

19 kDa 亜鉛プロテアーゼ分子の構造的特性と 特異性に関する研究

Structural properties and specificities of the 19 kDa zinc- proteases

00D5506 土井ゆうこ 指導教員 一島英治

SYNOPSIS

The substrate specificities of deuterolysin (EC.3.4.24.39), a 19 kDa Zn-protease from *Aspergillus oryzae*, were investigated with various fluorogenic peptide-MCAs and basic protein, histone. *N*-Butoxycarbonyl-Arg-Val-Arg-Arg-MCA was the best sensitive substrate for deuterolysin. Deuterolysin showed a high activity toward the peptide bonds following pair of basic residues in calf thymus histone H4. Furthermore, an application of deuterolysin for food processing was investigated. Co-deuterolysin was purified to examine cobalt coordination and a geometry was analyzed by a Q-band (33.9570 GHz) electron paramagnetic resonance (EPR). The g principal values were determined to be $g_{xx}=5.2$, $g_{yy}=4.75$, and $g_{zz}=2.24$; the metal center was a divalent cobalt ion in a high spin state. A recombinant penicillolysin, a heat-labile 19 kDa Zn-metalloendopeptidase from *Penicillium citrinum*, was overexpressed in *Aspergillus oryzae*. Molecular and enzymic properties of the recombinant enzyme were confirmed. The zinc-ligands determination of penicillolysin was performed by site-directed mutagenesis. In attempts to define the molecular basis for the differences in thermal stability, several kinds of mutants were introduced using site-directed mutagenesis. The resulting mutant proteins exhibited comparable catalytic efficiency to the wild type enzyme and some showed a higher tolerance to temperature. T81P, R33E/E60R and A167E mutants of penicillolysin were found to be more thermally stable than wild type enzyme.

Key words: aspzincin, cobalt-substituted deuterolysin, deuterolysin, penicillolysin, substrate specificity, zinc-protease.

1. 緒言

プロテアーゼはその活性中心の構造により、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、プロテアソームの5つに分類される。この中で、金属プロテアーゼは活性中心に亜鉛を含むプロテアーゼの総称であり、EDTA等の金属キレート剤で亜鉛がはずれることによって失活する。亜鉛酵素中の亜鉛結合モチーフは、従来は、グルジンシンやメトジンシンなど5群に分類されていた。ところが、アスブジンシンのモチーフは、HEXXH+Dという構造をしており、デューテロリシン (EC 3.4.24.39)によって新奇モチーフとして近年提唱された¹⁾。デューテロリシンは、麹菌 *Aspergillus sojae*、*Aspergillus oryzae* が分泌生産する亜鉛金属プロテアーゼで、従来、中性プロテアーゼ II と呼ばれていた²⁾。*Aspergillus* 属は、日本古来の発酵食品である味噌や醤油、日本酒 (清酒) の生産に伝統的に使用されてきた。この属菌の生産する酵素は、その食品の味や旨味の醸成に関わるという見地から早くから注目され、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼについての研究がされてきた。一方、金属プロテアーゼについては比較的報告は少なく、精製され、性質が検討されているものに、麹菌由来の酵素 *A. sojae* 中性プロテアーゼ I、中性プロテアーゼ II、*A. oryzae* 中性プロテアーゼ I、中性プロテアーゼ II がある。中性プロテアーゼ I は、両菌株の酵素ともサーモリシン (EC 3.4.24.27) と酵素化学的、物理化学的に性質が類似している。デューテロリシン (中性プロテアーゼ II) は、等電点 4.0、177 アミノ酸残基、分子質量 19 kDa と非常に小さく、サルミンやヒストン、プロタミンなどの塩基性タンパク質を特異的に加水分解するが、一般にプロテアーゼの基質として用いられているカゼインやヘモグロビンにはほとんど作用しないというユニークな特異性を有する。また、*A. sojae* 由来のデューテロリシンは、100℃

で熱処理後の残存活性が約 80%近く見られるが、75℃付近ではその残存活性が著しく低下するといった挙動が見られ²⁾、*A. oryzae* 酵素でも同様なことが報告されている³⁾。最近、X線結晶構造解析によって、*A. oryzae* 由来デューテロリシンの亜鉛は His¹²⁸、His¹³²、Asp¹⁴³ に配位していることが報告された⁴⁾。

