

氏 名 (本籍)	まさ 正	き 木	たけ 武	はる 治
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	第	216	号
学位授与年月日	昭和57年 1月14日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			

学位論文題目 Achromobacter lyticus M497-1 の生産するリジルペプチド結合に特異的なプロテアーゼに関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 志村 憲助 教授 高橋 甫

教授 松田 和雄

論文内容要旨

〔I〕 序 論

1971年、Achromobacter lyticus M 497 - 1は、高橋らによって強力な溶菌酵素を得る目的で土壌から分離され、溶菌酵素の他にプロテアーゼが培地中に生産されることが報告された。

当時、著者は上記溶菌酵素を用いてMicrococcus radioduransの溶菌作用の研究を行っていた。また、その頃までAchromobacter属により生産されるプロテアーゼに関する研究報告はほとんどなかった。そこで本菌の生産するプロテアーゼを精製し、その諸性質ならびに作用機構を明らかにする目的で本研究を行った。

その結果、このプロテアーゼが少なくとも3種類のプロテアーゼに分別され、特にその主要区分である Ac. プロテアーゼ I と命名した酵素を培養液から蛋白質化学的に均一な標品に精製することに成功した。さらに、本酵素標品の詳細な蛋白質化学的性質および酵素化学的性質、基質特異性および基質特異性決定部位の性状について研究し、本酵素が、ペプチド鎖中のリジン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を特異的に加水分解する新しい型のプロテアーゼであることを明らかにした。

〔II〕 精製および蛋白質化学的性質

Achromobacter lyticus M 497 - 1の培養液から Ac. プロテアーゼ I と著者が命名した新酵素を、アセトン分画、DEAE-セルローズ処理、AH-セファロース4Bクロマトグラフィーおよび焦点電気泳動法等8段階の操作(第1図)により、アミダーゼ活性での回収率29%で、比活性の上昇率約700倍の精製酵素標品を得た(第1表)。この標品はディスク電気泳動的、超遠心的および化学分析的に均一であった。これら精製各段階の中で、アセトン分画、DEAE-セルローズ処理、AH-セファロース4Bクロマトグラフィーが最も有効であり、比活性がそれぞれ53倍、3倍および3.4倍に上昇した(第1表)。精製酵素標品は凍結状態で保存し、また凍結乾燥して冷蔵すれば一年以上安定であった。この標品を使用して蛋白質化学的性質および組成を検討した。

その結果、本酵素はN-末端アミノ酸グリシン、C-末端アミノ酸リジンで分子量30,500(アミノ酸組成より算出)、アミノ酸残基数294、3個の-S-S-結合を分子内に持つ1本のポリペプチド鎖よりなるpI 6.9の球状蛋白質であることが明らかとなった。また本酵素は既知トリプシン様セリンプロテアーゼと比較すると、分子量がやや大きく等電点が中性であった(第2表)。

本酵素のアミノ酸組成を牛トリプシンと比較すると、アルギニン、スレオニン、アラニンを多く含み、リジンおよびシスチンの含量が少なかった(第3表)。C-末端アミノ酸がリジンであるセリンプロテアーゼは知られていなかった。旋光分散の結果から α -ヘリックス含量はほとんど0%と算出されたが、これはトリプシンのそれが3%であることと近似している。

〔Ⅲ〕 酵素化学的性質

本酵素の基質特異性以外の酵素化学的性質について検討した結果をまとめるとつぎのようである。本酵素の至適pHは8.5~10.7(カゼイン), 9.0~9.5 (Bz-Lys-pNA), pH安定性は4.0~11.0であり温度安定性(30分間放置)は45℃まで完全に活性を維持し, 60℃で速やかに失活した。またEDTA, o-フェナンスロリン, システイン, NEM, IAAおよびPCMBでほとんど阻害されず, DFP, PMSF, TLCKおよびトリプシンインヒビター等によって阻害された。これらの現象から, 本酵素がセリンプロテアーゼに属するものと考えられたが, さらに詳細に検討した結果, 合成基質Bz-Arg-pNA, Bz-Arg-NH₂, Arg-pNAならびにアルギニルペプチド結合を全く加水分解せず, また牛トリプシンと比較して至適pH, pH安定性が異なり, さらにCa²⁺の保護作用が認められず, 以下に述べる前記以外の阻害剤の影響も著しく異なり, 新しい型のセリンプロテアーゼであることが明らかとなった。すなわち, 酵素の活性中心部位に存在するヒスチジン残基と特異的に反応し失活せしめると考えられているTLCKで本酵素の活性は完全に阻害されたが, 同じ反応機作のTACKによってほとんど阻害されなかったこと, さらにロイペプチンおよびアンチパイン等の低分子アルギニン誘導体によって阻害され難かったこと, および尿素, グアニジン等による変性に対して非常に強い抵抗性を示したこと等である。

