-GK に特異的なイオンペアが 9 つであるのに対し Tk-GK に特異的なイオンペアの数は 24 であった。また、18 のイオンペアは両者に共通していた (Table1-2)。イオンペアの形成が蛋白質の立体構造の安定性の保持に貢献している可能性が、これまでに好熱菌蛋白質において報告されているが、一方では分子表面の荷電残基が水和するのに必要なエネルギーとイオンペアを形成する事によるエネルギーの収支は安定化に不利であると主張されてもいる (75)。これに対し、3 残基以上のアミノ酸側鎖が関与するイオンペアネットワークの形成は、側鎖の水和エネルギーを差し引いても、なお安定化に貢献できると考えられている。Tk-GK と Ec-GK の分子表面におけるイオンペアのいくつかは、互いに引き合ってイオンペアネットワークを形成している。Ec-GK ではその数が 3 つであるのに対し Tk-GK では 9 つのイオンペアネットワークが形成されていることがこれまでの研究により明らかにされている (Table1-3)。Tk-GK に特異的に見られるイオンペアネットワークの安定化効果を立証するために、部位特異的変異によって Tk-GK のイオンペアネットワークを Ec-GK に導入し、変異酵素の安定性を試験した。

## 2-2 方法と結果

### 2-2-1 細胞とプラスミド

pET28a は Novagen 社から供給を受けた。Tk-GK を大量発現させるために構築した pET-pkgk は第 1 章で構築した(79)。*E. coli* JM109[recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, SupE44, relA1, λ-, Δ(lac-ProAB)/F', traD36, ProA+B+, lacIqZΔM15.] とプラスミド pUC19 は Toyobo Co., Ltd. から、遺伝子発現のための *E. coli* BL21(DE3)[F-, ompT, hsdSB(rB-mB-), gal, dcm(DE3)]は Novagen 社から購入した。

### 2-2-2 部位特異的変異遺伝子の構築

Ec-GK 遺伝子は約 1500bp より成る。部位特異的変異を導入しやすいように、Ec-GK の遺伝子にサイレントミューテーションでユニークな *Bam*HI、*Sph*I、*Xba*I サイトを導入した (Fig.2-1)。次に Fig.2-1 に示す箇所に overlap extension 法で変異を導入した。変異の導入された DNA 断片は一旦 pUC19 にクローニングしたのち、塩基配列の決定を行って変異の導入を確認した。pUC19 から適当な制限酵素で断片を切り出し、発現プラスミド上にあらかじめクローニングされた Ec-GK 遺伝子の対応する制限酵素サイト間に導入した。

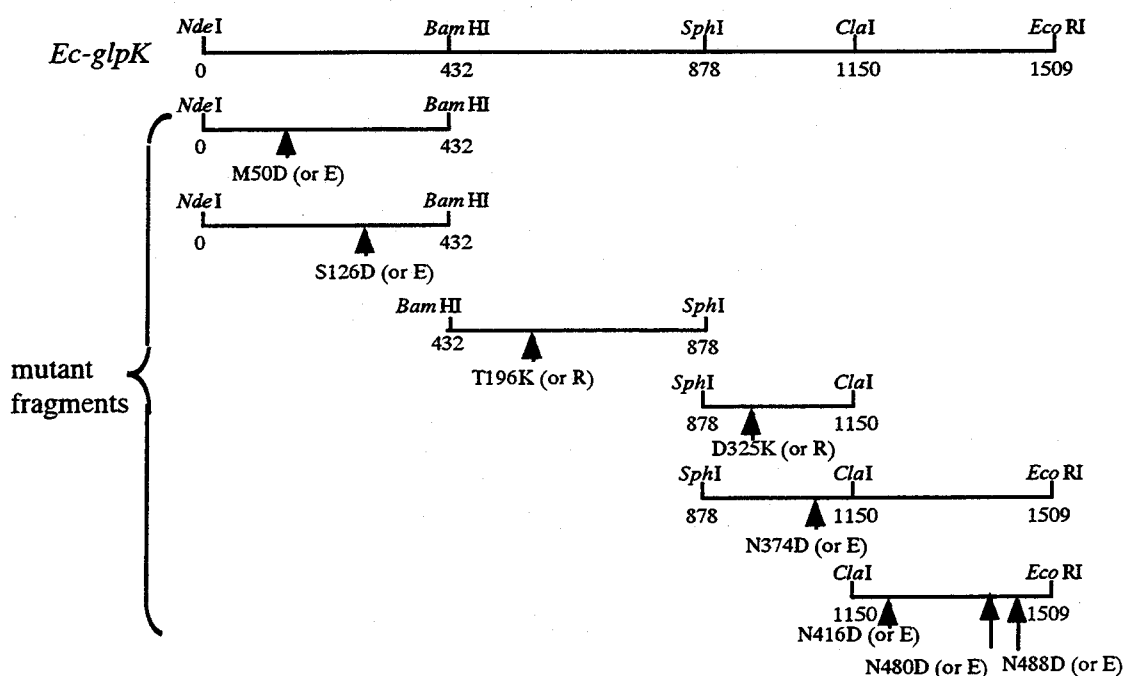


Fig.2-1 カセットによる変異 Ec-GK の変異構築箇所

### 2-2-3 変異酵素の大量発現と精製

構築した変異 GK 遺伝子発現プラスミドで *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。得られた形質転換体は 30mg/l のカナマイシンを含む LB 培地を用いて、37°C で培養した。培養液の OD<sub>600</sub> が 0.6 に達した時 IPTG を終濃度が 1mM になるよう

に加え、さらに 6 時間培養した。培養菌体は  $6000\times g$ 、10 分の遠心分離で集菌し、 $300\text{mM}$  の  $\text{NaCl}$  と  $10\text{mM}$  イミダゾールを含む  $50\text{mM}$  リン酸ナトリウムバッファー ( $\text{pH}8.0$ ) で懸濁、超音波による破碎、 $15,000\times g$ 、30 分の遠心分離にかけた。組み換え蛋白質を含む上清を Ni-NTA agarose カラムに供した。Ni-NTA への目的蛋白質の結合と溶出は QIAGEN 社のマニュアルに従った。純粋な目的蛋白質を含む画分を集め、 $300\text{mM}$   $\text{NaCl}$  を含む  $50\text{mM}$  Tris-HCl バッファー ( $\text{pH}8.5$ ) で透析したものを生化学的な特性の解析に使用した。蛋白質の精製度は Coomassie Brilliant Blue で染色した  $12\%$ SDS-PAGE によって確認した。Tk-GK と Ec-GK の濃度は UV の吸光度から算出した。Tk-GK の  $A_{280}^{0.1\%}$  は 1.7 とし、Ec-GK の  $A_{280}^{0.1\%}$  は 2.2 とした。

#### 2-2-4 活性測定

活性測定は第 1 章に示したように 2 段階の方法で行った (79)。まず、 $2.0\text{mM}$  の  $\text{CoCl}_2$  もしくは  $\text{MgCl}_2$ 、 $2.0\text{mM}$  の ATP、 $3.0\text{mM}$  glycerol を含む  $100\text{mM}$  HEPES バッファー ( $\text{pH} 8.0$ ) に酵素を加え 10 分間、各温度で保温する。反応は終濃度が  $10\text{mM}$  になるように EDTA を加えて停止した。反応溶液中の glycerol-3-phosphate を glycerol-3-phosphate oxidase と peroxidase を使った比色定量法で測定して酵素活性を算出した。酵素活性は一分間に  $1\mu\text{mole}$  の glycerol-3-phosphate を生産する酵素量を 1 ユニットと定義した。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 変異遺伝子の設計

Ec-GK に導入するイオンペア及びイオンペアネットワークは Tk-GK に特異的なものの内、点変異で導入可能でかつ他の好熱性 GK においても形成される傾向の有るものを 8 種類 (イオンペア 4 つ、イオンペアネットワーク 4 つ) 選びだした (Table2-1)。各変異箇所、イオンペアを形成するのに必要と考えられる電荷を持ったアミノ酸残基への置換変異を設計した。酸性残基なら Asp と Glu、塩基性残基なら Lys、Arg にそれぞれ置換し、変異箇所 1 箇所に対し 2 種類ずつの変異 Ec-GK を作成した。Ec-GK の遺伝子にはサイレントミューテーションによってユニークな制限酵素サイトを 3 ケ所作っておき、これらの制限酵素サイト間の DNA 断片を変異断片と繋ぎ変えて変異遺伝子を構築した (Fig.2-1)。

Table 2-1 Tk-GK と Ec-GK のイオンペアの比較と変異構築部位

Tk-GK	Ec-GK	変異構築部位
R382-E471-R470	R389-N480-R479	N480→D,E
K482-E479-R483	K491-K488-R492	K488→D,E
K122-E123-K190	R125-S126-H195	S126→D,E
E458-R423-D407-R459	E467-R432-N416-R468	N416→D,E
E49-R169	M50-K172	M50→D,E
K191-D193	T196-D198	T196→K,R
H318-E321	D325-D328	D325→K,R
K328-E367	K335-N374	N374→D,E

### 2-3-2 変異酵素の発現と精製

Ec-GK の野生型および変異型は容易に精製できるように N 末端に His-tag を付加した形で発現させた。合計 16 種類の変異のうち Ser126 を Asp に置換した Ec-S126D と Lys488 を Asp に置換した Ec-K488D の 2 種類については可溶性画分として精製する事ができなかったが、すべての変異箇所につき少なくとも一つの変異酵素を得る事ができた。これらの酵素を Ni-NTA agarose で精製し、SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。Asn374 を Asp または Glu に置換した Ec-N374D と Ec-N374E、Asn 416 を Glu に置換した Ec-N416E を除き、これらの精製酵素の比活性は概ね野生型と同様であった (Table2-2)。

Table 2-2 変異 Ec-GK の比活性

The enzymatic activity was determined in 0.1 M HEPES buffer (pH8.0) containing 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.0mM ATP, and 3.0mM glycerol for 10 min at 30°C. The amount of glycerol-3-phosphate in the reaction mixture was then determined colorimetrically at 30°C by coupled enzymatic reaction catalyzed by glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase.

酵素	U/mg	%
野生型	62.5	100
M50D	68.4	109
M50E	71.8	115
S126E	68.0	109
T196K	78.3	125
T196R	72.9	117
D325K	65.9	105
D325R	67.5	108
N374D	54.5	87.2
N374E	40.2	64.3
N416D	30.0	48.0
N416E	62.0	99.2
N480D	68.8	110
N480E	83.0	133
K488E	67.9	109

### 2-3-3 熱安定性の評価

Ec-GK は通常の条件では熱変性させると不可逆的に変性してしまうため、CD による一般的な熱変性曲線をとって安定性を評価する事ができない。そこで、本研究では熱処理後の残存活性の比較で変異酵素の熱安定性を評価した (Table.2-3)。残存活性の結果から、変異箇所が同じ場合、置換したアミノ酸の種類が異なっても安定性はほぼ同じである事が分かった。また、Asn374 を Asp または Glu に置換した Ec-N374D と、Ec-N374E、Lys488 を Glu に置換した Ec-K488E、は残存活性が低く野生型 Ec-GK よりも不安定であることが示された。Asn416 を Asp または Glu に置換した Ec-N416D と、Ec-N416E、Glu325 を Lys または Arg に置換した Ec-D325K と、Ec-D325R、の 4 種類は、野生型 Ec-GK と同程度の残存活性を示した。Thr196 を Lys または Arg に置換した Ec-T196K と、Ec-T196R、Asn480 を Asp または Glu に置換した Ec-N480D と、Ec-N480E は、同一箇所に変異を導入した酵素がともに Ec-GK よりも少しだけ安定であった。D325、N374、N416、K488、の変異は、いずれも分子表面に存在しており、変異による立体障害で構造を大きく崩すような事はないと考えられる。しかるに、これだけ安定性が下がる背景には、蛋白質分子のアミノ酸側鎖を取り巻く環境が電氣的相互作用のみならず、実に多岐に渡っているために、予測できない相互作用が働き、構造の不安定化にひきおこしたのではないかと推測される。

Table 2-3 変異 Ec-GK の残存活性

After 30 min incubation, an aliquot of the enzyme solution was withdrawn and determined for remaining activity. The solution containing Ec-GK or mutant Ec-GK at 20 $\mu$ g/ml in same buffer was incubated at 55  $^{\circ}$ C.

酵素	残存活性
野生型	13%
M50D	2%
M50E	1%
S126E	14%
T196K	22%
T196R	23%
D325K	13%
D325R	11%
N374D	2%
N374E	3%
N416D	11%
N416E	11%
N480D	17%
N480E	19%
K488E	5%

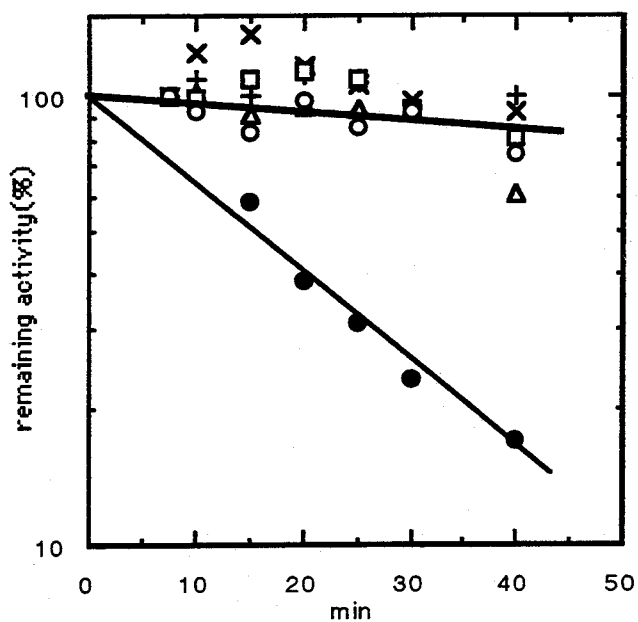


Fig.2-2 2重変異酵素残存活性の比較

Stability against heat inactivation. Semilog plots of the remaining activity *versus* the incubation time are shown. Ec-GK and mutant GK were incubated in 20 mM Tris-HCl (pH7.5) at 45 $^{\circ}$ C. Symbols: Ec-GK (open circle), Ec-T196K (open square), Ec-T196R (open triangle), Ec-N480D (cross), Ec-N480E (X), Ec-T196K/N480D (closed circle).

