

氏名(本籍) 前^{まえ} 田^だ 浩^{ひろし}

学位の種類 博士 (農学)

学位記番号 農博第665号

学位授与年月日 平成13年3月26日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻
(博士課程)

学位論文題目 セリンプロテアーゼのアルカリ耐性機構

論文審査委員 (主査) 教授 中 島 佐
教授 神 尾 好 是
教授 五 味 勝 也

論文内容要旨

セリンプロテアーゼのアルカリ耐性機構

序論

現在までにスブチリシンをより有用な酵素として利用するために酵素の安定性を高める試みが数多く行なわれている。しかしながらその殆どは、物理的な架橋等により直接的に分子構造の補強をするものであった。これらの研究は本質的な分子構造の安定性を付与する要因の決定を研究の主眼に置いてはいない。さらに特殊な環境である pH 12 といった高アルカリ条件でのタンパク質の挙動についての研究は殆どなされていない。

そこで本研究ではアルカリ耐性の異なる subtilisin を用いて、アルカリ耐性機構を系統的に解明することを目的として、まず構造変化に焦点をあてて研究を進め、subtilisin のアルカリ耐性機構モデルを構築し、その証明を行なった。

第 1 章 subtilisin のアルカリ耐性機構モデルの構築

一般的に subtilisin はアルカリ条件のみで生育し中性条件では生育できない好アルカリ性 *Bacillus* 由来のアルカリ subtilisin と、中性 *Bacillus* 由来の中性 subtilisin に分類される。本研究室では Tsuchida、Yamagata らにより好アルカリ性 *Bacillus* より subtilisin Sendai (Sendai) と subtilisin ALP I (ALP I) の 2 種の subtilisin を見いだしてきた。しかし一次構造上 ALP I はアルカリ subtilisin と中性 subtilisin の両グループに対して 60 % 前後の相同性しか示さないことから、subtilisin はアミノ酸配列からもアルカリ subtilisin、中性 subtilisin、subtilisin ALP I の 3 つのグループに分けられる。アルカリ subtilisin はアルカリ耐性に優れるが、中性 subtilisin と ALP I はアルカリに対して感受性である (Fig. 1)。本研究室で見出された Sendai は

アルカリ subtilisin に含まれ、pH 12 で 12 時間処理しても活性を維持するのに対し、ALP I は 2 分以内に分解され失活する (Fig. 2)。

アルカリ条件下における subtilisin の構造変化を明らかにするために、Sendai と ALP I 及びコントロールとして本研究室 Kamata らによって見出された、アルカリ耐性を持たない中性 subtilisin である subtilisin NAT (NAT) (Fig. 1) の 3 種の subtilisin を用いて研究を進めた。まず今後の分光学的実験を行なうにあたり、分解産物の生成を抑える必要があることから、セリンプロテアーゼの不可逆的阻害剤である diisopropyl fluorophosphate (DFP) で修飾した不活性型酵素を調製した (DIP-Sendai、DIP-ALP I、DIP-NAT)。いずれの不活性型酵素もアルカリ条件下で分解されなかったことから、subtilisin がアルカリ条件下で自己消化によって失活することを明らかにした。

次にアルカリ耐性の差はアルカリ条件下に曝された時の構造変化の違いにあると考え、分子全体の高次構造の変化を反映する円偏光二色性 (CD) スペクトルの解析、分子表面構造の変化を反映する分子内 Trp 蛍光の解析を行った。CD スペクトルを測定した結果 DIP-ALP I と DIP-Sendai はアルカリ条件下に曝してもスペクトルに変化がみられなかった (Fig. 3A, 3B)。しかし DIP-NAT はアルカリ条件下で経時的に光学活性を失った (Fig. 3C)。分子内 Trp 蛍光の変化において、蛍光強度の減少は分子表面を形成するアミノ酸側鎖のイオン化を、最大蛍光波長の長波長側への移行は Trp 残基の溶媒表面への移行を含む構造変化を表す。DIP-Sendai においては経時的な蛍光強度の変化及び最大蛍光波長の長波長側への移行は観察されなかった (Fig. 4B)。DIP-ALP I は pH 12.0 に曝すことで速やかに蛍光強度が減少し、最大蛍光波長の長波長側への移行も観察された (Fig. 4A)。DIP-NAT においては蛍光強度の減少はみられたが、最大蛍光波長の長波長側への移行は観察されなかった (Fig. 4C)。

次に ALP I 及び NAT の中性条件からアルカリ条件への移行に伴う構造変化が可逆的であるかどうかを確認した。その結果、ALP I は CD スペクトルの変化 (Fig. 5A) 及び分子内 Trp 蛍光の変化 (Fig. 6A) から可逆性が確認された。またアルカリ処理後に中性処理した DIP-ALP I の活性型 ALP I

による切断も観察されなかったことから (Fig. 7A) アルカリ変性を受ける前の自己消化を受けない構造に戻ったことが示された。一方、NAT のアルカリ処理による構造変化には可逆性がないことが分光学的解析により確認された (Fig. 5B, 6B)。特に CD スペクトルより NAT は遠紫外領域での光学活性を完全に失い、二次構造までランダムに変化していることが示唆された。また活性型 NAT による切断が観察されたことから (Fig. 7B)、NAT はアルカリ変性後 pH を中性に戻すと NAT とは全く異なったランダム構造を持つタンパク質として存在していることが示唆された。

本章で得られた結果より、以下のような subtilisin の構造上の特徴を明らかにした (Fig. 8)。

- 1) Sendai はアルカリ条件下においても高次構造及び分子表面構造が変化しない。
- 2) ALP I はアルカリ条件下での可動性に富む分子表面構造を有しているが、アルカリ変性は高次構造までは及ばない。よって分子表面領域における構造変化に伴う自己消化を受ける部位 (領域) の露出が ALP I における自己消化の律速段階となる。
- 3) NAT の分子構造はアルカリ条件下で分子表面領域、三次構造、二次構造の順に変性し、自己消化は構造変化の早い段階で起きている。

第 2 章 subtilisin ALP I の自己消化部位の決定

第 1 章の結果から、ALP I が好アルカリ性 *Bacillus* の生産するセリンプロテアーゼであるのにも関わらず、アルカリ条件下で速やかに失活するプロセスは、(1) 分子表面領域の構造変化、(2) (1) の変化により自己消化を受ける部位が分子表面に露出することによって起こる分解 の 2 ステップに分けて考えることができる。そこで第 2 章では直接的なアプローチとして、(2)

のステップを抑えることによる ALP I のアルカリ耐性の変化を明らかにした。

アルカリ条件下での自己消化断片の取得にあたっての問題点は ALP I の自己消化反応が非常に速く、自己消化断片の蓄積がみられないことであった (Fig. 9A)。そこで様々な低温域で自己消化反応を行ない、5°C のアルカリ処理で高分子自己消化断片が蓄積することが分かった (Fig. 9B)。次にこの自己消化断片の精製を試み、26.7 kDa と 25.6 kDa の断片の取得に成功した (Fig. 10)。両断片の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、どちらも Gln¹⁸ と Gly¹⁹ の間で切断されていた (Table 1)。また分子量から 25.6 kDa の断片は C 末端を含んでいないと考えられた。さらに 26.7 kDa よりも大きな断片が無いことから、ALP I のアルカリ条件下での自己消化は Gln¹⁸ と Gly¹⁹ の間の切断から始まるということが示唆され、ALP I と高い相同性を持つ M-protease を基にした立体構造モデルから、切断部位が ALP I の分子表面に存在する N 末端の α -helix に続く loop 構造上にあることを明らかにした (Fig. 11)。

次に切断点に対して部位特異的変異を導入した。インスリン B 鎖に対する基質特異性から (Fig. 12)、P₁ 位にあたる Gln¹⁸ を Glu、Gly、Ser、Ala に置換した (Fig. 13)。各変異体は *B. subtilis* KN2 株を宿主として菌体外に発現させた (Fig. 14)。培養上清より全ての変異体酵素を電気泳動的に均一なバンドが得られるまで精製し (Fig. 15)、各種基質に対する比活性を測定した (Table 2)。

全ての変異体はアルカリ耐性を付与されてはいなかったが (Fig. 16)、各変異体の自己消化断片を取得し (Fig. 17)、N 末端アミノ酸配列を確認したところ、いずれの変異体の自己消化断片も ALP I の N 末端アミノ酸配列と一致する配列を有していた (Table 3)。

以上の結果と第 1 章より、ALP I のアルカリ条件下における N 末端及び C 末端領域を含む分子表面の構造変化が自己消化の要因であると結論づけた。

第3章 N末端及びC末端領域とアルカリ安定性の相関

第2章で構築された自己消化のメカニズムを立体構造にあてはめてみると、分子表面に存在するN末端とC末端の α -helix間の相互作用の有無が、subtilisin分子の表面構造の可動性を制限していると考えられた。