デューテロリシンとは一次構造上は 68%の配列が同一のものとして、*Penicillium citrinum* が生産する金属プロテアーゼ、ペニシロリシンが挙げられる⁵⁾。この他に *Aspergillus flavus* や *Aspergillus fumigatus* でも相同性の高い酵素が見つけられている。ペニシロリシンは分子質量 2 万以下と小さく、塩基性タンパク質に良く作用するといった性質はデューテロリシンと類似している。しかし、ペニシロリシンは等電点が 9.6 と非常に高いこと、熱に対する安定性が著しく低いことなどが相違している⁵⁾。両酵素は互いに一次構造上の相同性が高いが、これまでに知られている他の金属プロテアーゼとは HEXXH の共通モチーフ以外での相同性がなく、新規のファミリー、アスブジンシンを形成している。したがってこれらの酵素の活性中心や触媒機構については非常に興味をひくところであるが、それに対する知見はほとんど得られていない。本研究では、アスブジンシン・ファミリーであるデューテロリシンとペニシロリシンの金属中心と触媒機構に関する知見を得ることを試みた。(1) デューテロリシンにおいては、低分子合成基質を探索し、ユニークな基質特異性について詳細に調べる。ついで、デューテロリシンの産業的利用について検討すること。さらに、電子常磁性共鳴分光スペクトル (EPR) 測定を用いてその特異性を発現する金属中心に関する情報を得ること。さらに、(2) ペニシロリシン遺伝子 *plnC* の麹菌による大量発現系の構築を行い、組換え体酵素について物性を調べ、ペニシロリシンの亜鉛配位アミノ酸残基について部位特異的変異法によって同定を行

うこと。さらに、ペニシロリシンにおける耐熱化の解析を部位特異的変異法によって行うこと。以上のことを目的とした。

2. デューテロリシンの基質特異性

デューテロリシンには従来良好な低分子合成基質は全く見いだされていなかった。Native デューテロリシンの精製は、麹菌のプロテアーゼ M 剤(天野エンザイム、名古屋)に等量の水を加え、70℃、15 分間の熱処理後、80% 硫酸分画で得られた沈殿を 10 mM 酢酸 buffer pH5.0 で透析した。この上清溶液をイオン交換クロマトグラフィー(Super Q カラム、2.5 × 20 cm)を用いて精製した。酵素活性は、基質として N-Butoxycarbonyl-L-arginyl-L-valyl-L-arginyl-L-arginyl-4-methylcoumaryl-7-amide (Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA)を用い、pH9.0 における酵素反応によって遊離した 7-amino-4-methylcoumarin (AMC)を蛍光分光光度計を用い励起波長 360nm、蛍光波長 440nm で測定した。酵素単位 katal (kat)は、30℃において 1 秒間に 1 モルの AMC を生成する酵素量として規定した。

33 種類の MCA 合成基質に対するデューテロリシンの反応を調べた。そのうち、Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA を最もよく加水分解し、優れた微量分析用基質であることを明らかにした。反応速度論的解析を行った結果、 $K_m = 26.4 \pm 4.0 \mu\text{M}$ 、 $k_{cat} = 2.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{cat} / K_m = 833 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ であった。さらに、デューテロリシンは Boc-Leu-Arg-Arg-MCA、Boc-Leu-Lys-Arg-MCA、Z-Arg-Arg-MCA に対して活性を示した。これらの基質の特徴として、切断部位の N 末端側に 2 つの塩基性アミノ酸残基 (Arg や Lys)を有していることから、デューテロリシンは、P2-P1 サイトが共に塩基性のアミノ酸残基の場合にそのカルボキシル基側をよく加水分解することを明らかにした⁶⁾。

さらに、デューテロリシンによるヒストン H4 分解を行った。その結果、Arg¹⁷ - His¹⁸、His¹⁸ - Arg¹⁹、Arg³⁶ - Leu³⁷ のペプチド結合を特異的に加水分解した。いずれも基質の P2-P1 サブサイトに塩基性アミノ酸をもつものであった。さらに長時間の反応では他の結合にも作用した。デューテロリシンの特異性はサーモリシンなどの金属プロテアーゼとは異なり、合成基質ならびにヒストン H4 で見られたように 2 つの塩基性アミノ酸残基の C 末端側をよく切断することが結論された⁶⁾。