#### 2-3-4 2重変異酵素構築と評価

T196、N480の2ヶ所への変異がEc-GKをわずかであるが安定化したことから、これらの変異を両方導入した2重変異酵素、Ec-T196K/N480Dを構築しその残存活性を測定した(Fig.2-2)。これによると、一重変異酵素並びに野生型酵素の残存活性は、それほど大きく変化しないのに対し、2重変異酵素Ec-T196K/N480Dでは、経時的な残存活性の低下が観察され野生型やその他の変異酵素と比べて明らかに安定性が低下していることが示された。この2重変異酵素は一重変異酵素の個々の効果を生かしてより強い安定化効果を期待して作ったものであったが、シングルミューテーションの安定化効果を示唆する様な結果は得られなかった。GKは触媒反応中にドメインモーションして比較的大きく揺らぐ酵素である事がこれまでの研究から指摘されている。従って、この変異を組み合わせることにより、Ec-GKの安定性が大きく低下したのは、不測の相互作用が置換箇所に生じ、その結果、このようなドメインモーションが著しく損なわれたためかも知れない。以上の結果は、たとえTk-GKのアミノ酸配列を参考にしたとしてもEc-GKの耐熱性を向上させる変異をデザインすることは大変難しいことを示唆する。



## 第3章

### DNA shuffling による Tk-GK と Ec-GK のキメラ酵素の作成 と熱安定性解析

#### 3-1 背景

通常、好熱菌由来の蛋白質はその常温性のホモログに比べて安定である。しかしながら、熱安定性蛋白質の安定化メカニズムについては多くの謎が残されている。DNA shuffling はランダムに組み換えた遺伝子のライブラリーを *in vitro* で構築するための使い勝手の良い方法であると言える (80, 81)。この方法は主に指向性進化によって蛋白質の機能を改良するためにしばしば使われている (82-84)。また、相同性の高い二つの遺伝子のランダムなハイブリッドを構築する事もできる (85)。もし、適当な選択系が存在すれば、DNA shuffling を使って、好熱菌由来蛋白質と常温菌由来蛋白質の安定性の違いに関係するアミノ酸置換を同定したり、限定したりすることができる。熱安定性蛋白質とその常温性ホモログの遺伝子をランダムに融合して構築したキメラ蛋白質の安定性解析を行えば、熱安定性蛋白質の高温環境への適応機構に関する様々な情報が得られると考えられる。特に第2章で述べたように、Tk-GK と Ec-GK の耐熱性の違いをもたらすアミノ酸置換を部位特異的変異法により同定することが困難な場合はこの方法が有効である。

Tk-GK と Ec-GK は基本的なアミノ酸主鎖の構造が似ていると考えられるため、shuffling によるキメラ酵素の構築に適している。

本研究では、Tk-GK と Ec-GK をコードしている遺伝子のキメラ遺伝子のライブラリーを DNA shuffling によって構築し、Ec-GK よりも熱安定な酵素をコードしている遺伝子をスクリーニングした。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 材料

MacConkey Agar は Difco から購入した。glycerol-3-phosphate oxidase と peroxidase は Toyobo Co., Ltd から頂いた。

### 3-2-2 細胞とプラスミド

pET28a は Novagen 社から購入した。Tk-GK を大量発現させるために構築した pET-pkgk は第 1 章で構築した (79)。Ec-GK 遺伝子を欠失した宿主大腸菌 *E. coli* DG1[ara, Δ(lac-ProAB), rpsL, Φ80 lacZΔM15, hsd R( $r_k^-$ ,  $m^{k+}$ ), Glc<sup>-</sup>] (12) は Dr.D.W.Pettigrew から分譲を受けた。glycerol kinase の発現宿主とした DG1(DE3) は、*E. coli* DG1 を lacUV5 の支配下の T7 RNA polymerase を有する λDE3 で溶原化して構築した。

### 3-2-3 プラスミドの構築

His-tag を付加した Tk-GK と Ec-GK を大量発現させるための発現ベクターを構築した。Tk-GK の遺伝子は pET-pkgk を鋳型として次の 2 種類の primer で、

5'-GGGACAATTACATATGGAAAAGTTCGTTTC-3'

5'-CCGCCGGAATTCTATCAATTTGATTTTGC-3'

PCR 増幅した。また、Ec-GK の遺伝子は大腸菌の染色体を鋳型として、

5'-GGGACAATTACATATGACTGAAAAA-3'

5'-CGCCGGAATTCTATTATTCGTCGTG-3'

の 2 種類の primer で PCR 増幅した。

アンダーラインはそれぞれ *Nde*I サイトと *Eco*RI サイトを示しており、開始コドンと終止コドンがそれぞれ斜体で記述してある。PCR で増幅した DNA 断片を *Nde*I、*Eco*RI で処理し、pET28a にクローニングした。このプラスミド中の Tk-GK 遺伝子と Ec-GK 遺伝子は T7 プロモーターによって制御され、それぞれの N 末端配列には His-tag が付加されている。

### 3-2-4 DNA shuffling

PCR で増幅した Tk-GK と Ec-GK の遺伝子 3.0μg をそれぞれ *Tth*HB8I と *Hae*III で消化した結果、Tk-GK と Ec-GK の遺伝子はそれぞれ 30-300bp の範囲で 11 本の *Tth*HB8I 断片と 9 本の *Hae*III 断片を与えた。これらの断片を電気泳動したアガロースゲルから精製して、さらに、Arnold らの方法 (86) によって DNaseI で処理してより小さい断片にした。これらの DNA 断片を Kikuchi らの方法 (83) に従って、primer を加えない PCR に供し、断片を会合させた。これらの DNA pool に前述の primer を可能な全ての組み合わせで加えて再び

PCR 増幅を行った。1500bp の増幅断片を *Nde*I と *Eco*RI サイトで pET28a にクローニングした。

### 3-2-5 熱安定性キメラ酵素の選択

通常 *E. coli* DG1(DE3) は MacConkey-glycerol plate 上で白色のコロニーを形成するが、Tk-GK もしくは Ec-GK の遺伝子を連結したプラスミドを保有する DG1(DE3) はプレート上で赤色のコロニーを形成する。Ec-GK よりも安定性の高いキメラ GK を生産している *E. coli* DG1(DE3) の形質転換体を以下の方法で選別した。キメラ遺伝子の発現ベクターで形質転換した *E. coli* DG1(DE3) を 30 $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む LB プレートでコロニー形成させたのち、コロニーをろ紙にうつして 1mM IPTG を含む培地上で発現誘導を行った。このろ紙を 60°C、5 分間加熱処理した後、MacConkey-glycerol 培地上に移し 37°C で 2 時間静置した。ろ紙上で赤色を呈した形質転換体を positive として選択した。この条件下では Tk-GK 遺伝子を持つ形質転換体は positive signal として検出されるが、Ec-GK は negative signal を呈する。陽性の形質転換体のプラスミドを抽出し、キメラ遺伝子の塩基配列を決定した。

### 3-2-6 大量生産と精製

陽性の形質転換体は 30mg/litter のカナマイシンを含む LB 培地を用いて、37°C で培養した。培養液の OD<sub>600</sub> が 0.6 に達した時 IPTG を終濃度が 1mM になるように加え、さらに 6 時間培養した。培養菌体は 6000 $\times$ g、10 分の遠心分離で集菌し、300mM の NaCl と 10mM イミダゾールを含む 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH8.0) で懸濁、超音波による破碎、15,000 $\times$ g、30 分の遠心分離にかけた。組み換え蛋白質を含む上清を Ni-NTA agarose カラムに供した。Ni-NTA への目的蛋白質の結合と溶出は QIAGEN 社のマニュアルに従った。目的蛋白質の精製標品を含む画分を集め、300mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.5) で透析したものを生化学的な特性の解析に使用した。蛋白質の精製度は Coomassie Brilliant Blue で染色した 12%SDS-PAGE によって確認した (50)。Tk-GK と Ec-GK の濃度は UV の吸光度から算出した。Tk-GK の A<sub>280</sub><sup>0.1%</sup> は 1.7 とした。

### 3-2-7 活性測定

活性測定は以前の研究で行った 2 段階の方法で行った (79)。まず、2.0mM の CoCl<sub>2</sub> もしくは MgCl<sub>2</sub>、2.0mM の ATP、3.0mM glycerol を含む 100mM HEPES バッファー (pH 8.0) に酵素を加え 10 分間、各温度で保温する。反応は終濃度が 10mM になるように EDTA を加えて停止した。反応溶液中の glycerol-3-phosphate

を glycerol-3-phosphate oxidase と peroxidase を使った比色定量法で測定して酵素活性を算出した。酵素活性は一分間に  $1\mu\text{mole}$  の glycerol-3-phosphate を生産する酵素量を 1 ユニットと定義した。

### 3-2-8 CD 測定

CD スペクトルの測定は J-725 spectrometer を使って行った。酵素濃度は 0.12-0.16mg/ml で 300mM NaCl を含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.5) 中で行った。 $\theta$  値 ( $\text{deg cm}^{-1}\text{dmol}^{-1}$ ) はアミノ酸平均分子量 110 を使って算出した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 DNA shuffling によるキメラ酵素の構築

Ec-GK よりも安定なキメラ酵素を取得するために熱処理後の活性を調べることにによりキメラ酵素の遺伝子を選別した。*E. coli* DG1(DE3) 形質転換体からランダムに 672 株を選択したところ、197 株が GK 活性陽性株であった。これらの株のレプリカを 60°C、5 分の加熱処理に供したところ、加熱後も陽性を示す株の数は劇的に減少し 14 株のみになった。*Hpa*I、*Mlu*I、*Sau*3AI で制限酵素処理マッピングを行った結果、14 株のうち 8 株は Tk-GK の遺伝子である事が判明した。また、その他の 6 種類のプラスミドは 4 種類のキメラ遺伝子を持っている事が分かった。これらの塩基配列を決定し、各キメラ酵素を以下のように表した。E/T-GK409 (1-409 番目が Ec-GK で 400-497 が Tk-GK)、E/T-GK419 (1-419 番目が Ec-GK で 410-497 が Tk-GK)、T/E-GK83 (1-83 番目が Tk-GK で 86-502 が Ec-GK)、T/E-GK487 (1-487 番目が Tk-GK で 498-502 が Ec-GK) (Fig.3-1)。これらのキメラが示すようにいずれも一ヶ所での組み換えしかしていないことから、再結合 PCR の時の組み換え効率はあまり高く無かった事が伺える。

熱処理後陰性であった株の中には Ec-GK や他のキメラ GK が含まれている可能性が有る。shuffling 後の Tk-GK への復帰は 4% (197 株中 8 株) 程度であったが、Ec-GK の方が PCR によってより効果的に増幅する事から、Ec-GK への復帰の確率は Tk-GK よりも高かった可能性が有る。制限酵素を DNA の断片化に使用すると、制限酵素による切断箇所が、primer free の PCR 時に同一遺伝子の断片同士の結合、および伸長反応を抑制することから、より効果的にキメラ遺伝子を得る事ができる (83, 84)。本研究では、制限酵素と DNaseI の組み合わせによる DNA の断片化を行った。しかしながら、得られたキメラ遺伝子には 1 箇所での組み変わりしか見られなかったうえ、Tk-GK へ復帰するものもあった。これらの遺伝子は、制限酵素による断片化が完全であれば生じないはずのものであったが、shuffling 手順のなかで切れ残りの断片が混入したために、このような遺伝子が生じたのだと思われる。

Fig. 3-1. Tk-GK、Ec-GK、キメラ GK のアミノ酸配列の比較 (次頁)

The amino acid sequences derived from Tk-GK are shaded in black and derived from Ec-GK are shaded in gray. The amino acid residues of chimeric GKs, which are identical with those of either Tk-GK or Ec-GK, are indicated by an alphabet. The amino acids substituted by point mutation are indicated without shade. The alphabets under the sequence indicate that the charged amino acid forming ion pairs in C-terminus region of Tk-GK. The ranges of the 16  $\alpha$ -helices and the 25  $\beta$ -strands of Ec-GK are shown above the sequences, according to the crystal structure determined by Hurley *et al.* (15). The sequences have been deposited in Swiss-Prot with code numbers of P08859 for *E. coli* GK (Ec-GK) and in DDBJ with accession number AB012099 for Tk-GK.