〔Ⅳ〕 基質特異性

本酵素の基質特異性をリジンおよびアルギニン誘導体のエステル, アミドおよびアニリド化合物等の低分子合成基質, グルカゴン, インシュリン等天然および合成ポリペプチドを用いて検討した。さらに, 天然蛋白質基質の例として, カゼインおよびジメチルカゼインならびにトリプシノーゲン等に対する作用を検討した。

エステル化合物, アニリド化合物およびアミド化合物に対する本酵素の動力学定数(K_m, k_{cat})を, トリプシンのそれと比較した結果を第4表に示した。試験したエステル化合物の中で, Tos-Lys-OMeに対して本酵素は最も高い特異性を示したが, この基質に対する加水分解反応のk_{cat}/K_m値はTos-Arg-OMeのそれと比較して約4×10⁴倍高い値を示した。本酵素は, Bz-Orn-OMeを構造的に対応するリジン誘導体よりも弱くアルギニン誘導体よりも強く加水分解したが, Ac-Tyr-OEt, Bz-His-OMeおよびBz-Citru-OMeを加水分解しなかった。さらにアニリドおよびアミド化合物については, アルギニン誘導体は全く加水分解されず, リジン誘導体はBz-Lys-pNA > Bz-Lys-NH₂ > Lys-pNAの順で加水分解されやすかった。この結果から, 本酵素はリジル結合に特異的なエンドペプチダーゼに属するものと考えられた。次に, 天然および合成ポリペプチド基質に対しては, トリプシンにより切断されぬLys-Pro結合を含むすべてのリジルペプチド結合のみが切断され, アルギニルペプチド結合は全く切断されなかつ

た(第5表)。また天然蛋白質である3種のチモーゲン(トリプシノーゲン, キモトリプシノーゲンおよびプラズミノーゲン)のうち, N-末端側のリジルペプチド結合の切断によって活性化されることが知られているトリプシノーゲンのみが本酵素によってトリプシンよりも遥かに速やかに活性化された事実は, 本酵素のリジルペプチド結合に対する異常に高い基質特異性を反映している(第6表)。このことは, 本酵素, トリプシンおよびエンテロキナーゼのトリプシノーゲンに対する K_m 値を比較すると, それぞれ $1.9\mu M$, $500\mu M$ および $70\mu M$ であったことから裏付けられた。また本酵素はカゼインを加水分解できるが, カゼイン中のリジンの ϵ -アミノ基をジメチル化したジメチルカゼインを加水分解できないことも上の結論を支持する事実であった。

以上の実験結果から, 本酵素は従来のトリプシン型とは基質特異性の面でも, 全く異なることが明らかとなった。

〔V〕 Ac. プロテアーゼ I の特異性決定部位の性状

本酵素とトリプシンの活性中心部位, 特に基質特異性決定部位を含む基質結合ポケットの性状を解明する手掛りを得るために, 各種拮抗阻害剤の検索, 縮合剤と求核試薬との酵素活性に対する影響および拮抗阻害剤である ω -アミノアルキル基をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーについて実験し, トリプシンと比較検討した。

Tos-Lys-OMe を基質として試験した拮抗阻害剤(第7表)のうち, アミルアミン($K_i = 0.03mM$)およびブチルアミン($K_i = 0.05mM$)が本酵素に対して最も強い阻害作用を示した。またブチルグアニジン($K_i = 21mM$)は, これらと比較すると非常に弱かった。一方, トリプシンではアルキルグアニジン, 特にブチルグアニジン($K_i = 0.4mM$)によって最も強く阻害された。

本酵素は求核試薬(エチレンジアミン)存在下でのEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)によって, トリプシンよりも弱いながらも明らかに阻害された。また拮抗阻害剤(ブチルアミン, アミルアミン)で酵素を予備処理した後, EDCと求核試薬とを反応させ, さらに透析することによってほとんど阻害が防止された。これらの実験結果から, 本酵素の基質特異性決定部位にカルボキシル基が関与することが明らかとなった。