そこでSendaiとALP Iの両末端領域を入れ換えたキメラ酵素を取得し、各々のアルカリ耐性を確認した。入れ換える領域はSendaiとALP Iの立体構造モデル (Fig. 19, 20) を考慮に入れ、Fig. 21の様にキメラ遺伝子を構築した。すべてのキメラ酵素は*B. subtilis* KN2株を宿主として菌体外に発現させ (Fig. 22)、培養上清中より精製した (Fig. 23, Table 4)。

N末端を置き換えたキメラ酵素 (Sendai-NAIp, ALP I-NSen) についてアルカリ耐性を確認した (Fig. 24)。Sendai-NAIpはwt Sendaiとは異なりアルカリ耐性を失っていた (Fig. 24)。ALP I-NSenはwt ALP Iとは異なりアルカリ耐性が付与されていた (Fig. 24)。以上の結果から、即ちAsn¹-Arg²⁷のN末端領域がSendaiの持つアルカリ耐性に重要な領域であることが明らかとなり、この領域の導入が異種タンパク質へのアルカリ耐性の付与に有効であることが示唆された。

SendaiのC末端2領域をALP Iに置き換えたキメラ酵素 (SSA, SAA, SAS) についてアルカリ耐性を確認した (Fig. 25)。SSA, SAAはwt Sendaiと異なりアルカリ耐性が失われていたが、SASはwt Sendaiとほぼ同等のアルカリ耐性を有していた (Fig. 25)。即ちVal²⁶²-Arg²⁶⁹のC末端領域がSendaiの持つアルカリ耐性に重要な領域であることが示唆された。

考察

本研究はアルカリ耐性の異なる subtilisin を研究材料とし、そのアルカリ耐性機構を明らかにしようとしたものである。分光学的手法を用いて、subtilisin のアルカリ耐性機構のモデルを構築した。その結果、タンパク質分子にアルカリ耐性を付与しているのは、構造変化を含めたアルカリ変性を受けない分子表面領域の存在であることが示唆された。

次に ALP I の自己消化部位を決定し、被切断点に部位特異的変異を導入した。しかし自己消化は抑えられなかった。その原因として、導入した変異が ALP I の構造上の特徴である分子表面構造の可動性を制限するものではなかったことが挙げられ、分子表面領域の欠失・可動性を抑えることがアルカリ耐性の付与に有効であることが示唆された。

次に ALP I の自己消化の初期の切断は N 末端領域と C 末端領域で起こるといふこと、また両領域を形成する α -helix が互いに隣接していることに注目し、 α -helix 間の相互作用の有無が、subtilisin 分子の表面構造の可動性を制限していると仮定した。そこで本研究ではアルカリ耐性の全く異なる Sendai と ALP I の間で両末端領域のキメラ酵素を作製しアルカリ耐性との相関を明らかにし、モデル上で Sendai と ALP I の N 末端及び C 末端 α -helix を含む分子表面構造の比較を行なった (Fig. 26)。隣接する α -helix 間の位置関係を比較すると、Sendai の方が両末端 α -helix の接合面を形成する疎水性アミノ酸および溶媒表面を形成するアミノ酸の違いにより ALP I に比べて近接している。疎水性アミノ酸については両方で差はないが、bulky なアミノ酸が ALP I では多く出現する。即ち Sendai では分子表面のコンパクトなパッキングが可能となり、その結果として水酸化物イオンの分子内部への浸透を妨げていると考えられる。また溶媒表面を形成するアミノ酸は、Sendai よりも ALP I の方が親水性アミノ酸が多く存在し、溶媒との接触を許しており、ALP I の分子表面構造が反応性に富むのは、溶媒との高親和性によるものであるといえる。

本研究の結論として、タンパク質分子に構造上のアルカリ耐性を付与する

要因として以下のモチーフを提唱する。

(1) 側鎖の小さな疎水性アミノ酸同士の相互作用によって空間が充填された分子表面領域の存在。

(2) 親水性が低く、溶媒と分子内部を隔離する溶媒表面の存在。

原著論文

Maeda, H., Mizutani, O., Yamagata, Y., Ichishima, E., Nakajima, T. Alkaline-Resistance Model of Subtilisin ALP I, a Novel Alkaline Subtilisin. (Submitted to *Journal of Biochemistry*)

Maeda, H., Yamagata, Y., Ichishima, E., Nakajima, T. Identification of *N*-terminal Autodigestion Target Site in Subtilisin ALP I. (Submitted to *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*)

Maeda, H., Yamagata, Y., Ichishima, E., Nakajima, T. Effect of *N*-terminal and *C*-terminal Region in Subtilisin Sendai and ALP I on Alkaline-stability (In preparation)

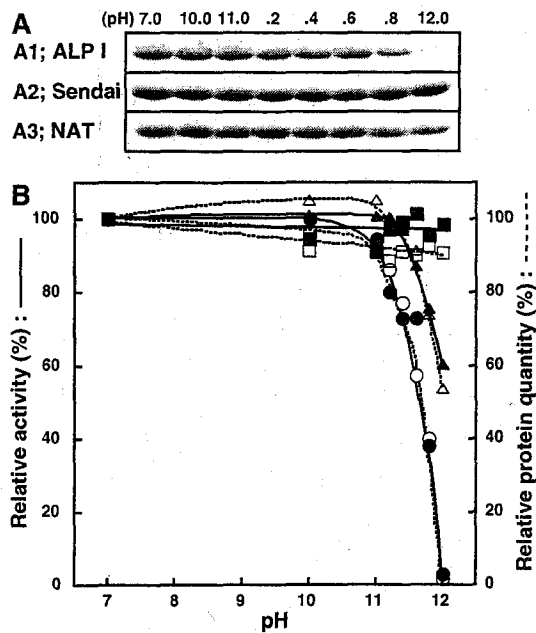


Fig. 1 Effect of pH on Stability of Subtilisins, ALP I, Sendai and NAT at 30°C for 10 min

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Subtilisins were incubated at pH 7.0, 10.0, 11.0, 11.2, 11.4, 11.6, 11.8, and 12.0 at 30 °C for 10 min and subsequently subjected to SDS-PAGE (A): A1, subtilisin ALP I; A2, subtilisin Sendai; A3, subtilisin NAT. The pH dependence of the relative activity and the relative protein quantity is indicated in B. The values shown are relative, compared with those at pH 7.0. Circles, squares, and triangles represent data for ALP I, Sendai, and NAT, respectively. The solid lines and black-filled symbols indicate the relative activity at pH 10.0 with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, conducted at 30 °C. The dashed lines and open symbols indicate the relative protein quantity, analyzed with NIH-Image 1.62 soft.

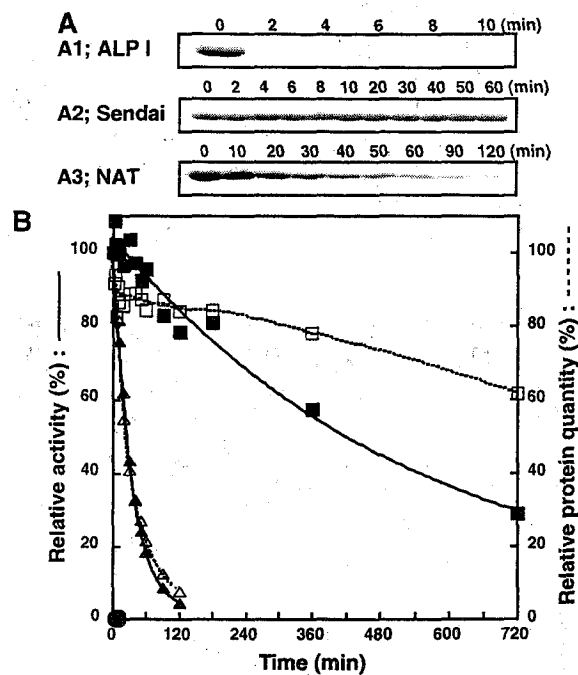


Fig. 2 Stability of Subtilisins, ALP I, Sendai and NAT at 30°C, pH 12.0

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Subtilisins were incubated at pH 12.0 at 30 °C for ALP I; 2, 4, 6, 8 and 10 min, Sendai; 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 and 360 min, NAT; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 and 120 min and subsequently subjected to SDS-PAGE (A): A1, subtilisin ALP I; A2, subtilisin Sendai; A3, subtilisin NAT. The time dependence of the relative activity and the relative protein quantity is indicated in B. The values were relatively shown as compared with them at initial time. Circles, squares, and triangles represent data for ALP I, Sendai, and NAT, respectively. The solid lines and black-filled symbols indicate the relative activity at pH 10.0 with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, conducted at 30 °C. The dashed lines and open symbols indicate the relative protein quantity, analyzed with NIH-Image 1.62 soft.