$\beta_1$   $\beta_2$   $\beta_3$   $\beta_4$   $\beta_5$   $\alpha_A$   $\beta_6$   $\beta_7$   $\beta_8$   
 1 WTKRYVAL DOCTASSRAY VMDHDAVLS VSOBBEROY PKPFGVHDE MEIATVOST LVEVLAKADI SSPQIAAIGI TNOREFTIWM EKRETKOPIYN 100  
 1 TEK YIVA O S W VM HDA TS VS R B I K D M AT SST LVEVLAK D SSD I I E ET I 100  
 1 TEK YIVA O S W VM HDA TS VS R B I K D M AT SST LVEVLAK D SSD I I E ET I 100  
 1 --E FVLS E A I IF RSN HG IG Y PH R A N E DA LRA IKDAIQS R EPN V V S ER I 98  
 1 --E FVLS E A I IF RSN HG IG Y PH R N E DA LRA IKDAIQS R EPN V L D D- L 97  
 1 M--BREVLSL DEGTTSARAI IFDRESSDIHG IGOYEFPOHY PRICQVEHPN EEINDAQLRA IKDAIQSARI EPNGIAAIGV TNOREFTIWM DKD-GKPLXN 97

Ec-GK  
 E/T-GK409  
 E/T-GK419  
 T/E-GK83  
 T/E-GK487  
 Tk-GK

$\alpha_B$   $\alpha_C$   $\alpha_D$   $\alpha_E$   $\beta_9$   $\alpha_F$   $\beta_{10}$   $\alpha_G$   $\beta_{11}$   $\beta_{12}$   
 101 AIVMQRRTA EMVEETIKRE- YCTMIKEKTG LVPDAVFSAS KIKVLLDNPV CLREKAKEGE VMFGVDTTEL IYRLTGE--H VTDYNSASRT MLFNKIKLDD 200  
 101 E/T-GK409 101 IC HL DG LEDY RSN I F CT V T H E S R RR DL W WVM OGRV T WVM OGRV HT 200  
 101 E/T-GK419 101 IC HL DG LEDY RSN I F CT V T H E S R RR DL W WVM OGRV T WVM OGRV HT 200  
 99 T/E-GK83 99 IC HL DG LEDY RSN I F CT V T H E S R RR DL W WVM OGRV T WVM OGRV HT 198  
 98 T/E-GK487 98 MV EI E- YGTM KEK P A AS L L N P L K EK VM F YRL GE-- S 194  
 98 Tk-GK 98 AIVMQRRTA EMVEETIKRE- YCTMIKEKTG LVPDAVFSAS KIKVLLDNPV CLREKAKEGE VMFGVDTTEL IYRLTGE--H VTDYNSASRT MLFNKIKLDD 194

Ec-GK  
 E/T-GK409  
 E/T-GK419  
 T/E-GK83  
 T/E-GK487  
 Tk-GK

$\alpha_H$   $\beta_{13}$   $\beta_{14}$   $\beta_{15}$   $\alpha_I$   $\beta_{16}$   $\beta_{17}$   $\beta_{18}$   $\beta_{19}$   
 201 DDKMLEVLDI PREMBDEVR SSEVAGCINI CGKGGRIPTI SCLAGDQOAA LFGQALCVKKG MAMVYGRGC FMMNNGEKA VKSENGLLIT JACGPGEVN 300  
 201 E/T-GK409 201 RM VL REM R Q NT GSK GR I I LEVRE A N C M W GE A KSENG C PT E N C PT E N 300  
 201 E/T-GK419 201 RM VL REM R Q NT GSK GR I I LEVRE A N C M W GE A KSENG C PT E N C PT E N 300  
 199 T/E-GK83 199 RM VL REM R Q NT GSK GR I I LEVRE A N C M W GE A KSENG C PT E N C PT E N 298  
 195 T/E-GK487 195 EL LF ESV E Y KK ELL AE- V D AAFEA V A S I V -D M LYSDN W LN R S 292  
 195 Tk-GK 195 DDELLELFDI PESVLPEVRE SSEVAGYTKK ELLGAE-IPV SGDAGDQOAA LFGQAFEAG MVKATYGTGS FILVNT-DRM VLYSDNLLIT IAWGLNGRVS 292

Ec-GK  
 E/T-GK409  
 E/T-GK419  
 T/E-GK83  
 T/E-GK487  
 Tk-GK

$\beta_{20}$   $\alpha_J$   $\alpha_K$   $\beta_{21}$   $\beta_{22}$   $\alpha_L$   
 301 VALEGAVEMA GASIQWERDE MLLINDANDS EXPATRYONT NGVAVIAPFT GICAPYDHY ARGALFGUR GWANHLIIRA TLESTAYQUR DVLEMOADS 400  
 301 E/T-GK409 301 AV MA SI K W L ND YDS VT VONT N V T BY A F WYAN IL S O LEA QADS 400  
 301 E/T-GK419 301 AV MA SI E M L ND YDS VE VONT N V T BY A F WYAN IL S O LEA QADS 400  
 299 T/E-GK83 299 AV MA SI E M L ND YDS VE VONT N V T BY A F WYAN IL S O LEA QADS 398  
 293 T/E-GK487 293 SI VT AV G I I KH SET EL LESN E F V QF I I TGRE LA A L VDE --EK 390  
 293 Tk-GK 293 VALEGSIFVT CAMQOLRDG IKIHKASET EBLATKLESN EGWYFPAFV GIGAPYDQF ARGILIGITR GTGREHIARA TLEALAYLTR DWVDEM--EK 390

Ec-GK  
 E/T-GK409  
 E/T-GK419  
 T/E-GK83  
 T/E-GK487  
 Tk-GK

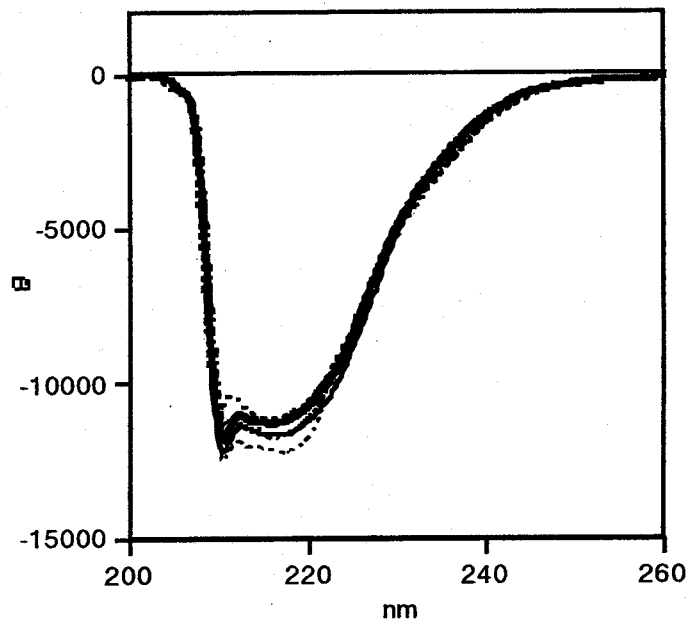
$\beta_{23}$   $\alpha_M$   $\alpha_N$   $\alpha_O$   $\beta_{25}$   $\alpha_P$   $\alpha_Q$   
 401 GURHARVE GSAVANNHEM QROSDHUR VERRESENI ALGAAIAGL AVGEMQEDE BOEKALERE EPPGHEHET NYRAGIWKVA YKRAMATEEH DE 502  
 401 E/T-GK409 401 T D A DRK I V K T DY ADTR IA LAKA I E KMDKKT ERL K E G AKV VDSAKSN 507  
 401 E/T-GK419 401 T D A DRK I V K T DY ADTR IA LAKA I E KMDKKT ERL K E G AKV VDSAKSN 507  
 399 T/E-GK83 399 T D A DRK I V K T DY ADTR IA LAKA I E KMDKKT ERL K E G AKV VDSAKSN 500  
 391 T/E-GK487 391 T D A NRK I V K T DY V DTR IA LAKA I E KMDKKT ERL K E G EPH DE 492  
 391 Tk-GK 391 LVQIKELRVD GGTANDEFLM QROADILNRK VIRPVKETT ALGAAIAGL AVDYADTRE IAEIUKAERI FEPKMDKTR ERLYKMKEA VKRAMGWAKV VDSAKSN 497

Ec-GK  
 E/T-GK409  
 E/T-GK419  
 T/E-GK83  
 T/E-GK487  
 Tk-GK

### 3-3-2 生化学的特性

Tk-GK、Ec-GK と同様に 4 種類のキメラ酵素も His-tag を付加して *E. coli* DG1(DE3) で大量発現した。すべての酵素は Ni-NTA アガロースを使って、SDS-PAGE 上で単一バンドとなるまで精製した。1l の培養液から得られた酵素量は 8mg から 28mg であった (Table3-1)。これらのキメラ酵素の短波長 UV CD スペクトルは Tk-GK や Ec-GK のものと良く似ていた事から、二次構造上大きな違いは無いと言う事が示された (Fig.3-2)。Ec-GK は通常 2 量体と 4 量体の平衡状態に有り、濃度が薄いと 2 量体で存在することが報告されている (9, 10) が、本研究では 0.45  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でも 2 量体しか確認できなかった。Tk-GK も 2 量体であることから、キメラ酵素もまた、2 量体である事が示唆される。

Fig.3-2 短波長 CD スペクトルの比較



The CD spectra of Ec-GK (thick dotted line), Tk-GK (thick line), E/T-GK409 (thin dotted line), E/T-GK419 (thick broken line), T/E-GK83 (thin broken line) and T/E-GK 487 (thin line) were measured in 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.5) containing 0.3 M NaCl at 20°C as described in materials and methods.

### 3-3-3 酵素活性

キメラ酵素に付いても、Tk-GK や Ec-GK と同様に至適条件下での比活性を測定した (Table3-1)。それぞれの酵素の反応至適温度、要求金属イオンについては Table1 に記述している。以前の研究では Tk-GK の 70°C、90°Cでの活性が 80°Cのときよりも低かったことから、反応至適温度は 80°Cとしていたが、今回の研究で 85°Cでの活性がより高かったことから、85°Cが至適温度であると言える。Ec-GK の反応至適温度は 65°Cで比活性は 107u/mg であった。

Table 3-1 Tk-GK、Ec-GK、キメラ GK の比活性

Enzyme	Yield <sup>a</sup> (mg)	Metal ion <sup>b</sup>	Optimum temperature (°C)	Specific activity <sup>c</sup> (units/mg)
Ec-GK	13	Mg <sup>2+</sup>	65	107
E/T-GK409	11	Mg <sup>2+</sup>	75	24
E/T-GK419	8	Mg <sup>2+</sup>	75	32
T/E-GK83	28	Mg <sup>2+</sup>	50	22
T/E-GK487	10	Co <sup>2+</sup>	80	703
Tk-GK	14	Co <sup>2+</sup>	85	724

<sup>a</sup>The amount of the protein purified from 1 liter culture. <sup>b</sup>The most preferable metal ion for activity. <sup>c</sup>The enzymatic activity was determined in 0.1 M HEPES buffer (pH8.0) containing 2.0 mM CoCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub>, 2.0mM ATP, and 3.0mM glycerol for 10 min at the individual optimum temperatures. The amount of glycerol-3-phosphate in the reaction mixture was then determined colorimetrically at 37°C by coupled enzymatic reaction catalyzed by glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase. The experiment was carried out in duplicate, and errors from the average values were within 10% of the values reported.

Tk-GK の反応に最適な金属イオンは Co<sup>2+</sup>で、Ec-GK は Mg<sup>2+</sup>である。キメラ酵素についても、至適金属イオンがどちらであるかを試験したところ、T/E-GK487 Mg<sup>2+</sup>よりも Co<sup>2+</sup>の方がより適していることが分かった、従って、このキメラ酵素は Tk-GK の特徴を引き継いでいる事が考えられる。事実、T/E-GK487 の至適温度は Tk-GK のそれに近い。同様に、Co<sup>2+</sup>では活性を示さずに Mg<sup>2+</sup>で活性を示した E/T-GK409、E/T-GK419、T/E-GK83 は Ec-GK と同様の特性を有していると考えられる。これらの酵素の比活性は Ec-GK に近い値であったが、いずれも Ec-GK よりも低い値であった。これは、C 末端、N 末端のアミノ酸置換が CD では検出できない程度の、コンフォメーション変化を引き起こしているためだと考えられる。

### 3-3-4 熱安定性

キメラ酵素の反応至適温度を比較したところ、ほとんどの酵素は Ec-GK と Tk-GK の中間の反応至適温度を有している事が分かったが、T/E-GK83 は Ec-GK よりも低い至適温度を示しており、不安定である事がわかった (Table3-1)。これらのキメラ酵素の熱安定性をより定量的に比較するために、各温度で 20 分間加熱した際の残存活性を 30°Cで測定した。この実験で、Tk-GK は 95°Cで活性が半減するのに対し、Ec-GK は 50-55°Cで活性が半減した (Fig.3-3)。このように、Tk-GK の活性半減温度 (T<sub>1/2</sub>) は Ec-GK よりも、40-45°C高い。



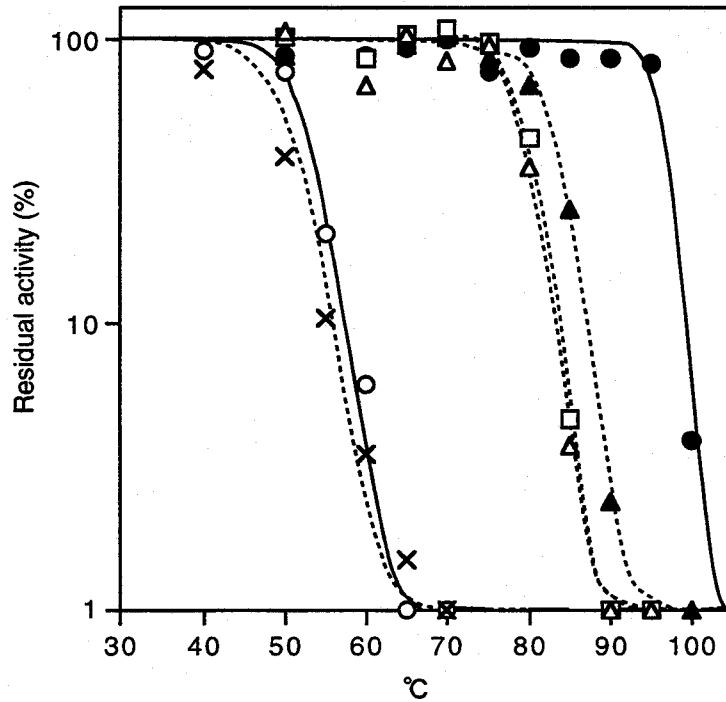


Fig.3-3 Tk-GK、Ec-GK、キメラ GK の熱失活

The enzyme was dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) containing 0.3 M NaCl at a concentration of ~0.1 mg/ml, incubated for 20 min at the temperatures indicated, and determined for remaining activity at 30°C. Symbols: Tk-GK (closed circle), Ec-GK (open circle), E/T-GK409 (open triangle), E/T-GK419 (open square), T/E-GK83 (cross), T/E-GK487 (closed triangle).