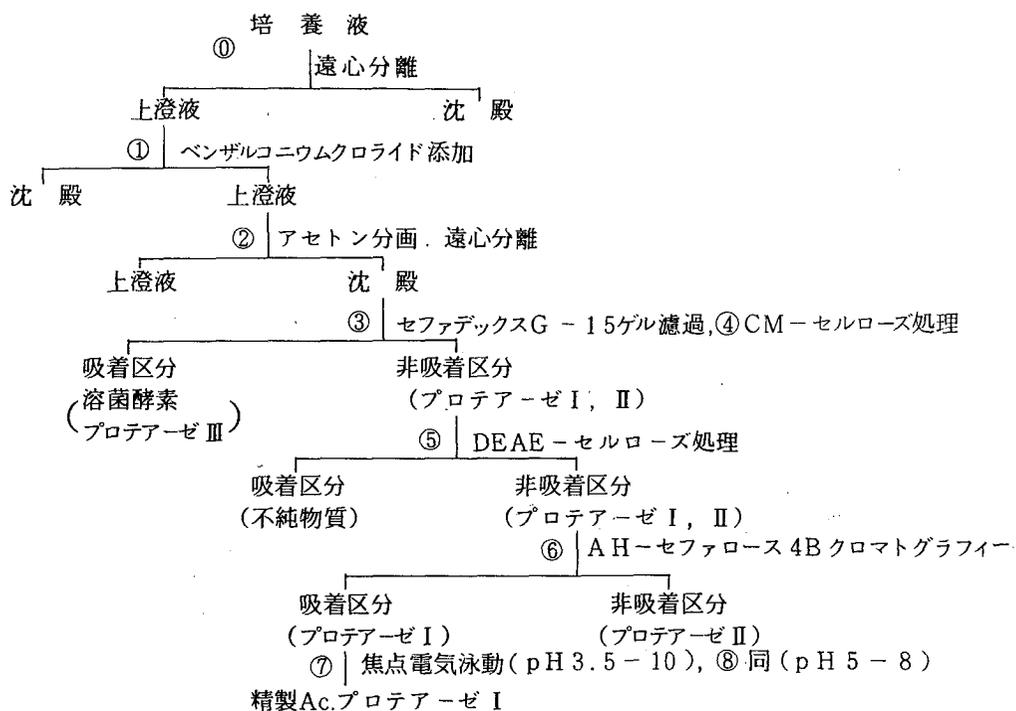
また, メチレン基数を異にする ω -アミノアルキル基($-NH-(CH_2)_n-NH_2$, $n=5\sim 10$)をリガンドとするセファロース4B-クロマトグラフィーを行った結果, メチレン基数と共に本酵素に対する吸着力が増大し, $n=8$ で最大となり, $n=9\sim 10$ では同程度であった。一方, トリプシンはほとんど吸着されなかった。

以上の結果, 本酵素の基質特異性決定部位のカルボキシル基を含むポケットは, リジン残基(長さ: 約 8 \AA)と類似の構造をもつアミルアミンおよびブチルアミンの長さ(約 $8\sim 10\text{ \AA}$)とアミ

ノ基 (約 3.5 Å) がちょうど適合しやすいような狭く浅いポケットが分子表面に存在しているものと推定された。

以上の結果から、Achromobacter lyticus M 497-1 が培地中に生産するプロテアーゼ群の主要区分である“プロテアーゼ I”は、従来報告されたプロテアーゼと異なり、リジルペプチド結合のみを加水分解する全く新しい型のエンドペプチダーゼであることが明らかとなった。

なお、1978年に著者が発表して以来、現在に至るまで同じ特異性をもったプロテアーゼは全く報告されていない。しかし、著者との協同研究によって、本酵素を用いてブタインシュリンB鎖30位のアラニンのスレオニンに置換することによって人インシュリンの酵素的半合成に成功した応用例がある。また本酵素精製標品の大量生産法が確立され、本年1月から製品が市販されている (Wako pure chemical industries, Ltd. . Wako report-Lysyl endopeptidase (1981))。