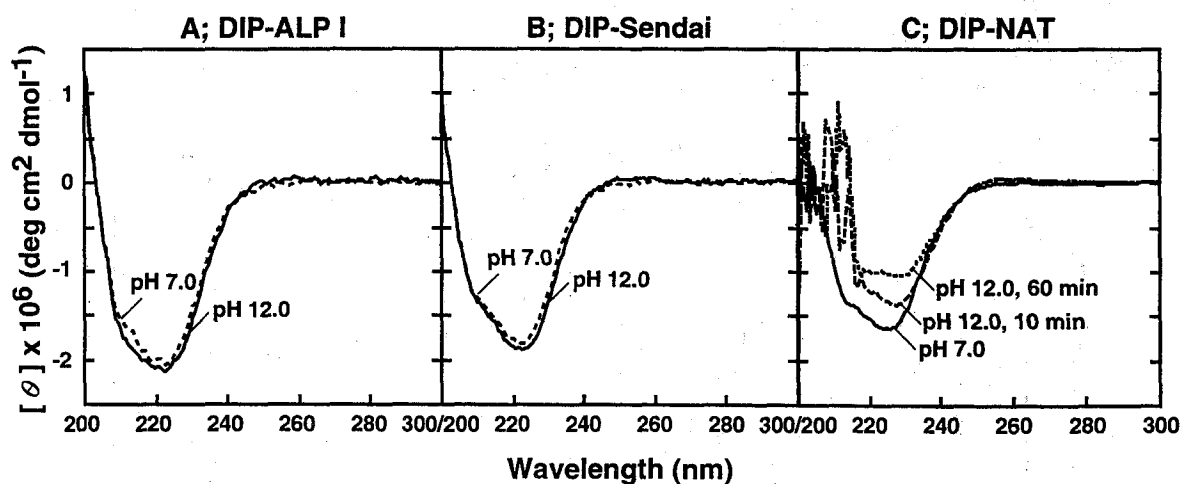


Fig. 3 CD Spectra of DIP-subtilisins: DIP-ALP I, DIP-Sendai, and DIP-NAT at pH 7.0 and 12.0

The protein concentrations were kept at 7.5 μM for all experiments. The cell path length was 1 mm. The DIP-subtilisins were incubated at pH 7.0 and 12.0 at 30 °C for 10 min (DIP-NAT was incubated for 60 min) and subsequently subjected to CD measurements. Panel A, DIP-ALP I; panel B, DIP-Sendai; panel C, DIP-NAT at both pHs, respectively. Dashed and solid lines represent data at pH 7.0 and 12.0.

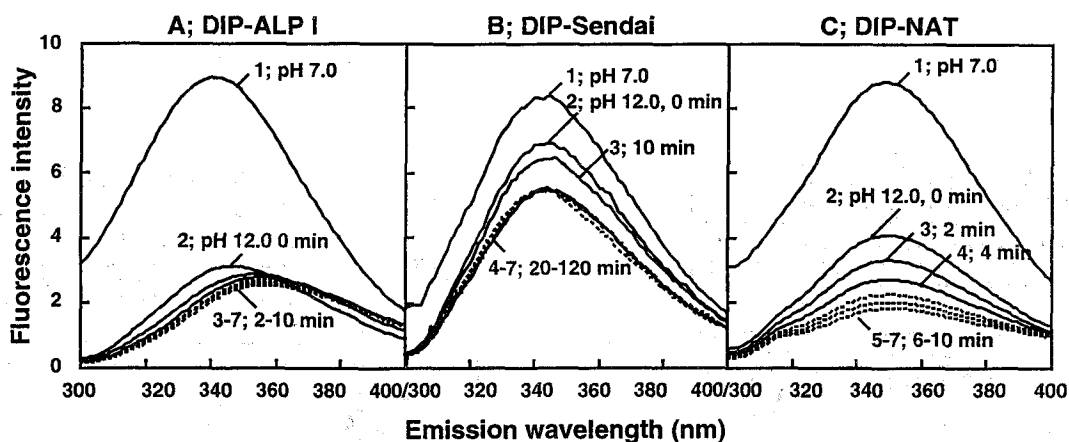


Fig. 4 Fluorescence Emission Spectra of Tryptophans in DIP-subtilisins: DIP-ALP I, DIP-Sendai, and DIP-NAT at pH 7.0 and 12.0

All experiments were performed with a protein concentration of 0.05 mg/ml. Excitation wavelength was 283 nm. Fluorescence emission wavelength was scanned between 300 and 400 nm; cell path length was 10 mm. DIP-subtilisin was incubated at pH 12.0 at 30 °C and subsequently subjected to fluorescence measurements: panel A, DIP-ALP I; panel B, DIP-Sendai; panel C, DIP-NAT at the pHs indicated. Curves 2-7 in panel A represent the fluorescence emission spectra of the protein incubated for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 min, and curves 2-7 in panel B show the emission spectra of the protein incubated for 0, 10, 20, 30, 60, and 120 min, and curves 2-7 in panel C are the emission spectra of the protein incubated for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 min. Curve 1 represents the fluorescence spectra of proteins incubated at pH 7.0.

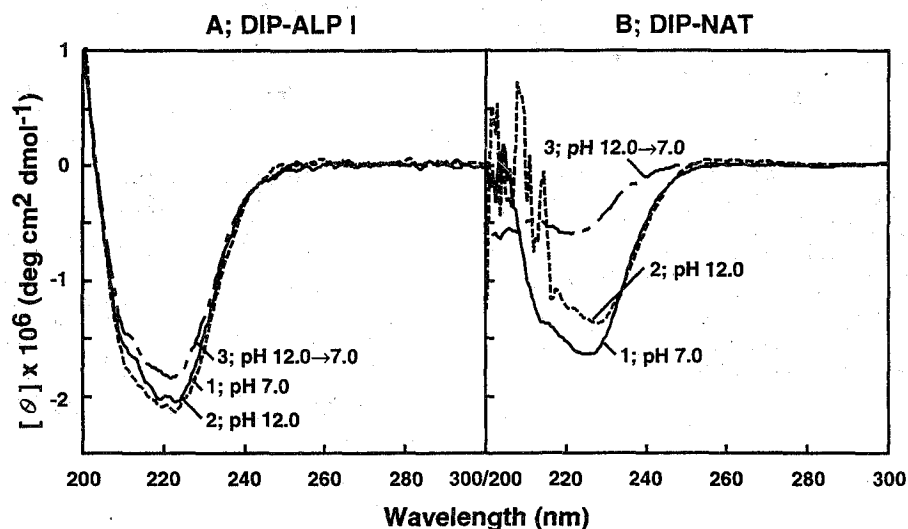


Fig. 5 Differences in the CD Spectra of Native, Alkaline-denatured, and Alkaline-neutralized DIP-ALP I and DIP-NAT

DIP-ALP I and DIP-NAT concentrations were kept at 7.5 μM for all experiments. The cell path length was 1 mm. Curves 1, 2, and 3 represent the spectra of native (pH 7.0), alkaline-denatured (pH 12.0), and alkaline-neutralized DIP-ALP I and DIP-NAT.

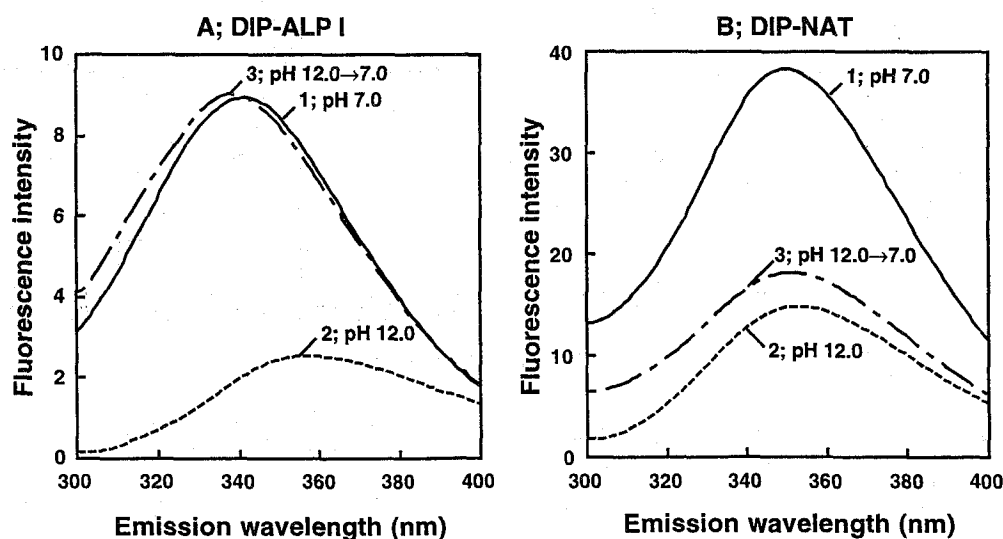


Fig. 6 Differences in the Fluorescence Emission Spectra of Tryptophans in Native, Alkaline-denatured, and Alkaline-neutralized DIP-ALP I and DIP-NAT

All experiments were performed with a protein concentration of 0.05 mg/ml. Excitation wavelength was 283 nm; emission wavelength was 300-400 nm. The cell path length was 10 mm. Curves 1, 2, and 3 represent the spectra of native (pH 7.0), alkaline-denatured (pH 12.0), and alkaline-neutralized DIP-ALP I and DIP-NAT.