3. デューテロリシンの応用

酒造、醤油、味噌などの醸造工業における最も重要な役割を担う麹菌のもつ安全で隠れた機能性を探索するために本研究を始めた。デューテロリシンの示す基質特異性はシステムプロテアーゼによく見られ、中でも動物の筋肉中に見いだされるカテプシン B や L と類似している。これらのカテプシン類は肉の熟成に関与しているとの報告⁷⁾があることから、デューテロリシンの肉への応用を考え、生成する風味および香気に及ぼす影響について検討した。デューテロリシンを 60℃、4 時間にて豚肉に作用させた結果、酵素を添加

しないものに比べると、酵素処理をしたのは短時間の処理であるにも関わらず非常に強い熟成感を有し、酸味を感じさせないものであった。そこで肉反応物の可溶化部をゲル濾過分析し、官能評価をした結果、800 - 2,000Da の画分で熟成感が得られ、かつ酸味がおさえられていることが確認された。この画分の C 末端のアミノ酸分析を行った結果、リシン、アルギニン、そしてグルタミン酸が豚肉の構成アミノ酸と比較して高い値を示した。香気成分の分析の結果、脂質の酸化分解により生成するとされるヘキサナールが抑制され、また、熟成に関与しているとされているサルファイド類やケトン類が増加していることを確認した。最近、このようなデューテロリシンの作用による肉の迅速な熟成味生成法は実際に食品工業において利用されるようになった。

4. デューテロリシンの電子常磁性共鳴分光スペクトル(EPR)

デューテロリシンの亜鉛金属中心に関する情報をさらに得るために、電子常磁性共鳴分光スペクトル(EPR)の測定を行った。活性中心に存在する亜鉛は、磁気的にも分光学的にも不活性であるため、亜鉛をコバルトに置換した Co-デューテロリシンを精製した。デューテロリシンを 0.5 mM EDTA を含む 10 mM 酢酸 buffer pH5.0 中で 30℃、20 分間インキュベートし、ゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex TM G-50 Fine カラム、2.5 × 100 cm)に供した。アポ酵素を集めて MilliQ 水にて透析を行った。その後、1 mM 硫酸コバルト(II)を加え 0℃、30 分間インキュベートした。その溶液をゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex TM G-50 Fine カラム、1.0 × 30 cm)に供し、Co-デューテロリシンを集め、MilliQ 水で透析したものを精製酵素とした。精製した Co-デューテロリシンの熱安定性を調べた結果、100℃熱処理後 10 分間氷冷した酵素に約 60%近くの残存活性があった。また、円二色性(CD)スペクトル測定や熱融解温度(T_m)測定の結果、デューテロリシンと Co-デューテロリシンの両酵素分子間において構造が大きく変化していないことが推測された。

0.57mM の Co-デューテロリシンを用いて吸収スペクトルを測定した。その結果、吸収エネルギーとモル吸光係数 ϵ は、18,450 cm^{-1} 、 $\epsilon = 245 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、及び 20,100 cm^{-1} 、 $\epsilon = 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。

EPR の測定用試料は、1-5mM の Co-デューテロリシンを含む水：グリセロール=1：1(V/V)溶液で、空気飽和及び真空脱気したものを用いた。Q バンド EPR は Bruker ESP300 に Oxford CF935 ヘリウムフロークライオスタットを用い、5 - 10K で測定した。不対電子の吸収位置を示す g 値は、 $g_{xx} = 5.20$ 、 $g_{yy} = 4.75$ 、 $g_{zz} = 2.24$ であった。EPR スペクトル(図 1)よりコバルトイオンは 2 価の高スピン状態($S = 3/2$)であり、歪んだ構造であることがわかった⁶⁾。吸収スペクトルの結果と合わせるとコバルトの配位環境は歪んだ三角両錘または歪んだ四面体構造であると観察された⁶⁾。