第 1 図 A.C. プロテアーゼ I の精製法の概要

第 1 表 A.C. プロテアーゼ I の精製過程

精 製 段 階	体 積 (ml)	蛋白質量 (A 280nm)	総単位 (U) ^a	(比活性)		回収率 (%) ^a
				U/280 nm ^a	U/280 nm ^b	
① 培 養 濾 液	20,600	245,000	869	0.0036	0.14	100
① B C 処 理	20,000	216,000	843	0.003	0.13	97
② アセトン分画 (75% V/V)	500(14) ^c	3,180	608	0.16	7.29	70
③ セファデックスG-15処理	2,000	3,760	598	0.16	5.93	69
④ CM-セルローズ処理	1,000	2,170	571	0.26	4.25	66
⑤ DEAE-セルローズ処理	105	493	387	0.79	5.89	45
⑥ AH-セファロース 4Bクロマトグラフィー	59	135	359	2.66	14.10	41
⑦ 焦点電気泳動法 (pH 3.5-10)	53	114	294	2.58	14.00	34
⑧ 2回目の " (pH 5-8)	26	98.4	254	2.58	14.58	29

a. N-ベンゾイル-L-リジン-p-ニトロアニリドに対するアミダーゼ活性, b. カゼインに対するプロティナーゼ活性, c. アセトン粉末

第2表 A.c. プロテアーゼIの理化学的諸性質

等電点 (pI)	6.9	旋光分散パラメーター・入 _{min}	234 nm
沈降係数 (s _{20,w} ^o)	3.01S	[m'] ₂₃₃	-2,219°
固有粘度 ([η])	0.0385dl/g	入 _c	214 nm
拡散係数 (D _{20,w})	8.50×10 ⁻⁷ cm ² ・sec ⁻¹ ※	a _o	-228°
偏比容 (V)	0.717ml/g	b _o	0°
分子量 (M.W.)・s _{20,w} ^o , [η]	31,900	280nmでの吸光係数 (E _{1%} ^{1cm})	18.77
・SDS-ゲル電気泳動法	30,000	280nmと260nmの吸光度比 (A ₂₈₀ /A ₂₆₀)	1.74
・ゲル濾過法	27,000	極大吸収	281 nm
・アミノ酸組成	30,500	窒素含量	17.17%
摩擦比 (f/f _o)	1.20 ※	N-末端アミノ酸	グリシン(1)
Stokes 半径	2.46 nm	C-末端アミノ酸	リジン(1)
α-ヘリックス含量	0~1.7%		

※ s_{20,w}^o, M.W. およびVから算出した値

第3表 A.c. プロテアーゼIのアミノ酸組成

アミノ酸	30,000当りの アミノ酸残基数	アミノ酸残基数 (近い整数値)
Lys	5.57	6
His	5.99	6
Arg	12.80	13
Asp	32.55	33
Thr	25.80	26
Ser	34.76	35
Glu	16.54	17
Pro	15.25	15
Gly	38.69	39
Ala	30.76	31
1/2 Cys	6.49	6
Val	14.88	15
Met	3.48	4
Ile	9.60	10
Leu	14.16	14
Tyr	8.84	9
Phe	7.50	8
Trp	6.72	7
Amide - NH ₃	(15.0)	
合計		294

第4表 エステル化合物, アミド化合物およびアニリド化合物に対するA.c. プロテアーゼIとトリプシンの動力学的定数

合成基質	A.c. プロテアーゼ I			牛トリプシン				
	pH	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat / Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	pH	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat / Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Bz-Arg-OEt	8.0	2.0.0	7.40	0.37	8.0	0.0066	17.9	2700
Bz-Lys-OMe	8.0	0.091	225.3	2480	8.0	0.017a	17.0a	1000a
Bz-Orn-OMe	8.0	1.0	10.4	10.4				
Tos-Arg-OMe	8.0	35.7	5.04	0.14	8.0	0.015	65.2	4350
Tos-Lys-OMe	8.0	0.1	570.0	5700	8.0	0.19	98.4	520
Bz-Arg-NH ₂	8.5		※		8.0	2.5 ^b	2.8 ^b	1.1 ^b
Bz-Lys-NH ₂	8.5	0.32	1.54	4.81	8.0	4.6 ^b	1.9 ^b	0.41 ^b
Bz-Arg-pNA	9.5		※		8.0	1.01	2.88	2.85
Bz-Lys-pNA	9.5	0.07	0.86	12.3	8.0	0.91	1.75	1.92
Arg-pNA	9.2		※					
Lys-pNA	9.2	0.08	0.14	1.75	8.65	0.36 ^c	0.003 ^c	0.0083 ^c

※ 加水分解は認められなかった。 a. Elmore ら (1967) b. Wang ら (1968) c. Erlanger ら (1961)