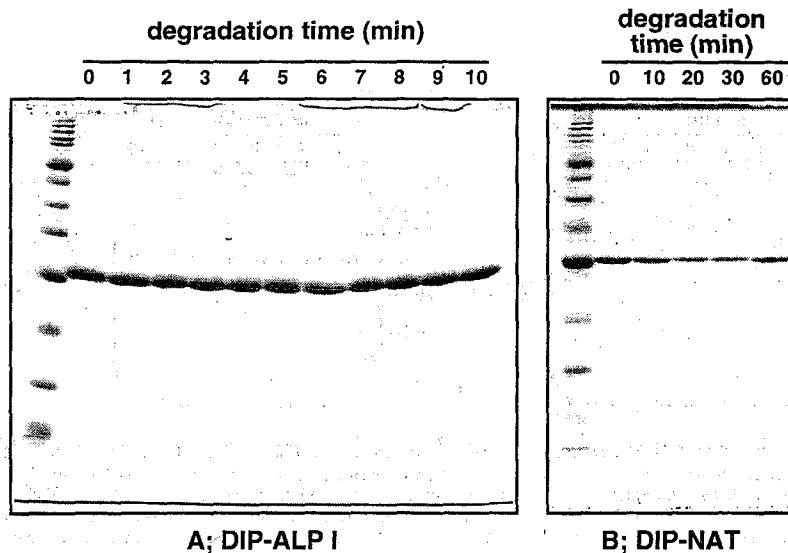


Fig. 7 Degradation of Alkaline-neutralized DIP-ALP I and DIP-NAT with active subtilisin

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Both alkaline-neutralized DIP-subtilisins, DIP-ALP I and DIP-NAT, were incubated at pH 7.0 and 30 °C several times with active subtilisin ALP I and active subtilisin NAT, respectively, and subsequently analyzed by SDS-PAGE. Enzyme/substrate ratio (alkaline-neutralized DIP-subtilisin) was 1/ 1000.

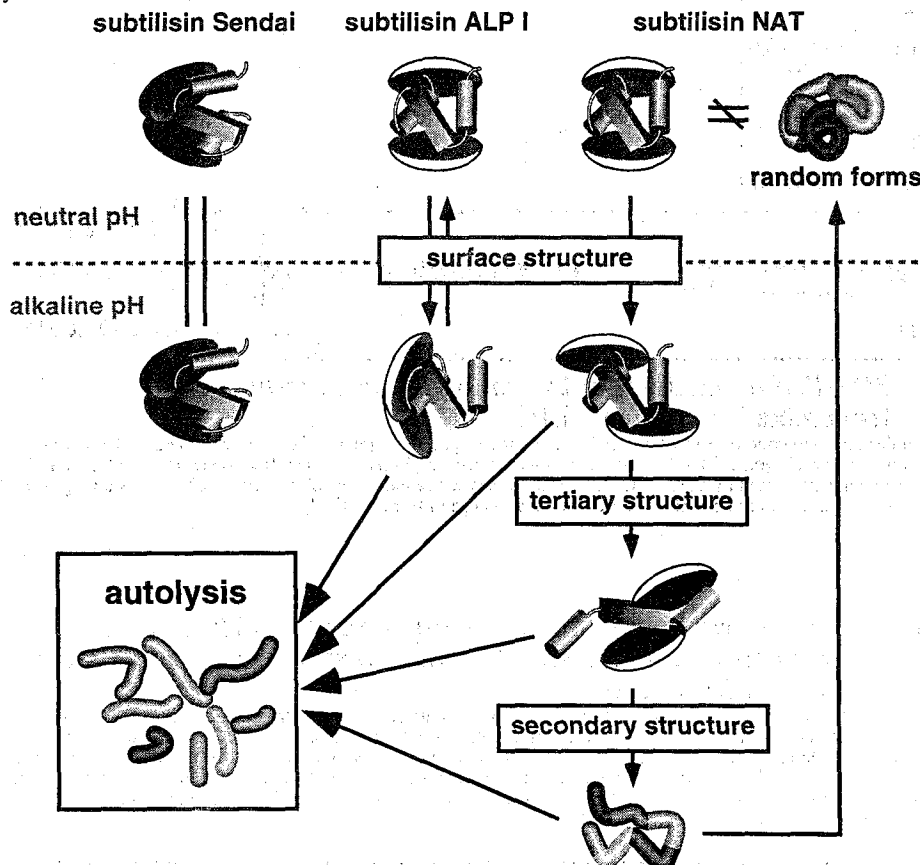


Fig. 8 Model of the Alkaline-stability Mechanism of Subtilisins

Black and white shell forms depict the more hydrophobic and hydrophilic surface regions, respectively. Pillars depict the formation of secondary structure. Subtilisin Sendai has molecular structural stability in the pH region 7.0–12.0, shown by two vertical bars in this model. This stability is due to the presence of the more hydrophobic surface region. Subtilisin ALP I has an alkaline-stable molecular core, similar to subtilisin Sendai, and a flexible surface region. Its surface region shows a reversible reaction between neutral pH and alkaline pH, shown by paired arrows in this model. The direct cause of inactivation is exposure of the fragile region in the presence of active subtilisin ALP I due to partial unfolding, which is limited to the molecular surface. Subtilisin NAT does not have enzymatic stability and structural stability in an alkaline environment. Its conformational change with alkaline treatment is an irreversible reaction, shown by the one-way downstream arrow in this model. In an alkaline environment, the unfolding process of subtilisin NAT is due to the disintegration at successive surface regions, involving both tertiary and secondary structures, which occurs parallel to the autolysis. In addition, the unfolded subtilisin NAT does not regain the native subtilisin NAT conformation.

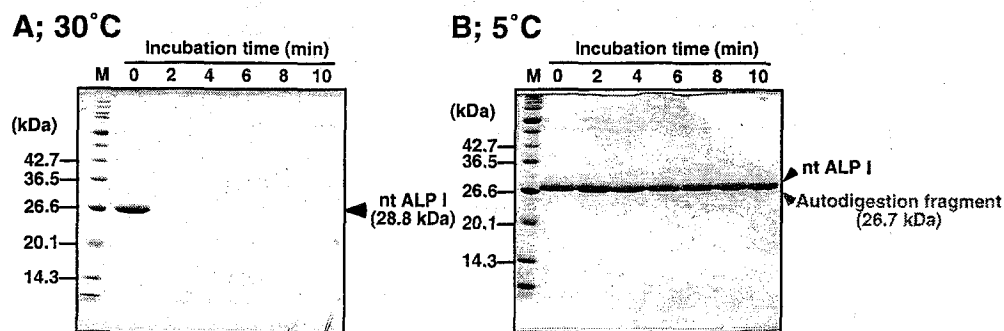


Fig. 9 Autodigestion of Purified ALP I under Alkaline Condition

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Purified ALP I (0.1 mg/ml) were incubated in 100 mM borate-phosphate broad range buffer, pH 12.0 at 30 °C (Fig. 9A) and 5 °C (Fig. 9B) for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 min and subsequently subjected to SDS-PAGE. The positions of the molecular-mass markers (M) (New England Biolabs, Inc.) ranged from 14,313 to 42,710 Da.

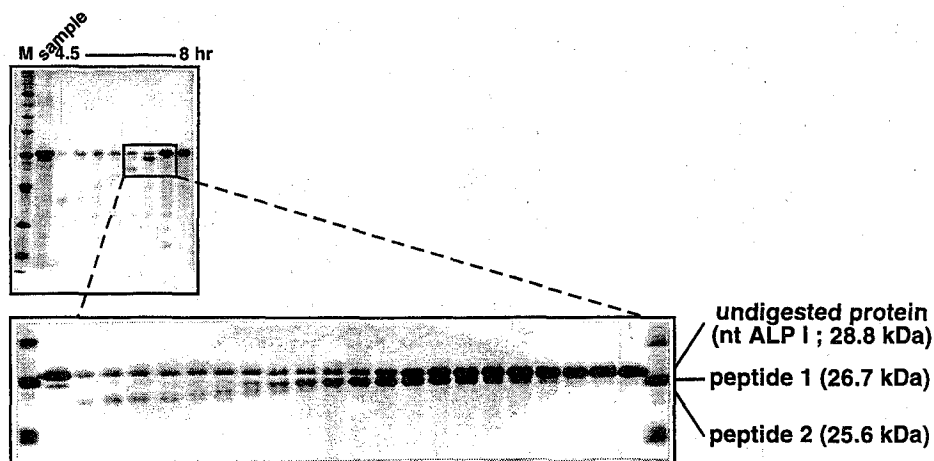


Fig. 10 SDS-PAGE Analyses of the Autodigestion Products from Alkaline-treated ALP I

Gel were run under reducing condition and detected by silver-staining. The fragment mixture was applied to preparative SDS-PAGE column (15 % polyacrylamide gel, ϕ 9 mm), eluted with constant current (5 mA) and been fractionated for each 3 min. The characterization of each fraction was carried by SDS-PAGE in a 15.0 % polyacrylamide slab gel, detected with silver staining. Peptide 1 and peptide 2 in the lower gel represent 26.7 kDa peptide and 25.6 kDa peptide, respectively.