Tk-GK と Ec-GK のアミノ酸配列は 200 残基以上異なる。このような置換箇所は配列全体に分布している (Fig.3-1)。C 末端の 83 残基を Tk-GK 型にしたキメラ酵素 E/T-GK419 の  $T_{1/2}$  は Ec-GK の  $T_{1/2}$  よりも 25-30°C 高い。一方、N 末端の 85 残基を Tk-GK 型にしたキメラ酵素 T/E-GK83 の  $T_{1/2}$  は Ec-GK の  $T_{1/2}$  よりも 5-10°C 低い。C 末端の 93 残基を Tk-GK 型にしたキメラ酵素の E/T-GK409 の  $T_{1/2}$  は E/T-GK419 の  $T_{1/2}$  と同様、Ec-GK の  $T_{1/2}$  より 25-30°C 高い。E/T-GK409、E/T-GK419 と Ec-GK の一次構造を比べると、約 40 箇所のアミノ酸置換が見られるが、この数は Tk-GK と Ec-GK を比較した場合の約 1/5 に過ぎない。それにもかかわらず、Ec-GK と E/T-GK409、E/T-GK419 の  $T_{1/2}$  の違いは Ec-GK と Tk-GK の  $T_{1/2}$  の違いの約 2/3 に達する。このことから、Tk-GK の熱安定性に貢献しているアミノ酸置換が C 末端付近に主として局在している可能性が高いと思われる。

Ec-GK の結晶構造解析の結果 (15) より、C 末端の 83 残基はサブユニット界面に存在している (Fig.3-4)。しかしながら、C 末端領域の  $\alpha$  helix (480-493)

は Ec-GK の 4 量体 (O,X,Y,Z) の O-Y 界面に位置している。これまでの研究で、O-Y 界面は他の O-X、O-Z 界面に比べて安定で、Ec-GK は O-Y の 2 量体を形成していると考えられている (15)。O-Y 界面の安定化は GK の安定化に繋がっているかもしれない。T/E-GK487 の  $T_{1/2}$  が Tk-GK に比べておよそ 15°C 不安定化している事もこの仮説を裏付けているといえる。しかし、Ec-GK と E/T-GK419 のアミノ酸配列の違いの内、どれが安定性の違いを生んでいるのかより詳細に同定する必要がある。

これらのキメラ遺伝子は Ec-GK よりも安定性の高い酵素を選ぶ選択圧をかけていた。しかるに T/E-GK83 が Ec-GK よりも不安定であった事は予測外のことであった。これは、*in vivo* で選択したために、菌体内成分の存在や、発現量の差異などが影響したのではないかと考えている。また、各キメラ遺伝子には PCR エラーによる点変異が入っているが、これらはいずれも、分子表面に存在しており、キメラ酵素の安定性に大きな影響を与えるものではないといえる。

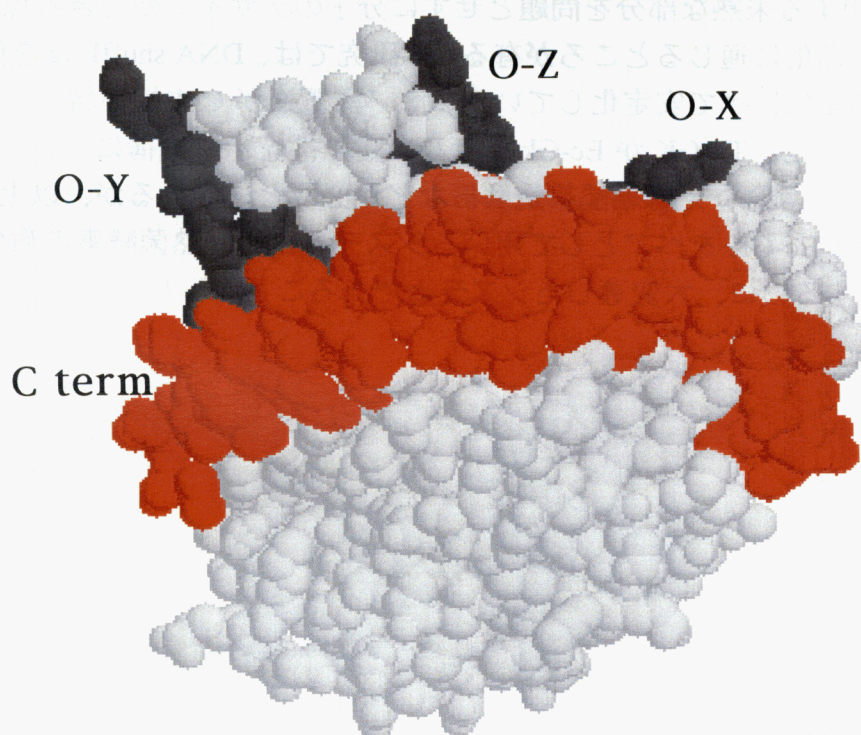


Fig.3-4 Ec-GK 単量体の立体構造

The structure of Ec-GK monomer (PDB code 1GLB), determined by Hurley *et al.* (15) was drawn with the program RasMol. “C term” represent the C-termini of the molecule. The C-termini segment (420-502) is shown in red. The segments 49-66, 341-347 and 362-369, and 321-333, which are involved in the O-X, O-Y, and O-Z interfaces, respectively, in the tetrameric structure, are shown as shade.

### 3-3-5 DNA shuffling の有用性

Tk-GK と Ec-GK は分子量サイズが大きく、両者の間のアミノ酸置換も 200 箇所以上存在することから、部位特異的変異の導入と分子のデザインで安定化に寄与しているアミノ酸置換を見つけることは困難である。実際、第 2 章で示したように、Ec-GK に Tk-GK 型のアミノ酸置換を導入することにより、Ec-GK の安定化を図る試みは全て失敗している。また、1-254 までが Ec-GK で 249-497 までが Tk-GK であるキメラ酵素と 1-248 が Tk-GK で 255-502 が Ec-GK であるキメラ酵素の構築を試みたが、構築はできなかった。これらの酵素は、菌体内で大量発現する事ができなかったことから、好ましく無い相互作用が生じて正しい折り畳みができなかったのだと考えられる。

DNA shuffling は、配列情報の操作と機能の評価により機能向上分子を創出する進化的蛋白質工学であると考えられる。構造は機能に対する要請により、後からついてくるものであると割り切ってしまう、立体構造を仲介せずに配列情報と分子機能の関係を問題にしてしまう事ができるので、構造機能相関、配列構造相関に関する未熟な部分を問題とせず分子のデザインができる点で自然界で起こった進化に通じるところがある。本研究では、DNA shuffling を使い、Tk-GK を Ec-GK に比べて安定化しているアミノ酸置換が C 末端領域に局在していることを示した。Tk-GK が Ec-Gk より高い耐熱性を示す機構については、さらなる変異導入実験や X 線結晶構造解析などが必要と思われるが、以上の結果は、Tk-GK と Ec-GK をペアとして用いるシステムが超好熱菌酵素の耐熱機構を解析するのに、大変適したシステムであることを示している。

## 第4章

### 超好熱始原菌由来 subtilisin 型 protease の特性解析

#### 4-1 背景

セリンプロテアーゼは基礎と応用の両面で、非常に良く研究されている酵素である。これらは活性中心に Catalytic triad という Ser、His、Asp、の三つのアミノ酸残基を共通して保持していることが知られている。また、これらの酵素は、subtilase group と trypsin-like serine protease group の二つのグループに分けられる。前者の方が後者よりもより広く、真核、細菌、始原菌など多くの生物間で研究されており、アミノ酸配列の違いにより、6つのファミリー(Subtilisin, Thermitase、Proteinase K、Lantibiotic peptidase、Kexin、Pyrolysin) に分類されている(86)。*B. subtilis* 由来の subtilisin E (87)、*B. amyloliquefaciens* 由来 subtilisin BPN' (88)、*B. licheniformis* 由来の subtilisin Carlsberg (89) などが含まれる、Subtilisin family は構造と機能が最も良く研究されており、結晶構造解析も行われている(90, 91, 92)。subtilisin は商業的に利用価値の高い酵素である事から、蛋白質工学による、酵素活性や安定性の改変が盛んに行われている(93, 94)。

subtilisin は細胞内では成熟蛋白質の N 末端に pre 配列と pro 配列が付いた形の pre-pro-subtilisin と呼ばれる前駆体で合成される(87, 89, 88)。pre 配列はシグナルペプチドとして働き、サイトプラズムを通して、pro-subtilisin を分泌する。pro 配列は分子内シャペロンとして働き、成熟蛋白質の折り畳みを助ける働きをしている(95, 96, 97)。pro 配列は成熟蛋白質から自己分解して成熟蛋白質から切り離され、その結果成熟蛋白質が生産される。

本章では、glycerol kinase を用いるシステム以外にも、常温酵素とペアを組み合わせることにより、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するのに適したシステムを構築することが可能かどうかを調べる目的で、*T. kodakaraensis* KOD1 由来の subtilisin 型酵素 (Tk-subtilisin) 遺伝子のクローニング、組み換え蛋白質の発現、精製、特性解析をおこなった。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 菌株とプラスミド

*T. kodakaraensis* KOD1 は本研究室で単離された菌株である (19)。*E. coli* HB101 [F<sup>-</sup>, *hsdS20*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *recA13 ara-13 proA2 lacY1 galK2 rpsL20* (Sm<sup>r</sup>) *xyl-5 mtl-1 supE44* ]、プラスミド pBR322、pUC18 は Takara Co., Ltd から、*E. coli* BL21-codon Plus (DE3)-RIL [F<sup>-</sup>, *ompT hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal<sub>(DE3)</sub> *endA Hte* (*argU ileY leuW* Cam<sup>r</sup>)] は Stratagene、プラスミド pET25b は Novagen から購入した。

### 4-2-2 Tk-subtilisin 遺伝子のクローニング

*T. kodakaraensis* KOD1 の染色体 DNA は文献による方法に従い調製した (44)。*Hind*III で消化した染色体 DNA を pBR322 にクローニングして染色体のライブラリーを構築した。ライブラリーで *E. coli* HB101 を形質転換し、LB-casein 寒天培地 (Luria-Bertani medium supplemented with 1% casein, 50 µg/ml ampicillin, and 1.5% agar) 上で 37°C で培養した。コロニー形成したプレートに溶菌させるために、1% の Tween20 を含む 1.3% の寒天を重層して、80°C でさらに 2 日静置すると培地中のカゼインの酵素による分解が観察される。カゼインの分解を示すハローが観察されたコロニーからプラスミド DNA を抽出し、サブクローンし塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、dideoxy-chain termination 法 (49) で ABI prism310 を使って解析をおこなった。塩基配列、アミノ酸配列の解析ソフトには DNASIS (Hitachi) を使用した。

### 4-2-3 Tk-subtilisin の大量発現と精製

Tk-subtilisin の予測される pro 配列を以下の 2 種類のプライマーで増幅した。

5'-AGTCCCTGCACATATGGGAGAGCAGAATACAATA-3'

5'-AGTGGATCCAATCAGCCCAGGGC-3'

PCR には vent polymerase と Perkin-Elmer のサーマルサイクラーを用いた。その結果増幅した 1.2kbp の DNA 断片を *Nde*I と *Bam*HI で処理し発現プラスミド pET25b につなぎ、pET25b-Tk-subtilisin を作成した。このプラスミドで *E. coli* BL21-codon Plus(DE3) を形質転換して Tk-subtilisin の発現系とした。得られた形質転換体を 50µg/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、37°C で培養した。660nm の吸光が 0.6 になるまで培養したのち IPTG を終濃度が 1mM になるように添加して遺伝子の発現誘導を行った。さらに 4 時間培養を継続した後、集菌し精製に供した。

すべての精製手順は 4°C で行った。集菌した細胞は、20mM Tris-HCl (pH 9.0) バッファーで懸濁し、超音波で細胞を破碎した後、15,000× g、30 分間の遠心分離で沈澱と上清に分離した。沈澱画分に 8M の尿素を含む 20mM Tris-HCl (pH

9.0) バッファーを加え、沈澱を溶かした後、20mM Tris-HCl (pH 9.0) バッファーで透析して尿素を取り除き、さらに 15,000× g、30 分間の遠心分離をおこなった。上清画分を同じバッファーで平衡化した 5ml サイズの Hi-TrapQ のカラムに供し、吸着したタンパク質を 0-1M の直線的な NaCl の濃度勾配をかけたところ、約 0.5M の NaCl で Tk-subtilisin は溶出した。精製度は、タンパクを泳動した 12%SDS-PAGE を Coomassie Brilliant Blue で染色して確認した。さらに、Procise 自動シーケンサーで N 末端のアミノ酸配列を決定した。Tk-subtilisin の分子量は Superdex 200 のゲルろ過カラムを使い決定した。カラムは 150mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH7.5) で平衡化し、標準分子量マーカーとしては、BSA (67kDa)、ovalbmin (43kDa)、chymotrypsinogen A (25kDa)、RNaseA (13.7kDa) を使用した。

#### 4-2-4 活性染色

泳動の終わった 12%の SDS-PAGE ゲルを 2.5% Triton X-100 を含んだ 50mM CAPS-NaOH (pH9.5) で 1 時間洗ったのちに、0.5% ゼラチンを含んだ 12% polyacrylamide gel に蛋白質をうつし、レプリカを作成した (19)。レプリカのゲルを 80°C で 16 時間静置し、蛋白質の分解反応を行い、100ml の 0.1% amide black 溶液 (30% methanol、10% 酢酸、60%水) で染色した。プロテアーゼのバンドはゲル上にゼラチンの分解によって起こる色の抜けたバンドとして検出された。

#### 4-2-5 活性測定

活性の決定は *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (AAPF), *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilide (AAPL), or *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Asp-*p*-nitroanilide (AAPD) (Sigma) の 3 種類の合成基質を 0.13mM の濃度で使い文献による方法で測定した (97)。Tk-subtilisin の活性測定には 5mM CaCl<sub>2</sub> を含んだ、50mM CAPS- NaOH (pH9.5) を使い、subtilisin E の活性測定には 5mM CaCl<sub>2</sub> を含んだ、Tris-HCl (pH8.5) をバッファーとして使用した。反応溶液は 80°C (Tk-subtilisin) または 50°C (subtilisin E) で保温した後、分解反応によって生じる *p*-nitroaniline の生成量を 410 nm の吸光とモル分子吸光係数 8,900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> によって見積もり、それにより、酵素活性を決定した。1 ユニットは Tk-subtilisin では 80°C、subtilisin E では 50°C において、それぞれ、1 分間に 1nmol の *p*-nitroaniline を生成する酵素量と定義した。Tk-subtilisin と subtilisin E の濃度は 280nm の吸収と、それぞれの A<sub>280</sub><sup>0.1%</sup> 値 (1.24 と 1.25) によって決定した。この値は tyrosine と tryptophan のε値 (1,576 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> と 5225M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) によって算出した (98)。