Km値は Lineweaver-Burk プロットから算出した。kcat値はプロテアーゼIの分子量を30,000, トリプシンのそれを24,000として、最大速度(V)値より算出した。

第5表 試験したポリペプチド基質に対する

Ac. プロテアーゼ I の切断箇所(↓)

ポ リ ペ プ チ ド	
リジンパソプレシン	H - Cys - Tyr - Phe - Gln - Asn - Cys - Pro - Lys - GlyNH ₂
サブスタンスP	H - Arg - Pro - Lys - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - MetNH ₂
アドレノコルチコトロフィン (ACTH ¹⁻²⁴)	H - Ser(1) - Tyr - Ser - Met - Glu(5) - His - Phe - Arg - Trp - Gly(10) - Lys - Pro - Val - Gly - Lys(15) - Lys - Arg - Arg - Pro - Val(20) - Lys - Val - Tyr - Pro - OH
ブタインシュリン	A chain - Cys - B chain H - Phe(1) - Val - Asn - Gln - His - Leu - Cys - Gly - Ser - His(10) - Leu - Val - Glu - Ala - Leu - Tyr - Leu - Val - Cys - Gly(20) - Glu - Arg - Gly - Phe - Phe - Tyr - Thr - Pro - Lys - Ala - OH(30)
グルカゴン	H - His(1) - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr(10) - Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln(20) - Asp - Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asn - Thr - OH

第6表 トリプシノーゲン, キモトリプシノーゲンおよびブラズミノーゲンに
おいて酵素によって切断されるペプチド結合とその周辺構造

トリプシノーゲン	Val - (Asp) ₄ - Lys(6) - Ile(7) - Val - Gly - Gly -
キモトリプシノーゲン	Cys - Gly - Leu - Ser - Arg(15) - Ile(16) - Val - Gly -
ブラズミノーゲン	- Cys - Pro - Gly - Arg - Val - Val - Gly - Gly -

↓: Ac. プロテアーゼ I によって切断したペプチド結合

*: Ac. プロテアーゼ I によって切断しなかったペプチド結合

第7表 エステラーゼ活性およびアミダーゼ活性に対するアミノ酸類,
アルキルモノアミン類およびアルキルモノグアニジン類の阻害
定数

阻害物質	阻害定数 (mM)			
	A.C. プロテアーゼ I		トリプシン	
	Tos-Lys-OMe	Bz-Lys-pNA	Tos-Lys-OMe	Bz-Lys-pNA
アミノ酸類				
アルギニン	※	—	7 5.0	—
シトルリン	※	—	※	—
リジン	1 0.0	—	※	—
オルニチン	2 2.5	—	※	—
モノアミン類				
メチルアミン	4.6	2.7	※	※
エチルアミン	1.0	0.7	6 0.0	6 4.0
プロピルアミン	0.2 5	0.3 2	9.0	2.6 5
ブチルアミン	0.0 5	0.0 3	2.5	3.5 0
アミルアミン	0.0 3	0.0 4	4.5	—
ヘキシルアミン	0.3 5	—	—	—
モノグアニジン類				
メチルグアニジン	2 5.0	2 0.0	7.6 5	3.5 0
エチルグアニジン	2 2.0	—	1.4 0	—
ブチルグアニジン	2 1.0	1 6.0	0.4 0	1.4 4