Table 1 N-terminal amino acid sequences of the autodigestion products of purified ALP I formed upon incubation at 5 °C, pH 12.0 for 10 min

The fragment mixture was applied to preparative SDS-PAGE column (15 % polyacrylamide gel, ϕ 9 mm), eluted with constant current (5 mA) and been fractionated for each 3 min. The characterization of each fraction was carried by SDS-PAGE in a 15.0 % polyacrylamide slab gel, detected with silver staining. Peptide samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Coomassie Brilliant Blue R-250 stained band was cut from the membrane and subjected to N-terminal sequence determination on an Applied Biosystems 473A protein sequencer with a 610A data analysis system.

| Peptide | N-terminus | | |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------|----|
| | 1 | 10 | 20 |
| nt ALP I (Mature sequence) | Q | TVPWGIPYIYSDVVHRQGYFGNGVKVA--- | |
| Peptide 1 (26.7 kDa) | GYFGNGVKVA--- | | |
| Peptide 2 (25.6 kDa) | GYFGNGVKVA--- | | |

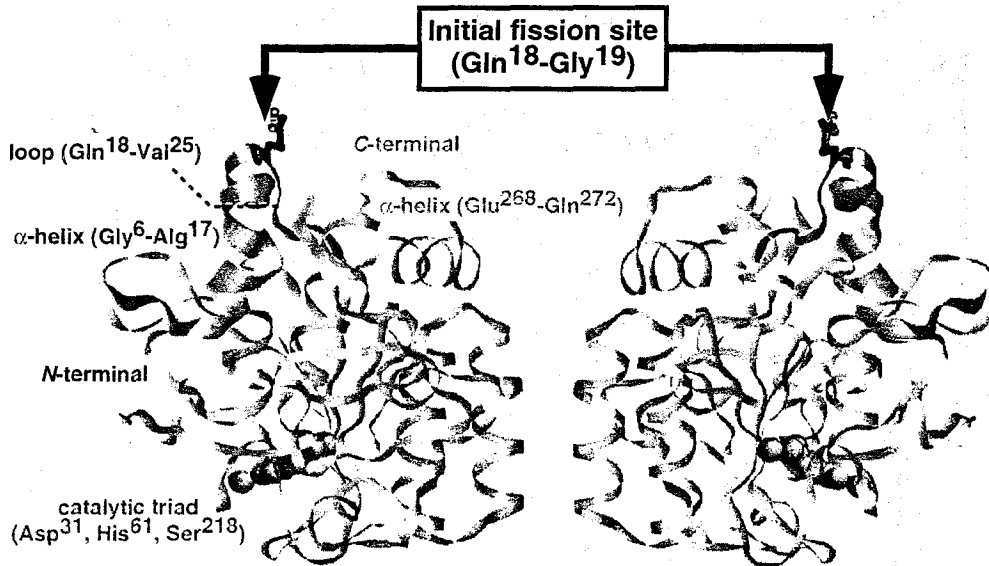


Fig. 11 Putative 3D Structure Model of ALP I

A three-dimensional ribbon model of ALP I was built exploiting the sequence homology with M-protease, 62.9 % identity with ALP I as described previously. Model building were done using the program Swiss-Pdb Viewer. Wide ribbons indicate α -helix at N-terminal (green; Gly⁶-Arg¹⁷) and C-terminal (yellow; Glu²⁶⁸-Gln²⁷²), respectively. The side chains shown in bold line indicate Gln¹⁸ and Gly¹⁹, the initial autodigestion target site, at loop structure (Gln¹⁸-Val²⁵) as shown in red ribbon. Space filled residues indicate the catalytic triad (Asp³¹, His⁶¹ and Ser²¹⁸) of ALP I.



Fig. 12 Specificities of Subtilisin ALP I toward Oxidized Insulin B-chain

Amino acids are indicated by single letters . C* indicates cysteine sulfonic acid .

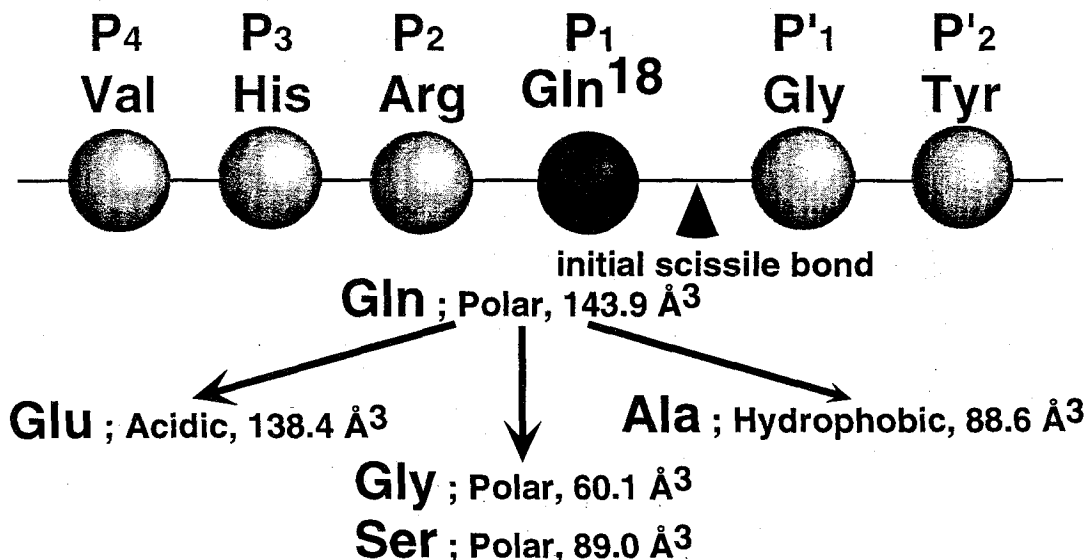


Fig. 13 Selection of Replacing Amino Acid Residues toward P₁-position of ALP I, Gln¹⁸

Approach to stabilize ALP I towards autolytic degradation is changing the amino acid sequence near the initial cleavage site of Gln¹⁸-Gly¹⁹. Taking into account the affinity of substrate of ALP I, the mutagenized residues were choiced. About specificities of ALP I toward oxidized Insulin B-chain, ALP I preferentially cleave at the C-terminal side of large or hydrophobic residues (P₁ residue), such as leucine, tyrosine and glutamine. In view of the size and hydrophobicity of amino acid residue, we choiced Glu (negative charged), Gly and Ser (smaller size) and Ala (hydrophobic and smaller size) as mutagenized residues for Gln¹⁸ (P₁ residue).

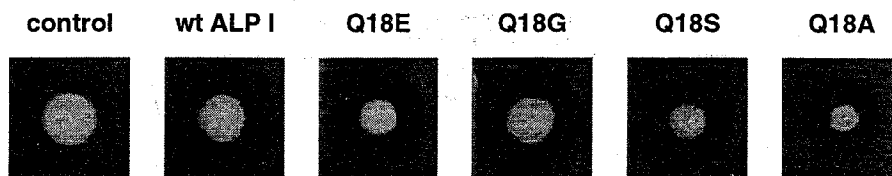


Fig. 14 Assay of Mutant Subtilisin ALP Is by the Halo Formation

Inoculated extract Ehrlich plate, containing 1 % skim milk and grew at 37°C for 48 hr.

control ; *B. subtilis** carrying pUBC 119-BEX
 wt ALP I ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR
 Q18E ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-Q18E
 Q18G ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-Q18G
 Q18S ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-Q18S
 Q18A ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-Q18A
 * ; strain lacks extracellular protease activities

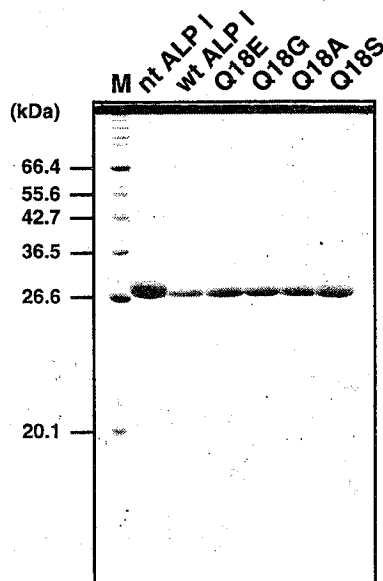


Fig. 15 SDS-PAGE Analysis of Purified Mutant ALP Is

Gel was run under reducing condition and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Stacking gels were 3 % polyacrylamide and separating gels were 15 %. Purified enzyme proteins were precipitated by adding equal amounts of 100 % TCA, then the mixture was left on ice for 2 hr. The mixture was centrifuged 18,500 g at 4°C for 20 min, and the precipitates were dissolved with SDS-sampling buffer (0.12 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 containing 5 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol and 0.05 % BPB) and boiled for 5 min. Samples were subjected to SDS-PAGE. The positions of the molecular-mass markers (M) ranged from 20.1 to 66.4 kDa.