#### 4-2-6 ポリペプチド鎖切断箇所特異性の同定

酸化 insulin A 鎖または B 鎖に質量比 10:1 で Tk-subtilisin を混ぜて至適条件で 30 分消化し、HPLC の逆相カラム COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR column (4.6 mm x 150 mm) で、ペプチド断片の分離を行った。1%酢酸存在下、15%~50%の acetonitrile 直線濃度勾配で溶出を行い、230nm の吸光度を測定することによりペプチドの検出を行い、LCQ Mass Spectrometer System で分子量を決定した。

#### 4-2-7 CD スペクトル測定

J-725 automatic spectropolarimeter を使用した。0.11mg/ml の Tk-subtilisin 溶液 (20mM Tris-HCl pH9.0、500mM NaCl) と 0.11mg/ml の subtilisin E の溶液 (10mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl) について短波長 (200-260nm) の CD スペクトル測定を行った。アミノ酸の平均分子量は 110 として  $\theta$  値 ( $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$ ) の算出を行った。

## 4-3 結果

### 4-3-1 Tk-subtilisin 遺伝子のクローニング

カゼインプレート培地に形成された形質転換体のコロニーを 80°C に晒した後、コロニーの周りにカゼイン分解によってできる白いハローを観察する事で、有効に耐熱性プロテアーゼを生産する形質転換体を選択する事ができた。この方法で選択した形質転換体に含まれていたプラスミドから、約 1.5kbp の *Hind*III 断片が取得された。この断片の塩基配列を決定した所、Tk-subtilisin 遺伝子が pre-pro-配列と思われる配列とともに確認された。この配列情報から、Tk-subtilisin は 422 アミノ酸残基からなり、推定分子量は 43,783、等電点は 4.5 であることが推定された。SD 配列と TATA 配列ともに転写開始点の上流に、また転写終結サイトは終止コドンの下流にそれぞれ確認された。

### 4-3-2 アミノ酸配列

クローニングされた遺伝子のアミノ酸配列からデータベースの相同性検索を行った所、Tk-subtilisin は Subtilisin family に属する事が分かった。他の Subtilisin family のメンバーのアミノ酸配列と比較したところ、Tk-subtilisin は、24 残基 (Met<sup>106</sup> から Ala<sup>83</sup>) からなる pre 配列と 82 残基 (Gly<sup>82</sup> から Pro<sup>1</sup>) からなる pro 配列、316 残基 (Ala<sup>1</sup> から Gly<sup>316</sup>) からなる活性ドメインから成る事が分かった (Fig. 4-1)。WWW サーバー SignalP V2.0 プログラムを使ったところ、予測された pre 配列は分泌シグナルとして同定された。Tk-subtilisin の活性ドメインのアミノ酸配列の同一性は aerolysin (99) と 45%、subtilisin E (87) と BPN<sup>7</sup> (88) に対して 44%、carlesberg (89) とは 43% であった。また、subtilase の他の family のプロテアーゼとも、比較的の高い相同性を示している。Thermitase family の thermitase (100) とは 41%、Proteinase K family の proteinase K とは 36%、Lantibiotic pepetidase family の lactocin leader peptidase (101) とは 28%、Kexin family の Kex2 (102) とは 30%、Pyrolysin family の pyrolysin (103) の活性ドメインとは 38% の同一性があった。これらすべての subtilase に保存されている活性中心 catalytic triad (Asp<sup>33</sup>、His<sup>71</sup>、Ser<sup>242</sup>) と oxyanion hole である Asn<sup>182</sup> は Tk-subtilisin にも保存されていた。



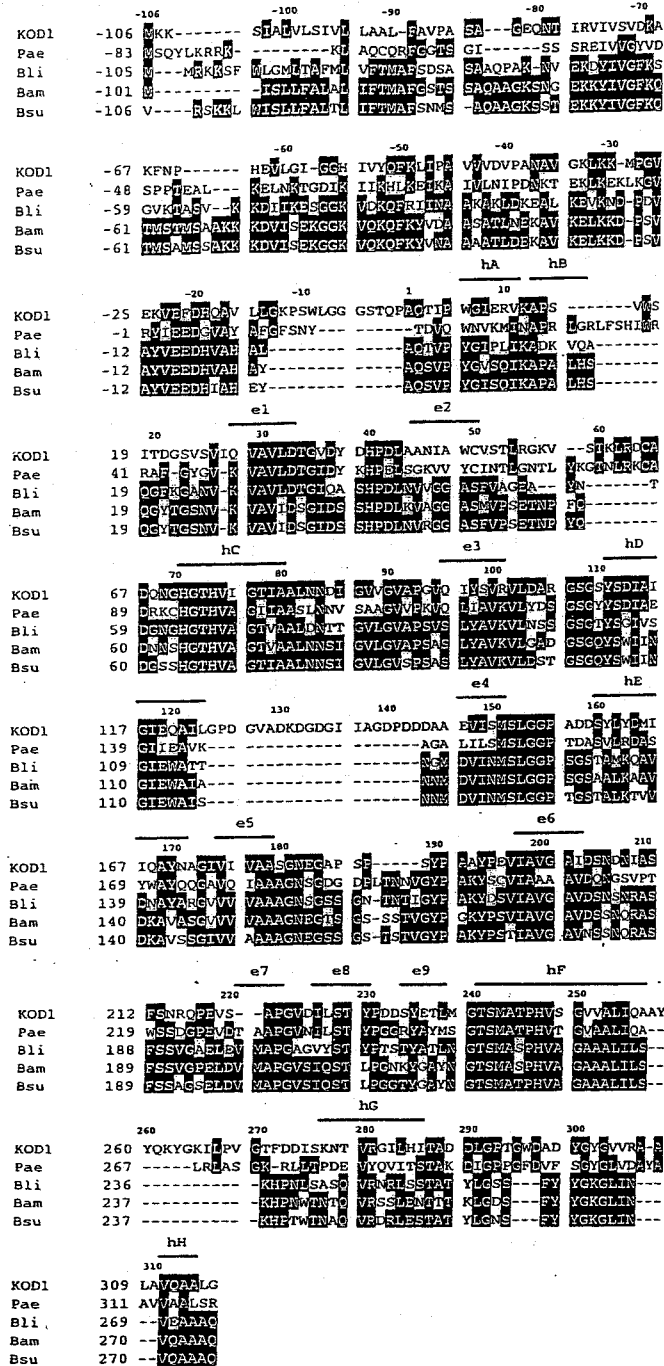


Fig. 4-1 Subtilisin のアミノ酸配列の比較

Alignment of subtilisin sequences. The amino acid sequence of *Tk*-subtilisin (*Tk*-sub) is compared with those of aerolysin (Paelys) (accession no. S76079), subtilisin Carlsberg (BlsCar) (accession no. X03341), subtilisin BPN' (BasBPN) (accession no. X00165), and subtilisin E (BssE) (accession no. K01988). Gaps are denoted by dashes. Amino acid residues, which are conserved in at least three different sequences, are denoted by inverse letters. The amino acid residues that form a catalytic triad and the asparagine residue that forms an oxyanion hole are denoted by solid and open circles, respectively. Numbers represent the positions of the amino acid residues starting from the N-terminus of the mature protein for bacterial subtilisins and a putative catalytic domain for *Tk*-subtilisin and aerolysin. The ranges of eight  $\alpha$ -helices and nine  $\beta$ -strands of subtilisin BPN' are shown above the sequences.

### 4-3-3 大量生産と精製

生化学的解析に用いるため、T7 プロモーターで Tk-subtilisin を発現させる、大量発現系 pET25b-Tk-subtilisin を構築した。この Tk-subtilisin は pro 配列を含んでおり、399 アミノ酸残基からなる (Met + Gly-82-Gly316)。これまでの研究から他の pro-subtilisin は大腸菌内で発現させると、不活性な封入体として発現するが、再構成する事で成熟酵素が得られる事が分かっていたので (104)、Tk-subtilisin も、pro 体から発現させた。果たして、Tk-subtilisin は宿主内で封入体として発現した。これを尿素で可溶化後、透析によって尿素を除き蛋白質を再構成させた。その結果 Fig.4-2 の lane2 のように複数のバンドが可溶画分にみられた。ゼラチンゲルのレプリカによる活性染色を行ったところ、分子量 44,000 のバンドにプロテアーゼ活性がある事が明確になった (Fig.4-2 lane4)。さらにこのバンドが単一になるまで、精製を進めた (Fig.4-2 lane3)。このバンドの N 末端配列を決定したところ GEQNTIR という pro 配列の N 末端配列が読み取れた。このことから、Tk-subtilisin は活性型になったのちも、pro 配列の切除が行われなかったと考えられる。Tk-subtilisin は 11 の培養菌体から約 17mg 得られた。

### 4-3-4 生化学的特性解析

SDS-PAGE の結果から計算される分子量と、アミノ酸配列から予測される分子量 (41,387) は非常に近く、およそその分子量がこの値であると推定できる。ゲルろ過カラム溶出位置から推定した分子量はおよそ、40,000 であったことから、Tk-subtilisin は単量体として存在している事が示された。Fig.4-3 は Tk-subtilisin の短波長 CD スペクトルを subtilisin E のものと比較しているが、両者には 210nm 付近の波形に顕著な違いが観察された。Tk-subtilisin の場合 220nm での  $\theta$  は -9,000 でそこから、波形は肩を描いて 208nm では  $\theta$  が -11,000 までおちている。しかし、subtilisin E の 208nm の  $\theta$  は -8,500 で 220nm のそれと (-9,000) あまり変わらない。この結果は、両者の 2 次構造の違いをあらわしていると言える。

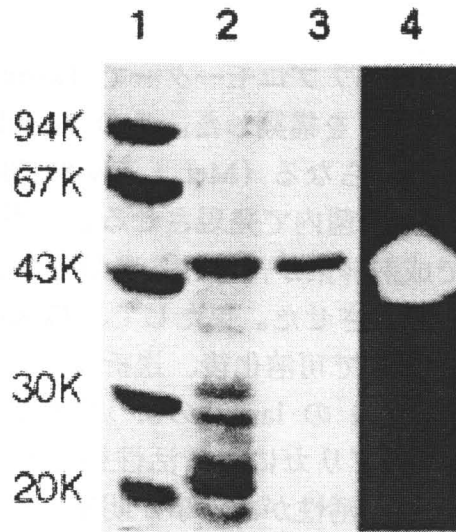


Fig.4-2 *Tk*-subtilisin の SDS-PAGE による純度検定及び活性検出

Samples were subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel in the presence of SDS. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1-3) or stained for protease activity (lane 4). Lane 1, low molecular weight marker kit (Pharmacia Biotech) containing phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, and  $\alpha$ -lactalbumin; lanes 2 and 4, refolded proteins of insoluble fractions obtained from *E.coli* BL21-codonPlus(DE3) harboring plasmid pET25b-*Tk*-subtilisin upon sonication lysis; lane 3, purified *Tk*-subtilisin. The molecular weight of each standard protein is indicated along the gel.

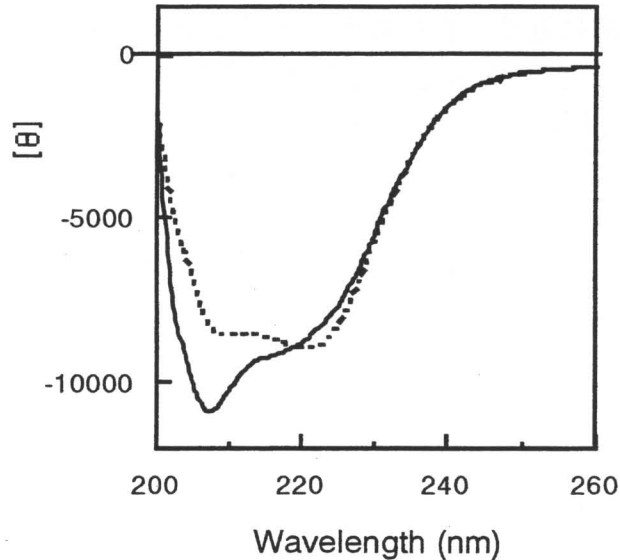


Fig. 4-3 *Tk*-subtilisin と subtilisin E の短波長領域 CD スペクトルの比較

The far-UV CD spectrum of *Tk*-subtilisin (solid line) is shown in comparison with that of subtilisin E (broken line). These spectra were measured at 20°C. The mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , with units of  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ , was calculated using an average amino acid molecular weight of 110.