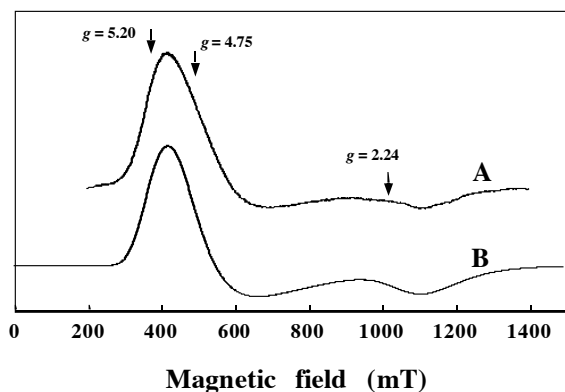


図 1. Co-デューテロリシンの EPR スペクトル

A; 観測スペクトル

B; シミュレーションスペクトル

5. ペニシロリシンの発現と亜鉛金属中心の同定

麹菌発現ベクター pNAN8142 の制限酵素サイトにペニシロリシン遺伝子 (*plnC*) を組み込み (pNANplnC)、硝酸還元酵素欠損変異株 *A. oryzae* *niaD* 300 株にトランスフォーメーションし、*plnC* の大量発現系を構築した。形質転換した麹菌を DPY 培地により 30℃ で液体培養し、培養時間 90 時間後の培養液を回収した。組換えペニシロリシンは培養液中に活性型酵素として発現されていた。その培養液を弱陽イオンカラム (CM Sepharose Fast Flow, 1.0 × 30 cm) にて均一に精製した。

精製した組換え体ペニシロリシンの物性を調べた。

MCA 合成基質に対するペニシロリシンの最適 pH 8.0 における加水分解反応を調べた。その結果、Boc-Arg-Val-Arg-Arg-MCA を最もよく加水分解をした。

ペニシロリシンの推定される亜鉛結合残基として His¹²⁸、His¹³²、Asp¹⁴³、Asp¹⁶⁴ に部位特異的変異を行った。組換え変異体は、*A. oryzae* によって発現、それぞれの変異酵素を精製した。その結果、H128R、H132R、D143N の各変異酵素において酵素活性が全く見られず、亜鉛も含まれていなかった。変異酵素 D164N は、亜鉛が 1 mol / mol 酵素含まれていたが、比活性は Wild type 酵素より 50% 減少していた。His¹²⁸、His¹³²、Asp¹⁴³ は、亜鉛結合モチーフを形成する亜鉛結合残基であることを確認した。ペニシロリシンは、アスプジンシンという、HEXXH+D からなる亜鉛結合モチーフを持つファミリーに属することを明らかにした。最近知られたマイタケ (*Grifola frondosa*) からの新規アスプジンシン (*GfMEP*) の X 線構造解析⁸⁾ による亜鉛配位とも類似した結果となった。

6. ペニシロリシンの部位特異的変異による熱安定化

ペニシロリシンはデューテロリシンと一次構造において 68% 同一である。ペニシロリシンはデューテロリシンと比べて分子質量や塩基性タンパク質に良く作用するといった類似性を有するが、熱安定性に関しては、デューテロリシンが 100℃ 処理後氷冷 10 分後の活性は、約 80% の残存活性が見

られるのに対し、ペニシロリシンは、65℃ 処理でほとんど失活するという極端な違いがある。両酵素共に分子内に 3 つのジスルフィド結合を有することからデューテロリシンの耐熱性はジスルフィド結合によるものではない。また、デューテロリシンにはカルシウムも結合していないのでカルシウムによる耐熱性の寄与はない。このような違いの要因を探る為に、デューテロリシンの X 線結晶構造解析のデータ⁴⁾ (図 2、A) と両酵素のアミノ酸配列 (図 2、B) の比較から、部位特異的変異によりペニシロリシン分子に耐熱性を付与する研究を行った。