Table 2 Specific Activities of Purified Mutant Subtilisin ALP Is

| | Substrate | | |
|----------|---|--|--|
| | Milk casein ($\times 10^{-3}$ katal/kg) | Suc-AAPF-MCA ($\times 10^{-3}$ katal/kg) | Suc-LLVY-MCA ($\times 10^{-3}$ katal/kg) |
| nt ALP I | 250 | 10.1 | 5.8 |
| wt ALP I | 227 | 12.1 | 5.3 |
| Q18E | 188 | 12.0 | 6.7 |
| Q18G | 213 | 10.6 | 4.2 |
| Q18S | 225 | 10.7 | 4.7 |
| Q18A | 239 | 14.1 | 6.6 |

Suc-AAPF-MCA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA
 Suc-LLVY-MCA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA

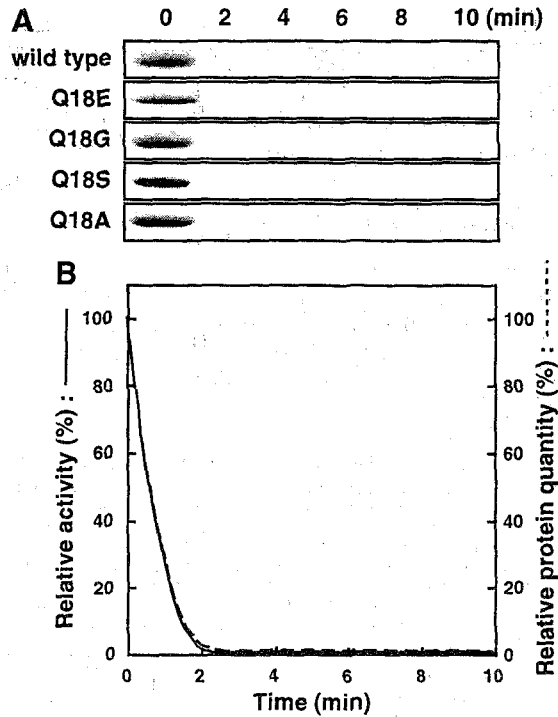


Fig. 16 Autodigestion and Stability of mutant ALP Is, Q18E, G, S and A, under alkaline condition

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Subtilisins were incubated at pH 12.0 at 30 °C for 2, 4, 6, 8 and 10 min and subsequently subjected to SDS-PAGE (A). The time dependence of the relative activity and the relative protein quantity is indicated in B. The values were relatively shown as compared with them at initial time. The solid lines indicate the relative activity at pH 10.0 with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, conducted at 30 °C. The dashed lines indicate the relative protein quantity, analyzed with NIH-Image 1.62 soft.

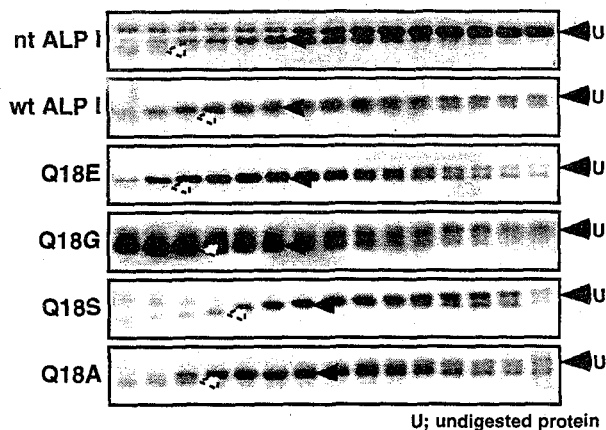


Fig. 17 SDS-PAGE Analyses of the Autodigestion Products from alkaline-treated Mutant ALP Is, Q18E, G, S and A

Gel were run under reducing condition and detected by silver-staining. The fragment mixture was applied to preparative SDS-PAGE column (15 % polyacrylamide gel, ϕ 9 mm), eluted with constant current (5 mA) and been fractionated for each 3 min. The characterization of each fraction was carried by SDS-PAGE in a 15.0 % polyacrylamide slab gel, detected with silver staining. Bands, which were subjected to N-terminal sequence analysis are indicated as triangles shown in gel, respectively.

Table 3 N-terminal Amino Acid Sequences of the Autodigestion Products from alkaline-treated Mutant ALP Is, Q18E, G, S and A

Peptide sample was subjected to SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Coomassie Brilliant Blue R-250 stained band was cut from the membrane and subjected to N-terminal sequence determination on an Applied Biosystems 473A protein sequencer with a 610A data analysis system.

| | untreated | | |
|------------------|-----------|----|--------|
| nt ALP I | 1 | 10 | 20 |
| | Q | T | V |
| | P | W | G |
| | I | P | Y |
| | | I | S |
| | | D | V |
| | | V | H |
| | | R | Q |
| | | G | Y |
| | | F | --- |
| alkaline-treated | | | |
| nt ALP I | | | GYF--- |
| wt ALP I | | | GYF--- |
| Q18E | Q | T | V |
| Q18G | Q | T | V |
| Q18S | Q | T | V |
| Q18A | Q | T | V |

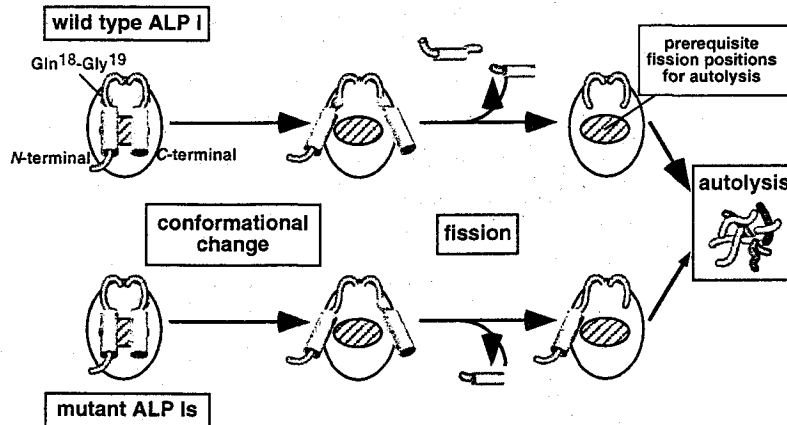


Fig. 18 Model of the Autodigestion Mechanism of ALP I

Pillars depict the formation of α -helix structure at *N*-terminal (Gly⁶-Arg¹⁷) and *C*-terminal (Glu²⁶⁸-Gln²⁷²). Balls indicate fission site at *N*-terminal (between Gln¹⁸ and Gly¹⁹) and *C*-terminal (predicted), respectively. Stripe region indicate the expected prerequisite fission positions for autolysis. Wild type ALP I has a flexible surface region and initial fission sites near the *N*-terminal and *C*-terminal. In ALP I, the early autoproteolysis at *N*-terminal and *C*-terminal before unfolding processes are not complete, followed by the exposure of a prerequisite fission positions toward active enzyme that leads to autolysis. Mutant ALP Is (Q18E, G, S and A) have a flexible surface region but lack the *N*-terminal fission site. In these mutants, a prerequisite fission positions for autolysis are exposed by the conformational change of surface region containing *N*-terminal and the lack of *C*-terminal region.

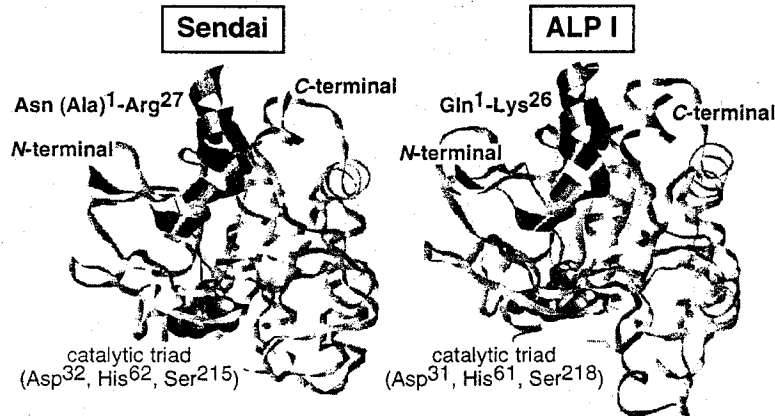


Fig. 19 Putative 3D Structure Model of Sendai and ALP I

These models of Sendai and ALP I were based on Savinase™ and M-protease, respectively. Red ribbons indicate the exchanged region between Sendai (Asn¹ displaced by Ala-Arg²⁷) and ALP I (Gln¹-Lys²⁶) containing α -helix structure. Green ribbons indicate the *C*-terminal region containing α -helix structure. Space filled residues indicate the catalytic triad.