#### 4-3-5 酵素活性

活性測定には *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (AAPF) を用いた。subtilisin は一般的に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが活性に必要である (105)。そこで、Tk-subtilisin の金属イオン要求性を  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ , および  $\text{BaCl}_2$  についても調べた。しかし、Tk-subtilisin はこれらの金属イオンの存在化ではわずかな活性しか示さなかった。Tk-subtilisin は  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが 5mM の時に最も高い活性を示し、1mM もしくは 100mM  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下での Tk-subtilisin の活性は最大値の 70%か 80%であった。また、Tk-subtilisin の活性至適条件を試験した結果、Fig.4-4 に示すように pH 9.5、80°Cが至適であった。subtilisin E の反応至適温度は 60-65°Cであるから、Tk-subtilisin は約 20°C至適温度が高い。

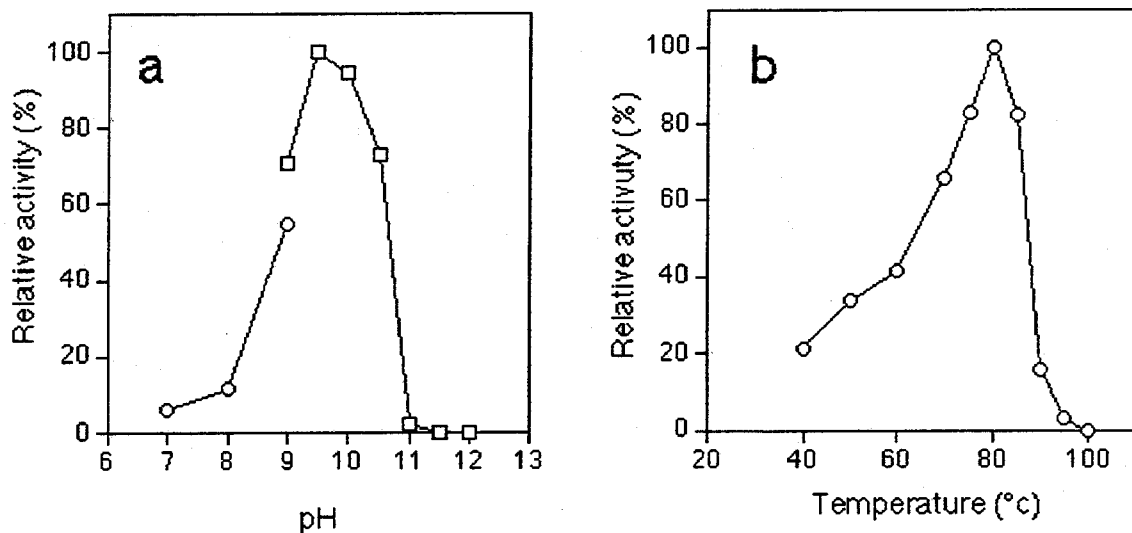


Fig.4-4 Tk-subtilisin の酵素特性

(a) Effect of pH on the activity of *Tk*-subtilisin toward the synthetic substrate AAPF. The enzymatic activity was determined at 80°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0-9.0) (○) or 50 mM CAPS-NaOH (pH 9.0-12.0) (□) in the presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . The activity relative to that determined at pH 9.5 is shown as a function of pH. (b) Effect of temperature on the activity of *Tk*-subtilisin toward AAPF. The enzymatic activity was determined in 50 mM CAPS-NaOH (pH 9.5) containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$  at the temperatures indicated. The activity relative to that determined at 80°C is shown as a function of temperature.

subtilisin の切断箇所は一般に、基質の P1 部位アミノ酸側鎖に影響されるものの、その特異性は幅広い事が知られている (106)。AAPF, *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilide (AAPL), *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Asp-*p*-nitroanilide (AAPD) はそれぞれ、P1 部位のアミノ酸側鎖が、疎水性で大きい、親水性である等の特徴を有している合成基質である。これらを用いて、Tk-subtilisin の分解特異性を subtilisin E のそれとおおまかに比較した (Table4-1)。

TABLE 2-1: Specific activities of *Tk*-subtilisin and subtilisin E toward synthetic substrates<sup>a</sup>

Substrates	<i>Tk</i> -subtilisin		subtilisin E	
	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)	Specific activity (units/mg)	Relative activity (%)
<i>N</i> -succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilide	3930	100	13300	100
<i>N</i> -succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Leu- <i>p</i> -nitroanilide	955	24.3	2820	21.2
<i>N</i> -succinyl-L-Ala-Ala-Pro-Asp- <i>p</i> -nitroanilide	<40	<1.0	<40	<0.3

<sup>a</sup>The enzymatic activity was determined at pH 9.5 and 80°C for *Tk*-subtilisin or pH 8.5 and 55°C for subtilisin E in the presence of 0.13 mM of the substrate and 5 mM CaCl<sub>2</sub>. The experiment was carried out in triplicate, and errors from the average values were within 10% of the values reported.

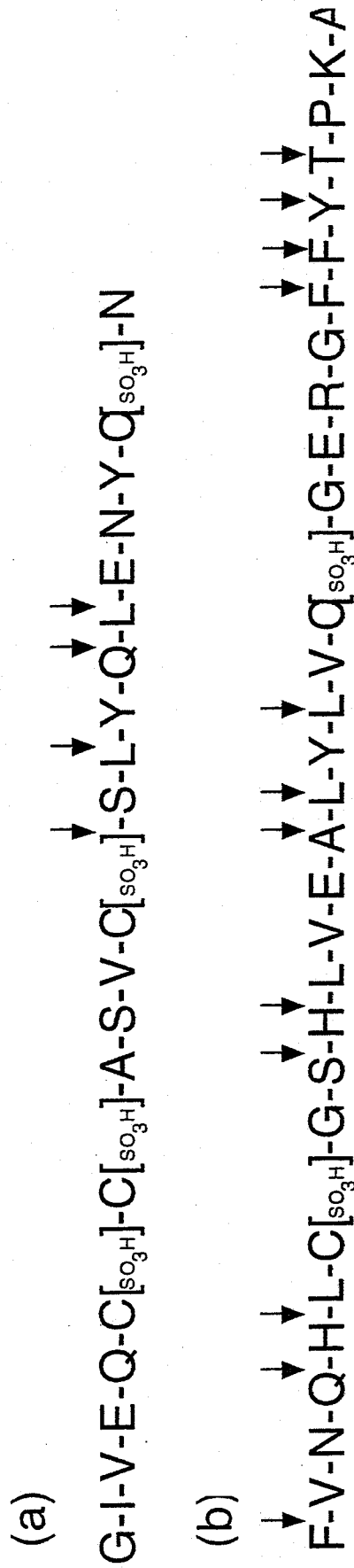


FIG. 2-5 Cleavage-site specificity of *Tk*-subtilisin. Cleavage sites of oxidized insulin chains A (a) and B (b) by *Tk*-subtilisin are shown by arrows.

いずれも AAPF を基質として用いた場合に最も活性が高く、AAPL がそれに続き、AAPD に対する活性は非常に低かった。この結果、Tk-subtilisin の基質特異性は他の subtilisin と似ている事が分かった。Tk-subtilisin の至適条件での比活性は subtilisin E の 30% であった。

#### 4-3-6 切断箇所の特異性

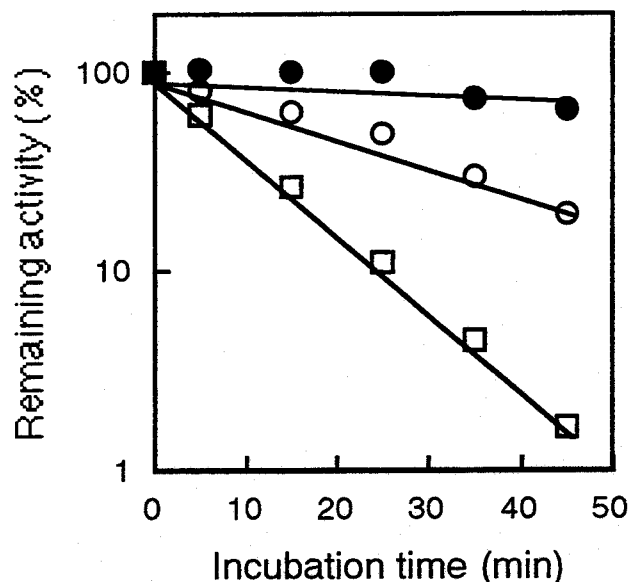
Tk-subtilisin の基質切断部位の特異性を調べるために、酸化 insulin A 鎖と B 鎖の切断実験をおこなった。Tk-subtilisin と 80°C、30 分の反応させる事で得られた切断断片の質量を分析して、その切断箇所を特定したところ Tyr, Phe, Leu, Gln, His, Thr, Ser, Ala など、多様なアミノ酸残基の C 末端で切断されている事が分かった (Fig.4-5)。従って、Tk-subtilisin は、他の subtilase と同様 (107)、P1 部位に疎水性残基のある基質を好むが、比較的幅広い基質特異性を示すことが明らかになった。

#### 4-3-7 熱安定性

Ca<sup>2+</sup> イオンは活性に必要なだけで無く subtilase の安定性にも寄与する。Tk-subtilisin もまた、50mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で安定化する事が確認されている。さらに 50mM CaCl<sub>2</sub>、20mM Tris-HCl (pH9.0) の Tk-subtilisin 溶液 (42μg/ml) を用いて、熱変性に対する耐性を 80°C、90°C、100°C で試験した。各酵素サンプルは、適時保温した後に、氷上で冷却し、AAPF に対する残存活性を 80°C で測定した。その結果、Tk-subtilisin の各温度条件での活性半減期は 80 で >60 分、90°C で 20 分、100°C で 7 分であった (Fig.4-6)。これに対し、subtilisin E の半減期は 60°C でも 18 分程度であることから、Tk-subtilisin の熱安定性が高いことが伺える。

Fig.4-6. Stability against heat inactivation.

Semilog plots of the remaining activity versus the incubation time are shown. Tk-subtilisin was incubated in 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) containing 50 mM CaCl<sub>2</sub> at the concentration of 42 μg/ml at 80°C (●), 90°C (○), or 100°C (□). Aliquots of each sample were withdrawn at the times indicated and the enzymatic activity was determined at 80°C using AAPF as a substrate. The line was obtained by linear regression of the data.



## 4-4 考察

### 4-4-1 超好熱始原菌由来 Subtilase について

超好熱始原菌由来の Subtilase としては 2 種類が存在する。1 つは Tk-subtilisin に代表される Subtilisin family のグループで、もうひとつは pyrolisin に代表される Pyrolysin family に属する。Tk-subtilisin と pyrolisin の活性ドメインのアミノ酸配列は比較的同一性が高いが、Tk-subtilisin と pyrolisin は全体配列の長さが大きく異なる。pyrolisin は 1249 残基からなり、活性ドメインの内部に大きな挿入が存在しており、さらに、N 末端 C 末端ともに配列が伸長している。

このような subtilase は他の超好熱始原菌にも普遍的に存在するのであろうか？ 全ゲノム塩基配列が決定された超好熱始原菌 *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus horikoshii*, *Thermoplasma acidophilum* について、subtilase をコードしている遺伝子を探したところ、*A. pernix* にのみ subtilase の遺伝子が見つかった。この遺伝子から予測される活性ドメインのアミノ酸配列は Tk-subtilisin と 59%、BPN' と 43%、pyrolisin の活性ドメインと 36% の同一性を有していた事から、この遺伝子がコードしている蛋白質は間違い無く Subtilisin family の一員であると言える。超好熱始原菌ゲノム中にある相同性の低い配列は、今回の検索でははじき出されてしまっているが、今回の結果から、Tk-subtilisin もしくは pyrolisin のホモログは超好熱始原菌染色体上に普遍的に存在しているわけでは無い事が示された。始原菌は Crenarchaeota と Euriarchaeota、Korarchaeota にわけられる (64)。*P. aerophilum*、*A. pernix* は Crenarchaeota で *T. kodakaraensis* KOD1 は Euryarchaeota に属する。それぞれが、異なるグループの subtilase を持つことから、始原菌の種類と Subtilase の種類に相関関係は無いと言える。

### 4-4-2 基質結合部位、Ca<sup>2+</sup>結合部位

Subtilase は基質の 5 つのアミノ酸残基 P4、P3、P2、P1、P1' に対し、それぞれ、S4、S3、S2、S1、S1' という 5 つの基質結合部位を有している (105)。基質の特異性は S1 から S4 サイトと基質との相互作用によって決まっている (108)。事実、Subtilisin family と Thermitase family の酵素は S4 と S1 が、疎水性の大きなポケットであるため、基質として P4 と P1 に非極性の大きなアミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基を持つ基質を好むが、概ね基質特異性が広い。基質は P1 の C 末端で切断される事から、S1 についての研究が最も良く進んでいる。subtilisin E において S1 サイトは 2 つの側面 (Ser<sup>125</sup>-Gly<sup>127</sup> と Ala<sup>152</sup>-Gly<sup>154</sup>) と基底部位 (Val<sup>165</sup>-Pro<sup>168</sup>) からできている。Tk-subtilisin に於いても、これらの殆どのアミノ酸残基は保存されている事から、Tk-subtilisin の S1 部位も大き

な疎水ポケットである事が予測される。さらに、subtilisin E において重要性が示されている Glu<sup>156</sup> (109) もまた Tk-subtilisin においても保存されている。この Glu が基質の P1 と接するために、P1 に酸性残基がある場合は分解しない事が分かっている。Tk-subtilisin で AAPD が分解できなかったのはこのためであると言える。このように、Tk-subtilisin と subtilisin E の基質特異性の類似は、基質結合部位 P1 の類似性によると言える。

Tk-subtilisin は Ca<sup>2+</sup> イオンが活性に必須であるが、BPN<sup>7</sup> (110) や Carlseberg (90) の結晶構造解析から Ca1 と Ca2 という Ca<sup>2+</sup>結合部位が明らかにされている。Ca<sup>2+</sup>イオンが強く結合する Ca1 サイトは Gln<sup>2</sup>と Asp<sup>41</sup> と Ca<sup>2+</sup> embracing loop (Asn<sup>76</sup>-Val<sup>81</sup>) のアミノ酸残基により形成されている。Tk-subtilisin においても Ser<sup>78</sup> 以外のアミノ酸はこの領域で保存されている。また、比較的親和性の低い Ca2 (Lys<sup>170</sup>-Val<sup>174</sup>と Glu<sup>195</sup>-Asp<sup>197</sup>) 部分のアミノ酸配列も Tk-subtilisin で保存されている。これらの結果から、バクテリアの subtilisin にある Ca1 と Ca2 は Tk-subtilisin にも存在していると考えられる。

#### 4-4-3 CD スペクトル

Tk-subtilisin は非常に熱に対して安定な subtilisin であるといえる。両者の熱安定性の違いをもたらす、因子を同定するために Tk-subtilisin と subtilisin E の構造比較を行った。両酵素の短波長領域での CD スペクトルを比較したところ、Fig.4-3 のような違いが現れた。これは、Tk-subtilisin と subtilisin E の間には二次構造上の違いがあることを示している。Tk-subtilisin の活性型酵素には、先に述べた pro 配列があるということの他に、一次配列上に subtilisin E にはない挿入配列が 2 箇所存在していることも分かっている。pro 配列を含まない Tk-subtilisin を発現させて CD スペクトルを測定しても、その波形は Fig.4-3 の Tk-subtilisin の波形と変わらなかったことから、この特徴的な波形は 2 つの挿入配列によるものであると考えられる。2 次構造の違いが耐熱性に何らかの影響を与えているとすると、これらの挿入配列が耐熱化に重要なのだといえる。