※ 100 mMで実験を行ったが阻害は認められなかった。

Ki 値は Dixon プロットより算出した。

エステラーゼ活性……反応 pH: 8.0 (40mMトリス-塩酸緩衝液), 温度: 30℃,
酵素量: 0.26 μg

アミダーゼ活性……反応 pH: 8.0 (40mMトリス-塩酸緩衝液), 温度: 30℃,
酵素量: 1.31 μg

本研究に関連して発表した論文

- 1 Nakamura, K. , Okazawa, Y. , Soejima, M. and Masaki, T. : Lysis of Micrococcus radiodurans, Agric. Biol. Chem. , **37** , 2667 - 2668 (1973)
- 2 正木 武治, 中村 啓治, 副島 正美:ゼラチンおよびカゼインに対するプロテアーゼ活性の一測定法, 農化誌, **51** , 147 - 157 (1977)
- 3 正木 武治, 中村 啓治, 副島 正美:中性および弱アルカリ性プロテアーゼのエステラーゼ活性の一測定法, 農化誌, **51** , 195 - 202 (1977)
- 4 正木 武治, 中村 啓治, 副島 正美: pH変化を伴う酵素反応における活性の一測定法 (補遺), 農化誌, **51** , 523 - 525 (1977)
- 5 Masaki, T. , Nakamura, K. , Isono, M. and Soejima, M. : A new proteolytic enzyme from Achromobacter lyticus M 497 - 1. Agric. Biol. Chem. , **42** , 1443 - 1445 (1978)
- 6 木村 均, 副島 正美, 正木 武治:特許公報 昭和54 - 135789
- 7 Morihara, K. , Oka, T. , Tsuzuki, H. , Masaki, T. , Soejima, M. and Sakakibara, S. : Enzymatic semisynthesis of human insulin by replacement of Ala - B 30 by Thr in porcine insulin. Peptide chemistry, pp. 113 - 118 (1979)
- 8 Masaki, T. , Tanabe, M. , Nakamura, K. and Soejima, M. : Studies on a new proteolytic enzyme from Achromobacter lyticus M 497 - 1. I. Purification and some enzymatic properties. Biochim. Biophys Acta **660** , 44 - 50 (1981)
- 9 Masaki, T. , Fujihashi, T. , Nakamura, K. and Soejima, M. : Studies on a new proteolytic enzyme from Achromobacter lyticus M497 - 1, II. Specificity and inhibition studies of Achromobacter protease I. Biochim. Biophys. Acta **660** , 51 - 55 (1981)

審査結果の要旨

著者は、*Achromobacter lyticus* M497-1が培養液中に生産するプロテアーゼの分別について研究を行い、その主要成分であるAc.プロテアーゼIと命名した酵素を、蛋白質化学的に均一な標品に精製することに成功した。本酵素は、ペプチド鎖中のリジン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を特異的に加水分解する新しい型のプロテアーゼであることが明らかとなった。本酵素は今後研究および応用面で広く利用されることが考えられたので、その分離精製法および酵素化学的性質について詳細な研究を行った。

上記菌の培養液より8段階の精製操作により、N-ベンゾイル-L-リジン-P-ニトロアニライドに対するアミダーゼ活性の回収率29%で、比活性約700倍の精製酵素標品を得た。本酵素は、アミノ酸残基数294、分子量約30,500、3個のジスルフィド結合を分子内にもつ1本のポリペプチド鎖であることが明らかになった。本酵素の至適pHは8.5~10.7で、セリンプロテアーゼの一種であるが、トリプシンと比較しpH安定性、Ca⁺⁺との相互作用、阻害剤の影響などの点で明らかに異っていた。

本酵素の基質特異性を、リジンおよびアルギニン誘導体のエステル、アミドおよびアニリド化合物等の低分子化合物、およびグルカゴン、インシュリン等の天然ペプチドを使用して検討した。その結果、本酵素はリジル結合を特異的に切断するエンドペプチダーゼで、アルギニン結合を全く切断しなかった。また、本酵素はトリプシノーゲンを基質とした場合、トリプシンよりも高いKm値を与え、リジン結合に対する高い親和性をもつことが明らかになった。

本酵素の活性中心部位の構造解析を行う目的で、種々の拮抗阻害剤、蛋白質修飾試薬等を用いて、トリプシンと比較しながら実験を行った。トシル・リジンメチルエステルを基質とした場合、試験した拮抗阻害剤のうち、アミルアミンおよびブチルアミンが、本酵素に対してもっとも強い阻害作用を示した。しかし、ブチルグアニジンの阻害は極めて低かった。これに対し、トリプシンはブチルグアニジンによって強く阻害された。また、メチレン基数を異にする ω -アミノアルキル基をリガンドとするセファロース4Bクロマトグラフィーを行った結果、メチレン基数n=8で吸着がもっとも大きく、一方、トリプシンはほとんど吸着されなかった。これらの結果から、本酵素の基質特異性決定部位には、リジン残基の側鎖部位が適合しやすいような形をもった狭く浅いポケットが存在するものと推定した。

以上のように、本酵素はリジルペプチド結合のみを加水分解する新しい型のプロテアーゼであることが証明された。この特異性を利用して、ブタインシュリンB鎖30位のアラニンをスレオニンに置換することによって、ヒトインシュリンの酵素的半合成に成功した。本研究の結果は、生化学分野の基礎研究に寄与するのみならず、応用面においても今後広く利用されることが期待され、著者に農学博士の学位を授与するに十分な価値あるものと判定する。