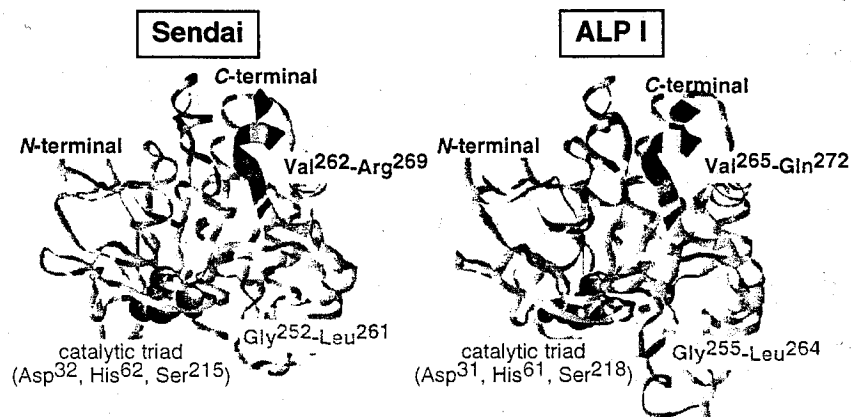


Fig. 20 Putative 3D Structure Model of Sendai and ALP I

These models of Sendai and ALP I were based on Savinase™ and M-protease, respectively. Wide ribbons indicate the exchanged region between Sendai (yellow; Gly²⁵²-Leu²⁶¹, red; Val²⁶²-Arg²⁶⁹ containing α -helix structure) and ALP I (yellow; Gly²⁵⁵-Leu²⁶⁴, red; Val²⁶⁵-Gln²⁷² containing α -helix structure). Green ribbons indicate the *N*-terminal region containing α -helix structure. Space filled residues indicate the catalytic triad.

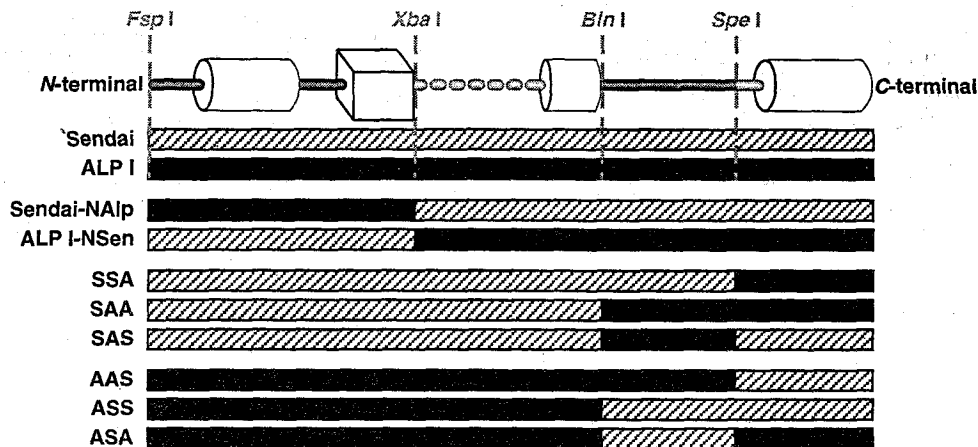


Fig. 21 Structure of Chimeric Subtilisins

Striped boxes indicate the sequence derived from Sendai, black boxes indicate the sequence derived from ALP I. Dotted lines denote the location of the corresponding site, Asn¹-Gln², Leu³-Asp³², Leu²⁵¹-Gly²⁵² and Leu²⁶¹-Val²⁶² in Sendai, Ala¹-Gln¹, Leu³⁰-Asp³¹, Leu²⁵⁴-Gly²⁵⁵ and Leu²⁶⁴-Val²⁶⁵ in ALP I. *Fsp* I, *Xba* I, *Bln* I and *Spe* I are indicated the restriction sites used in construction of chimeric genes between Sendai cDNA (*aprS*) and ALP I cDNA (*aprQ*).

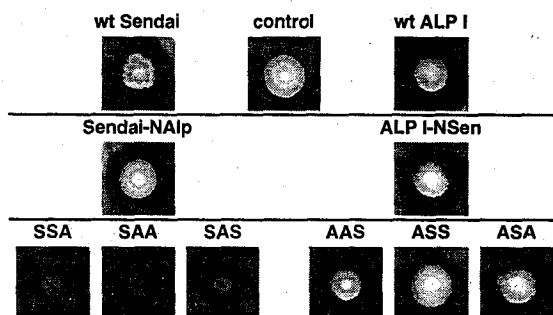


Fig. 22 Assay of Chimeric Subtilisins by the Halo Formation

Inoculated extract Ehrlich plate, containing 1 % skim milk and grew at 37°C for 48 hr.

control ; *B. subtilis** carrying pUBC 119-BEX
 wt Sendai ; *B. subtilis** carrying pSEN-BacR
 wt ALP I ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR
 Sendai-NAI p ; *B. subtilis** carrying pSEN-SXR-BacR-NAI p
 SSA ; *B. subtilis** carrying pSEN-SXR-BacR-SSA
 SAA ; *B. subtilis** carrying pSEN-SXR-BacR-SAA
 SAS ; *B. subtilis** carrying pSEN-SXR-BacR-SAS
 ALP I-NSen ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-NSen
 AAS ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-AAS
 ASS ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-ASS
 ASA ; *B. subtilis** carrying pNALP3-BacR-ASA

* ; strain lacks extracellular protease activities

Table 4 Specific Activities of Purified Chimeric Subtilisins for Milk Casein and MCA-substrates

| | Substrate | | |
|------------|---|---|---|
| | Milk casein (x10 ⁻³ katal/kg) | Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (x10 ⁻³ katal/kg) | Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA (x10 ⁻³ katal/kg) |
| wt Sendai | 365 | 160 | 24.3 |
| wt ALP I | 227 | 5.3 | 12.1 |
| ALP I-NSen | 224 | 5.6 | 11.6 |
| SSA | 367 | 220 | 31.1 |
| SAA | 376 | 165 | 26.0 |
| SAS | 579 | 276 | 49.3 |

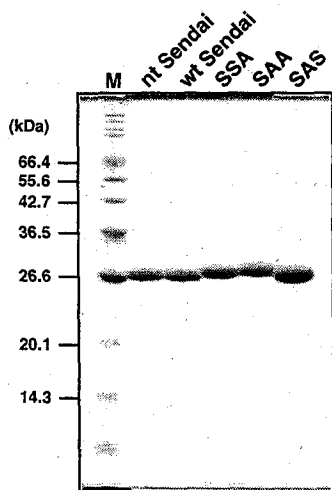


Fig. 23 SDS-PAGE Analysis of Purified Chimeric Subtilisin Sendais

Gel was run under reducing condition and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Stacking gels were 3 % polyacrylamide and separating gels were 15 %. Purified enzyme proteins were precipitated by adding equal amounts of 100 % TCA, then the mixture was left on ice for 2 hr. The mixture was centrifuged 18,500 g at 4°C for 20 min, and the precipitates were dissolved with SDS-sampling buffer (0.12 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 containing 5 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol and 0.05 % BPB) and boiled for 5 min. Samples were subjected to SDS-PAGE. The positions of the molecular-mass markers (M) ranged from 14.3 to 66.4 kDa.

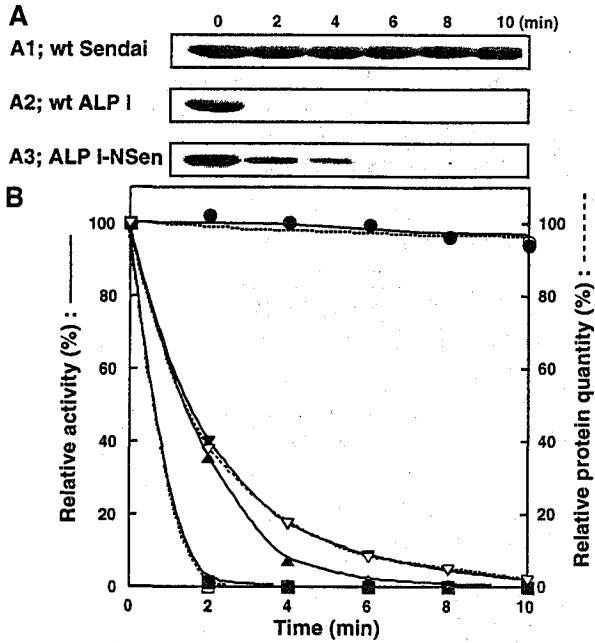


Fig. 24 Stability of Chimeric Subtilisins, Sendai-NAIp and ALP I-NSen at 30°C, pH 12.0

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Subtilisins were incubated at pH 12.0 at 30 °C for 2, 4, 6, 8 and 10 min and subsequently subjected to SDS-PAGE (A): A1, wt Sendai; A2, wt ALP I; A3, ALP I-NSen. The time dependence of the relative activity and the relative protein quantity is indicated in B. The values were relatively shown as compared with them at initial time. Circles, squares, triangles and reverse triangles represent data for wt Sendai, wt ALP I, Sendai-NAIp and ALP I-NSen, respectively. The solid lines and black-filled symbols indicate the relative activity at pH 10.0 with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, conducted at 30 °C. The dashed lines and open symbols indicate the relative protein quantity, analyzed with NIH-Image 1.62 soft.