#### 4-4-4 熱安定性

40°C (111, 112) から 115°C (113) の様々な生育至適温度の生物から subtilase が単離され、研究されている。これらの酵素の比較研究は蛋白質の構造安定性活性の相関関係を明らかにするのに役立つと思われる。しかし、耐熱性 subtilase はバクテリア由来の subtilase にくらべると大きな挿入配列が含まれていたり、末端配列が伸長していたりする事が多く、比べにくいのが現状である。このような配列の挿入や伸長の安定性における役割を明らかにする事が重要で、これらの情報無しに安定性をそれ以外の部分での構造比較から議論する事は全く無



意味である。Tk-subtilisin もまたバクテリアの subtilisin と比べると、挿入配列を 2 つ持っている (Gly<sup>124</sup>-Asp<sup>143</sup> と Ala<sup>258</sup>-Gly<sup>270</sup>) (Fig.4-1)。Tk-subtilisin がバクテリアの subtilase と共通の立体構造を持っているとすると、この挿入配列は分子表面の hD-helix と e4-strand の間のターン及び、hF-helix と hG-helix の間のターンに存在している。これらのループは活性中心とは反対側の比較的近い部分に存在しており、さらにそれらは正負に帯電している事が分かっている。これらの挿入配列は静電的な引力を分子表面で増強して活性を安定化していると考えられる。

また、Tk-subtilisin では 50 番目と 65 番目に Cys が存在している。バクテリアの subtilisin では Cys<sup>50</sup> は Ser (Ser<sup>49</sup>) に置換されており Cys<sup>65</sup> は欠失している。ここに、disulfide 結合が形成されることにより Tk-subtilisin の耐熱性が向上している可能性も否定できない。

#### 4-4-5 *T. kodakaraensis* KOD1 由来プロテアーゼ

これまでの研究から、*T. kodakaraensis* KOD1 の培養上清に 35kDa、44kDa、67kDa の分子量のプロテアーゼが存在する事が分かっている (19)。このうち 44kDa のプロテアーゼは SDS-PAGE のシングルバンドにまで精製され thiole protease として同定された (19)。この酵素の N 末端配列は VEIXNI で至適条件は 110°C、pH7 であった。従って、明らかにこれは Tk-subtilisin とは異なる。しかし、分子量を考えると Tk-subtilisin もまた、44kDa 付近に出ている可能性は捨てられない。今後、Tk-subtilisin の抗体による wesetrn blot ができれば、天然状態における Tk-subtilisin の構造が明らかになるだろう。

#### 4-4-6 pro 配列の役割

subtilisin の pro 配列は一般に分子シャペロンとしてのみならず、活性ドメインの折り畳みを正しくするための molecular imprinting の鑄型ととして働くことが示唆されている。(114, 115)。通常、この pro 配列は折り畳まれたのちに自己分解的もしくは他の分子と協調的に除去される (105)。pro 配列は subtilisin の活性を阻害する事から、この配列の除去は活性型の活性ドメインの精製に必須である (105)。ただし、この配列は活性ドメインに結合していなくても、シャペロン活性を有している (116)。

本研究において、Tk-subtilisin は pro-配列のまま、活性を有する事が示された。Tk-subtilisin と細菌由来 subtilisin のアミノ酸配列を、活性ドメインと pro 配列領域に分けて比較すると、活性ドメインでは 43%から 45%の同一性を有しているのに対し、pro 配列の同一性は 23%から 29%と低い。さらに、Tk-subtilisin の pro 配列の C 末端と活性ドメインの N 末端の間には 13 残基の挿入配列も存

在している。この同一性の低さが Tk-subtilisin において pro 配列が除去されない事の直接の理由となっている。pro 配列を持たない Tk-subtilisin は活性を持たないことから、Tk-subtilisin においては pro 配列が活性に必須であると言える。pro 配列の働きはまだ分かっていないが、Tk-subtilisin の活性中心は別にあることから、pro 配列は、Tk-subtilisin の活性ドメインを活性型に変換する役割を果たしていると考えられる。低温での活性が弱いことから Tk-subtilisin の pro 配列は、超好熱菌酵素に見られる熱成熟のような機構に関係しているのかもしれない。今後、Tk-subtilisin の挿入配列と pro 配列を subtilisin E と系統的に入れ替えてその特性解析を行うことで、Tk-subtilisin の耐熱化機構が明らかにされるだろう。

バクテリア由来 subtilisin (subtilisin E, BPN', carlesberg) は、その構造や機能が良く研究されており、Tk-subtilisin はこれらの酵素と高い (約 45%) 相同性を示すので、Tk-subtilisin とこれらのバクテリア由来 subtilisin をペアとするシステムも、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するシステムとして大変有効であると考えられる。

## 総括

酵素の機能は各酵素分子特有の立体構造によって生み出されており、その構造と機能の相関を理解することが、蛋白質研究あるいは生命科学の大命題である。そのためには、酵素の構造と機能を比較することが有効な手段であるが、比較対象の酵素を実際に取得し系統的に解析した例はまだ少ない。それは、主として、このような解析に適したシステムが、まだ、それ程多くは構築されていないためことによると思われる。超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 の生産する酵素は耐熱性が高く、また、常温菌酵素との相同性がたかいものもあることから、それらは、耐熱性に関する構造と機能の比較に適した材料であると考えられる。実際に、これらを使って有効な比較研究が行えるのか、また、その研究にはどのような可能性があるのかを、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来の酵素のうち、常温性酵素との比較研究に適していると思われる glycerol kinase と subtilisin 型 Ser protease を材料として研究を行った。

第 1 章では超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のグリセロールキナーゼ (GK) をコードする *Tk-glpK* 遺伝子のクローニング及び大腸菌内での発現を行った。この遺伝子の塩基配列から予測される本酵素 (Tk-GK) のアミノ酸配列は、大腸菌由来 GK と 57% の同一性を示した。Tk-GK を大腸菌から精製し、その特性の解析を行ったところ、Tk-GK と大腸菌由来 GK はそのアミノ酸配列の高い同一性にも関わらず、構造と機能にそれぞれ特徴的な違いがみられた。酵素的な性質では、金属イオンの要求性、基質であるヌクレオチド 3 リン酸の選択性が Ec-GK のものとは異なっていた。しかしながら、glycerol、ATP のそれぞれの基質に対する速度論的定数は Ec-GK と大差はなかったため、Tk-GK の本質的な機能は Ec-GK と類似であると言える。ただし、Tk-GK の反応至適温度は 85°C で、100°C 30 分の加熱後の残存活性が 50% あることから、Ec-GK と比べて、その熱安定性は極めて高い酵素であることが明らかになった。そこで、Tk-GK の立体構造モデルを構築し Ec-GK の立体構造と比較したところ、Tk-GK においては分子表面のイオンペアが増強されていることが示唆され、Tk-GK を安定化していることが示唆された。

第 2 章では第 1 章で見つかった Tk-GK に特異的なイオンペアを site-directed mutagenesis によって Ec-GK に導入して、その熱安定化効果を解析した。点変異によってイオンペアを導入した 16 種類の変異 Ec-GK を構築し、熱処理後の残存活性を野生型の Ec-GK と比較したが、飛躍的に安定化した変異酵素は得られず、その多くは野生型よりも不安定化してしまった。Thr196 と Asn480 へ変異を加えた Ec-GK は、それぞれ、わずかに安定化が認められた。これらの変異の効果をより顕著にするために 2 重変異酵素 Ec-T196K/N480D を構築し、その

残存活性の測定を行ったが、経時的な残存活性の低下が観察され Tk-GK やその他の変異酵素と比べて明らかに弱い残存活性を示した。この 2 重変異酵素は一重変異酵素の個々の効果を生かしてより強い安定化効果を期待して作ったものであったが、1 重変異の安定化効果を示唆する様な結果は得られなかった。これは、変異を導入することで生じた不測の相互作用を、Ec-GK 分子が許容しきれなくなり、その結果、不測の相互作用が立体構造の維持や、ドメインモーションの際に望ましくない働きをしているのではないかと予測される。今回構築した、変異はいずれも、分子の表面に存在しており、変異構築によって立体障害を起こすことは考えにくい、しかし、GK はドメインモーションによって構造が大きく揺らぐために、望ましくない相互作用が、変異によって生じてしまった可能性が高い。したがって、たとえ、Tk-GK のアミノ酸配列を参考にしたとしても Ec-GK の耐熱性を向上させる変異をデザインすることは大変難しいことが明らかになった。

第 3 章では DNA shuffling の特性を生かし、Tk-GK と Ec-GK のランダムなキメラ酵素を構築した。野生型の Ec-GK よりも耐熱性の向上したキメラ酵素を選別し、そのアミノ酸配列を比較して、Tk-GK の耐熱化因子となるアミノ酸配列の同定を行った。その結果、Tk-GK の C 末端領域に安定性に関与しているアミノ酸残基が局在している可能性が高いことがわかった。GK の場合は分子量も大きく、分子の揺らぎも大きいことから、安定化をもたらす変異のデザインが難しい。構造は機能に対する要請により、後からついてくるものであると割り切ってしまう、立体構造を仲介せずに配列情報と分子機能の関係を問題にしまう事ができるので、構造機能相関、配列構造相関に関する未熟な部分を問題とせずに分子のデザインができる点で自然界で起こった進化に通じるところが有る。本章の研究では単純に見比べただけでは同定できないような安定化する可能性が有る箇所を突き止めることができた。耐熱性を示す機構については、さらなる変異導入実験や X 線結晶解析などが必要と思われるが、以上の結果は、Tk-GK と Ec-GK をペアとして用いるシステムが超好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するのに大変、適したシステムであることを示している。

第 4 章では、glycerol kinase を用いるシステム以外にも常温菌酵素とペアを組み合わせることにより、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するのに適したシステムを構築することが可能かどうかを調べる目的で、*T. kodakaraensis* KOD1 由来の subtilisin 型酵素 (Tk-subtilisin) 遺伝子のクローニング、組み換え蛋白質の発現、精製、特性解析について研究を行った。

*Tk-subtilisin* は Subtilisin family の一員で 422 アミノ酸残基からなり、その分子量は 43,783 である。pre 配列、pro 配列、活性ドメインから成ることが予測された。その、配列は他の好熱性の Subtilase よりもバクテリア由来の subtilisin

に良く似ていた。しかし、本来分泌蛋白質であり、また、極めて自己分解し易い酵素であったため、これまでは大量に酵素を取得することが困難であった。本研究では、バクテリア由来の subtilisin と同様に Tk-subtilisin を大腸菌菌体内で発現させると封入体として発現するが、これを 8M の尿素存在下で可溶化したのち、活性型酵素へ再構成させることで活性型の subtilisin を大量取得することができた。これを用いて Tk-subtilisin の特性を解析したところ、構造上、Tk-subtilisin では pro 配列を保持したまま活性型酵素を形成していたこと、活性ドメイン中に 2 つの挿入配列が存在していることが分かった。また機能的には、Tk-subtilisin は合成基質である *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide を  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下で切断し、その反応至適条件は pH9.5、80°Cであった。バクテリア由来 subtilisin と同様に幅広い基質特異性を示すが、P1 部位に芳香族アミノ酸やサイズの大きな非極性アミノ酸残基をもつ基質を良く切断する事が分かった。本酵素はバクテリア由来の subtilisin と良く似ているが、熱処理に対する安定性は他と比べて、非常に高く、その活性半減期は 80°Cで 60 分以上、90°Cで 20 分、100°Cで 7 分であった。また、構造上の大きな特徴として、バクテリア型 subtilisin には見られない荷電残基の局在した挿入配列が見られていることから、これらの挿入配列が耐熱性に関与している可能性が考えられる。

pro 配列を持たない Tk-subtilisin は活性を持たないことから、Tk-subtilisin においては pro 配列が活性に必須であると言える。pro 配列の働きはまだ分かっていないが、Tk-subtilisin の活性中心は別にあることから、pro 配列は、Tk-subtilisin の活性ドメインを活性型に変換する役割を果たしていると考えられる。低温での活性が弱いことから Tk-subtilisin の pro 配列は、超好熱菌酵素に見られる熱成熟のような機構に関係しているのかもしれない。今後、Tk-subtilisin の挿入配列と pro 配列を subtilisin E と系統的に入れ替えてその特性解析を行うことで、Tk-subtilisin の熱安定化機構が明らかにされるだろう。

バクテリア由来 subtilisin (subtilisin E、BPN<sup>+</sup>、carlesberg 等) は、その構造や機能が良く研究されており、Tk-subtilisin はこれらの酵素と高い (約 45%) 相同性を示すので、Tk-subtilisin とこれらのバクテリア由来 subtilisin をペアとするシステムも、好熱菌酵素の耐熱化機構を解析するシステムとして大変有効であると考えられる。

熱安定性に焦点をあてた比較研究に於いては、比較する対象酵素の吟味が重要である。基本的に構造が類似している事、基本的に活性は同じであるが、熱安定性には十分な差があること、また、活性としてその安定性の差を簡便に検出できること、安定に酵素を取得できることなどが必要である。本研究で扱った Tk-GK と Tk-subtilisin はこれらの条件に適した酵素であった。さらに、GK は血中中性脂肪を定量するための診断薬として実用化されており、その安定化が

望まれている酵素である。また、subtilisin も洗剤、食品加工、下水処理、皮革加工など多くの分野ですでに利用されており、その熱安定化の有用性は大きい。

蛋白質研究においては、その立体構造と機能の相関を明らかにすることが重要である。しかし、蛋白質の立体構造や機能は、蛋白質の構成要素であるアミノ酸や周りの環境からの相互作用などが複雑にいきり混ざって構成されている。それが、蛋白質と言う、複雑系研究の難しい点であり、また、面白いところでもある。複雑で難しい蛋白質と言う課題をどのような戦略で研究していくのか、その答えの一つが「自然に学ぶ」ということではないかと考えている。自然のなかには長い進化の歴史を経て培われてきた、人智を超えたアイデアがたくさんつまっている。人類の叡智が自然の神秘にどこまで迫ることができるのか分からないが、蛋白質を通して自然に学ぶということの一端を本研究で開くことができたと考えている。