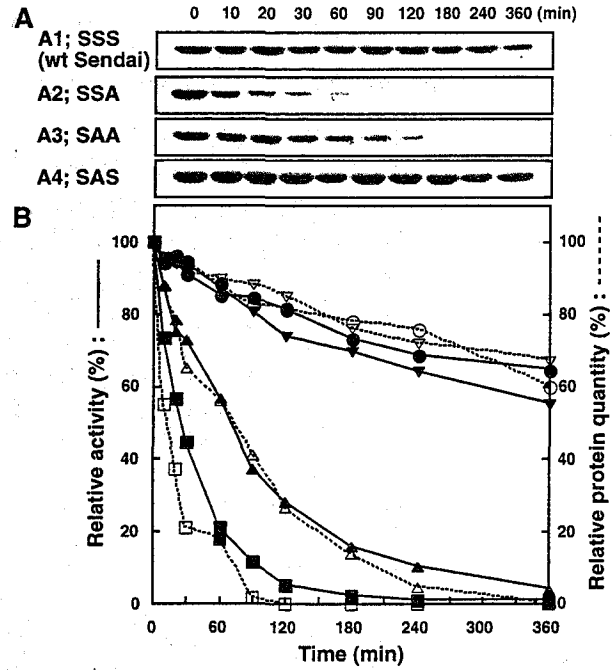


Fig. 25 Stability of Chimeric Subtilisin Sendais, SSA, SAA and SAS at 30°C, pH 12.0

Gels were run under reducing conditions and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Subtilisins were incubated at pH 12.0 at 30 °C for 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 min and subsequently subjected to SDS-PAGE (A): A1, SSS (wt Sendai); A2, SSA; A3, SAA; A4, SAS. The time dependence of the relative activity and the relative protein quantity is indicated in B. The values were relatively shown as compared with them at initial time. Circles, squares, triangles and reverse triangles represent data for SSS, SSA, SAA and SAS, respectively. The solid lines and black-filled symbols indicate the relative activity at pH 10.0 with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, conducted at 30 °C. The dashed lines and open symbols indicate the relative protein quantity, analyzed with NIH-Image 1.62 soft.

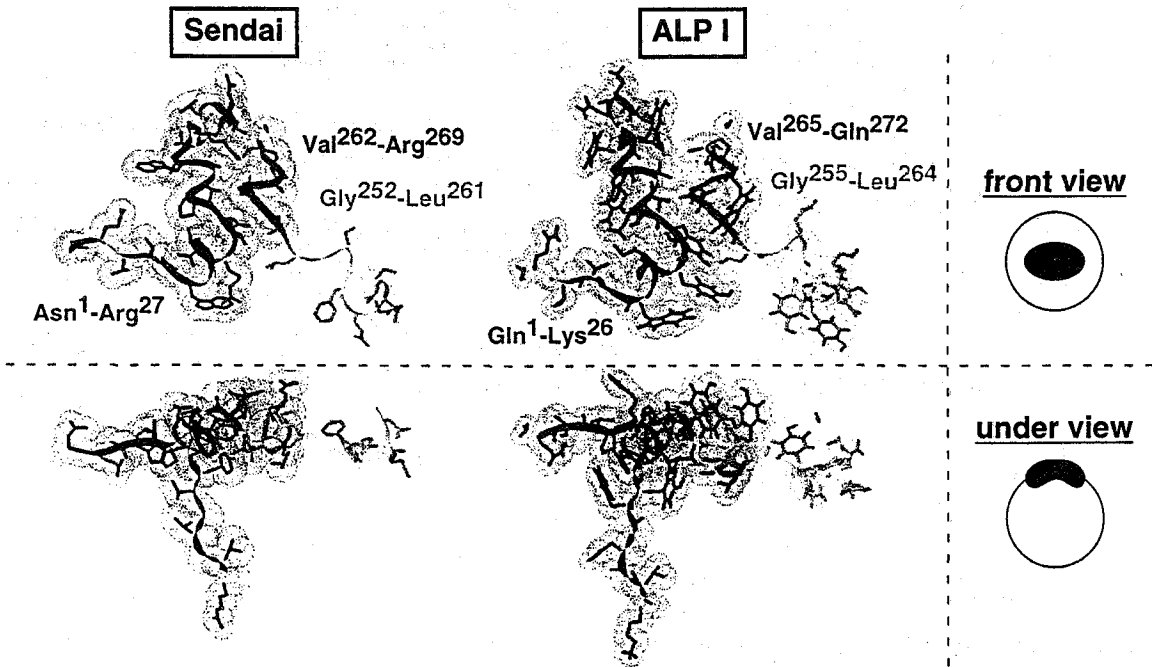


Fig. 26 Partial 3D Structure Model of Sendai and ALP I in the Vicinity of N-terminal and C-terminal

These partial structure models of Sendai and ALP I were built exploiting the sequence homology with Savinase™ and M-protease, respectively. Model building were done using the program Swiss-Pdb Viewer. Upper models and lower models indicate the front view and under view of the exchanged regions in this study.

論文審査結果要旨

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来のセリンプロテアーゼ (スブチリシン) は、洗剤酵素として世界中でひろく使われている有用な酵素の代表格といえる。洗剤酵素スブチリシンに期待されている有用な性質は、アルカリおよび界面活性剤に対する耐性である。現在までに、スブチリシンの安定化に関する研究は、主として物理的な架橋により、酵素タンパク質の分子構造を直接的に補強するものであった。このような研究は、タンパクの分子構造の安定性をもたらす要因を探ることを主眼とするのではなく、あくまでも実質的な応用研究であった。さらに、高アルカリ条件での酵素タンパク質の挙動についての研究は現在までほとんどおこなわれていない。

本研究は、アルカリ耐性をもつスブチリシン (subtilisin Sendai) とアルカリに対して耐性を示さないスブチリシン (subtilisin ALP I) を材料として選択し、両者のアルカリに対する挙動の違いを、分光学的な手法で酵素タンパク質の立体構造の変化としてとらえること、また遺伝子工学的な手法で、タンパク質の一次構造の面から、アルカリ耐性の機構を明らかにすることを目的とした。

まず、分光学的手法を用いたタンパクの立体構造の二次構造、三次構造の解析から、酵素分子へのアルカリ耐性の付与は、構造変化を含めたアルカリ変性を受けない分子表面領域の存在に起因することを明らかにした。

さらに、タンパク工学的方法を用いて、アルカリ耐性を示さないスブチリシンALP Iの自己消化機構を明らかにしてゆく過程で、自己消化の引き金となる酵素タンパクの初期の切断は、N末端領域とC末端領域で起こること、また両領域を形成する α -ヘリックス間の相互作用の有無が、スブチリシン分子の表面構造の可動性を制限していることを明らかにした。

次に、スブチリシンSendaiとスブチリシンALP Iのキメラ酵素を作り、各種変異酵素のアルカリに対する挙動の解析から、前述した、N末端領域とC末端領域に存在する両 α -ヘリックス間の位置関係が重要で、アルカリ耐性をもつためには、両 α -ヘリックスが接近していること、しかも、 α -ヘリックスの接合面を形成する疎水性アミノ酸の側鎖が小さく、コンパクトな充填が可能であることがあげられる。一方、アルカリ耐性を示さない、スブチリシンALP Iは、溶媒表面を形成するアミノ酸が、親水性のものが比較的多いため溶媒の影響を受けやすいことが示された。

本研究の結果、タンパク分子に構造上のアルカリ耐性を付与する要因として、(1) 側鎖の小さな疎水性アミノ酸同士の相互作用によって空間が充填された分子表面が存在すること、(2) 親水性が低く、溶媒と分子内部を隔離する溶媒表面が存在すること、の二つがあげられる。

以上の結果は、産業用酵素スブチリシンのアルカリ耐性の分子機構を世界に先駆けて明らかにしたものであり、今後有用酵素を分子設計する上での、基本的な理論を構築した点で、審査員一同は候補者を博士 (農学) の学位を授与される十分の資格が有るものと認定した。