### 参考文献

1. Lin, E. C. C. (1976) *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 535-578
2. Pettigrew, D. W., Ma, D-P., Conrad, C. A., and Johnson, J. R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 135-139
3. Holmberg, C., Beijer, L., Rutberg, B. and Rutberg, L. (1990) *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2367-2375
4. Schweizer, H. P., Jump, R., and Po, C. (1997) *Microbiology* **143**, 1287-1297
5. Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J., and Claiborne, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14166-14174
6. Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T. and Ruis, H. (1993) *Curr. Genet.* **24**, 21-25
7. Sargent, C. A., Young, C., Marsh, S., Ferguson-Smith, M. A., and Affara, N. A. (1994) *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1317-1324
8. Thorner, J. W., and Paulus, H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3922-3932
9. de Riel, J. K., and Paulus, H. (1978) *Biochemistry* **17**, 5134-5140
10. de Riel, J. K., and Paulus, H. (1978) *Biochemistry* **17**, 5141-5146
11. Novotny, M. J., Frederickson, W. L., Waygood, E. B., and Saier, M. H., Jr. (1985) *J. Bacteriol.* **162**, 810-816
12. Liu, W. Z., Faber, R., Feese, M., Remington, S. J., and Pettigrew, D. W. (1994) *Biochemistry* **33**, 10120-10126
13. Thorner, J. W., and Paulus, H. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 3885-3894
14. Pettigrew, D. W., Yu, G-J. and Liu, Y. (1990) *Biochemistry* **29**, 8620-8627
15. Hurley, J. H., Faber, H. R., Worthylake, D., Meadow, N. D., Roseman, S., Pettigrew, D. W., and Remington, S. J. (1993) *Science* **259**, 673-677
16. Feese, M., Pettigrew, D. W., Meadow, N. D., Roseman, S., and Remington, S. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3544-3548
17. Woese, C. R., and Fox, G. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5099
18. Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579

19. Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanaka, T. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4559-4566 *Ferment. Bioeng.* **82**, 224-232
20. Imanaka, T., Lee, S., Takagi, M., and Fujiwara, S. (1995) *Gene* **164**, 153-156
21. Fujiwara, S., Lee, S., Haruki, M., Kanaya, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (1996) *FEBS Lett.* **394**, 66-70
22. Tachibana, Y., Leclere, M. M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (1996) *J.*
23. Jongsareejit, B., Rahman, R. N. A., Fujiwara, S., and Imanaka, T. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **254**, 635-642
24. Rashid, N., Morikawa, M., and Imanaka, T. (1997) *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 412-418
25. Siddiqui, M. A., Fujiwara, S., and Imanaka, T. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **254**, 433-439
26. Rahman, R. N. A., Jongsareejit, B., Fujiwara, S., and Imanaka, T. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2472-2476
27. Yamamoto T, Shiraki K, Fujiwara S, Takagi M, Fukui K, Imanaka T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun.* **265**, 1, 57-61.
28. Rashid N, Morikawa M, Imanaka T. (1995) *Gene.* **166**, 139-43.
29. Rashid N, Morikawa M, Nagahisa K, Kanaya S, Imanaka T. (1997) *Nucleic Acids Res.* **15**, 25, 719-26.
30. Hashimoto H, Matsumoto T, Nishioka M, Yuasa T, Takeuchi S, Inoue T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Kai Y. (1998) *J Biochem (Tokyo).* **125**, 6, 983-6.
31. Rahman RN, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T. (1998) *Mol Gen Genet.* **257**, 3, 338-47.
32. Hashimoto H, Nishioka M, Inoue T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Kai Y. (1998) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **1**, 54(2 (Pt 6)):1395-6.
33. Haruki M, Hayashi K, Kochi T, Muroya A, Koga Y, Morikawa M, Imanaka T, Kanaya S. (1998) *J Bacteriol.* **180**, 23, 6207-14.
34. Ezaki S, Maeda N, Kishimoto T, Atomi H, Imanaka T. (1999) *J Biol Chem.* **19**, 274, 8, 5078-82.
35. Yan Z, Fujiwara S, Kohda K, Takagi M, Imanaka T. (1997) *Appl Environ*



*Microbiol.* **63**, 2, 785-9.

36. Higashibata H, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun.* **258**, 2, 416-24.
37. Nagahisa K, Ezaki S, Fujiwara S, Imanaka T, Takagi M. (1999) *FEMS Microbiol Lett.* **1**, 178, 183-90.
38. Matsuda T, Morikawa M, Haruki M, Higashibata H, Imanaka T, Kanaya S. (1999) *FEBS Lett.* **457**, 1, 38-42.
39. Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, Fukui T, Takagi M, Imanaka T. (1999) *Appl Environ Microbiol.* **65**,12, 5338-44.
40. Jeon SJ, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T. (1999) *Mol Gen Genet.* **262**, 3, 559-67.
41. Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**,19, 4409-12.
42. Tang X, Ezaki S, Fujiwara S, Takagi M, Atomi H, Imanaka T. (1999) *Mol Gen Genet.* **262**, 4-5, 815-21.
43. Nakatani M, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T. (2000) *J Bacteriol.* **182**, 22, 6424-33
44. Imanaka, T., Tanaka, T., Tsunekawa, H., and Aiba, S., (1981) *J. bacteriol.*, **270**, 776-786
45. Miller, J. H. (ed) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, p. 433, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
46. Grunstein, M., and Hogness, D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965
47. Kim, D-J., Morikawa, M., Takagi, M., and Imanaka, T (1995) *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 87-94
48. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
49. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
50. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
51. Bergmeyer, H. U., Holz, G., Kauder, E. M., Mollering, H. and Wieland, O. (1961)

*Biochem. Z.* **333**, 471-480

52. Nakamura, H., Katayanagi, K., Morikawa, K., and Ikehara, M. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1817-1823
53. Tanimura, R., Kidera, A., and Nakamura, H. (1994) *Protein Sci.* **3**, 2358-2365
54. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T., and Case, D. (1986) *J. Comput. Chem.* **7**, 230-252
55. Morikami, K., Nakai, T., Kidera, A., Saito, M., and Nakamura, H. (1992) *Comput. & Chem.* **16**, 243-248
56. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, M. J. (1982) *EMBO J.* **1**, 945-951
57. Fry, D. C., Kuby, S. A., and Mildvan, A. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 907-911
58. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P. C., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., and Hermodson, M. A. (1986) *Nature*, **323**, 448-450
59. Wu, C.-S. C., Ikeda, K., and Yang, J. T. (1981) *Biochemistry* **20**, 566-570
60. Tsunasawa, S., Stewart, J. W., and Sherman, F. S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5382-5391
61. Hayashi, S. and Lin, E. C. C. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1030-1035
62. Meiering, E. M., Serrano, L., & Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 585-589.
63. Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R., & Matthews, B. W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 452-456.
64. Kanaya, S., Oobatake, M., and Liu, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32729-32736
65. Bublitz, C., and Kennedy, E. P. (1954) *J. Biol. Chem.* **211**, 951-961
66. Bergmeyer, H. U., Holz, G., Kauder, E. M., Mollering, H. and Wieland, O. (1961) *Biochem. Z.*, **333**, 471-480
67. Huang, H-S., Yoshida, T., Meng, Y., Kabashima, T., Ito, K., Nishiya, Y., Kawamura, Y., and Yoshimoto, T. (1997) *J. Ferment. Bioeng* , **83**, 328-332
68. Rashid, N., Morikawa, M., Nagahisa, K., Kanaya, S., and Imanaka, T. (1997)

*Nucl. Acid. Res.*, **25**, 719-726

69. Yip, K. S. P., and Rice, D. W. (1995) *Structure*, **3**, 1147-1158
70. Knapp, S., de Vos, W. M., Rice, D., and Ladenstein, R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **267**, 976-932
71. Hennig, M., Darimont, B., Sterner, R., Kirschner, K., and Jansonius, J. N. (1995) *Structure*, **3**, 1295-1306
72. Barlow, D. W., and Thornton, J. M. (1983) *J. Mol. Biol.* **168**, 867-885
73. Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K., & Suzuki, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24287-24294
74. Kimura, S., Nakamura, H., Hashimoto, T., Oobatake, M. & Kanaya, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21535-21542
75. Matthews, B. W., Nicholson, H., & Becktel, W. J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6663-6667
76. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
77. Larson, T. J., Cantwell, J. S., and van Loo-Bhattacharya, A. T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6114-6121
78. Holmberg, C. and Rutberg, B. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* **58**, 151-156
79. Koga, Y., Masaaki, M., Haruki, M., Nakamura, H., Imanaka, T., Kanaya, S. (1998) *Protein Engineering* **11**, 1219-1227
80. Stemmer, W.P.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751
81. Stemmer, W.P.C. (1994) *Nature* **370**, 389-391
82. Chen, K. and Arnold, F.H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5618-5622
83. Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. (1999) *Gene* **236**, 159-167
84. Kikuchi, M., Ohnishi, K., Harayama, S. (2000) *Gene* **243**, 133-137
85. Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., Silver, S., Stemmer, W.P.C. (1998) *Nature* **391**, 288-291
86. Zhao, H. and Arnold, F. H. (1997) *Nucleic Acids Research* **25**, 6, 1307-1308
87. Stahl, M. L. and E. Ferrari. (1984) *J. Bacteriol.* **158**:411-418.
88. Wells, J. A., E. Ferrari, D. J. Henner, D. A. Estell, and E. Y. Chen. (1983) *Nucleic*

Acids Res. **11**:7911-7925.

89. Jacobs, M., M. Eliasson, M. Uhlen, and J. I. Flock. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**:8913-8926.
90. Bode, W., E. Papamokos, and D. Musil. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**:673-692.
91. Jain, S. C., U. Shinde, Y. Li, M. Inouye, and H. M. Berman. (1998) *J. Mol. Biol.* **284**:137-144.
92. Wright, C. S., R. A. Alden, and J. Kraut. (1969) *Nature* **221**:235-242.
93. Takagi, H. (1993) *Int. J. Biochem.* **25**:307-12.
94. Wells, J. A., and D. A. Estell. (1988) *Trends Biochem. Sci.* **13**:291-297.
95. Eder, J., M. Rheinneckel, and A. R. Fersht. (1993) *J. Mol. Biol.* **233**:293-304.
96. Inouye, M. (1991) *Enzyme* **45**:314-321.
97. Shinde, U., and M. Inouye. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* **379**:147-154.
98. Good, T. W., and R. A. Morton. (1946) *Biochem. J.* **40**:628-632.
99. Volkl, P., P. Markiewicz, K. O. Stetter, and J. H. Miller. (1994) *Protein Sci.* **3**:1329-1340.
100. Kleine, R. (1982) *Acta Biol. Med. Ger.* **41**:89-102.
101. Skaugen, M., C. I. Abildgaard, and I. F. Nes. (1997) *S. Mol. Gen. Genet.* **253**:674-686.
102. Fuller, R. S., A. J. Brake, and J. W. Thorner. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:1434-1438.
103. Voorhorst, W. G. B., R. I. L. Eggen, A. C. M. Geerling, C. Platteeuw, R. J. Siezen, and W. M. de Vos. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**:20426-20431.
104. Ikemura, H., and M. Inouye. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:12959-12963.
105. Siezen, R. J. and J. A. M. Leunissen. (1997) *Protein Sci.* **6**:501-523.
106. Estell, D. A., T. P. Graycar, J. V. Miller, D. B. Powers, J. P. Burnier, P. G. Ng, and J. A. Wells. (1986) *Science* **233**:659-663.
107. Mayr J., A. Lupas, J. Kellermann, C. Eckerskorn, W. Baumeister, and J. Peters. (1996) *Curr. Biol.* **6**:739-749.
108. Gron, H., M. Meldal, and K. Breddam. (1992) *Biochemistry* **31**:6011-6018.

109. Wells, J. A., B. C. Cunningham, T. P. Graycar, and D. A. Estell. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5167-5171.
110. Bott, R., M. Ultsch, A. Kossiakoff, T. Graycar, B. Katz, and S. Power. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:7895-7906.
111. Davail, S., G. Feller, E. Narinx, and C. Gerday. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:17448-17453.
112. Kulakova, L., A. Galkin, T. Kurihara, T. Yoshimura, and N. Esaki. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:661-617.
113. Eggen, R., A. Geerling, J. Watts, and W. D. de Vos. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:17-20.
114. Shinde, U. P., J. J. Liu, and M. Inouye. (1997) *Nature* **389**:520-522.
115. Shinde, U., X. Fu, and M. Inouye. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:15615-15621.
116. Fu, X., M. Inouye, and U. Shinde. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:16871-16878.

## 本稿に関する論文

1. **Koga, Y.**, Morikawa, M., Haruki, M., Nakamura, H., Imanaka, T., Kanaya, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: Cloning of gene, overexpression in *E. coli*, and characterization of the enzyme. *Protein Eng.* **11**, 1219-1227 (1998).
2. **Koga, Y.**, Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S. Thermal stabilities of chimeric enzymes between thermophilic and mesophilic glycerol kinase constructed by DNA shuffling. *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2001).
3. Kannan, Y., **Koga, Y.**, Inoue, Y., Haruki, M., Takagi, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S. Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, submitted (revised).

## その他の論文

1. Haruki, M., Hayashi, K., Kouchi, T., Muroya, A., **Koga, Y.**, Morikawa, M., Imanaka, T., Kanaya, S. Cloning of a Ribonuclease HII gene from a hyperthermophilic archaeon: Purification and characterization of a recombinant enzyme. *J. Bacteriol.* **180**, 6207-6214 (1998).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻 金谷茂則 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究をすすめる上で、多大な御指導と適切な御助言を直接頂きました大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻 森川正章 助教授、春木 満 学内講師に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、格別の御配慮と有益な御助言を頂いた、大阪大学大学院工学研究科応用生物工学科 室岡義勝 教授、大阪大学大学院工学研究科物質・生命工学専攻 宮田幹二 教授、京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 今中忠行 教授、大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻 高木昌宏 助教授、藤原伸介 先生、大阪大学大学院理学研究科 中村春木 教授に深く感謝致します。

有益な研究生活を共に過ごした天田啓 先生、高木英典 先生、加藤智久 先生、平野展孝 先生、大谷直人 先生に感謝の意を表するとともに今後の御活躍をお祈り致します。また、本研究の共同研究者である河南裕史氏に感謝致します。

最後に、公私にわたり様々な面で暖かい御配慮を頂いた極限生命工学講座の皆様心から感謝いたします。