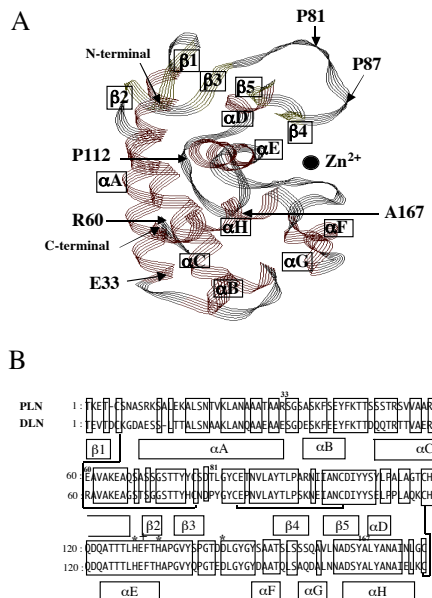


図 2. デューテロリシンの立体構造 (A) とペニシロリシンとデューテロリシンのアミノ酸配列 (B)。

+ ; 触媒残基

* ; 亜鉛結合残基

一般的に、プロリン側鎖は主鎖との共有結合によって固定されていることから他の残基よりも変性構造における構造の自由度が少ないとされている。両酵素の配列の比較の結果、デューテロリシンには存在してペニシロリシンにはないプロリン残基の位置が 3 箇所あり、これらのアミノ酸残基についてペニシロリシンの変異体を作製した (T81P、T87P、A112P)。

ペニシロリシンとデューテロリシンの N 末端付近の相同性は 60% とやや低くなっており、そこにはデューテロリシンにおいて、酵素の骨格を成している長い 2 つのヘリックス (A と C) が存在している。デューテロリシンでは、ヘリックス間で、Glu³³ と Arg⁶⁰ がイオン結合しているが、ペニシロリシンでは Arg³³、Glu⁶⁰ となっている。デューテロリシンの Glu³³ は αA ヘリックス上に、Arg⁶⁰ は αC ヘリックス上に存在する。そこで、ヘリックス間の酸性残基と塩基性残基の静電的相互作用に着目し、ペニシロリシンをデューテロリシントタイプに二重変異 (R33E / E60R) により部位特異的に変

換した。

アスブジンシンファミリーによく保存されている TxxHExxH モチーフは、デューテロリシンでは α E ヘリックスに位置する。熱安定性酵素である *G. frondosa* からの GfMEP はモチーフ上の Thr と C 末端領域の Glu¹⁵⁷ が水素結合を形成している。一方、その位置に相当するペニシロリシンの残基は Ala¹⁶⁷ であるため、A167E の変異体を作成した。

各変異体酵素は *A. oryzae* にて発現をした。精製した変異体酵素の CD スペクトルをそれぞれ測定した結果、二次構造的に違いは見られなかった。また、反応速度論的解析の結果、触媒効率は、R33E/E60R と T81P では野生型酵素、WT とほとんど変わらず、A167E は WT より 1.6 倍上昇していた。

不可逆的な熱変性の過程で 50%変性した温度を融解温度、 T_m と定義した。pH5.0、222 nm のスペクトルより、WT では T_m = 68°C、T81P では T_m = 71°C であった。R33E/E60R と A167E の T_m はそれぞれ 70°C であった。結果を図 3 に示す。

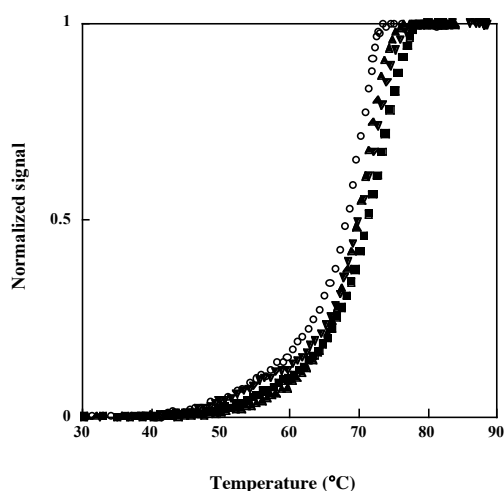


図 3. 各変異酵素の熱転移曲線 (222 nm, pH5.0)
○ ; WT, ▲ ; R33E/E60R, ▼ ; A167E, ■ ; T81P

残存活性が 50%になったときの温度(T_{50})は、T81P 酵素では 68°C となり、WT 酵素(62°C)と比較して 6°C 上昇した。81 番目の残基は、デューテロリシンでは、 β 3- β 4 シート間のループ上に存在する。R33E/E60R 酵素の T_{50} は 66°C となり、WT 酵素より 4°C 上昇し、A167E 酵素の T_{50} は 65°C となり、WT 酵素より 3°C 上昇した。結果を図 4 に示す。一方、T87P、A112P 酵素は熱安定性が見られず、むしろ不安定になった。65°C における残存活性が 50%になる時間を調べたところ、WT、R33E/E60R、A167E、T81P はそれぞれ 4、12、12、21min であった。T81P は R33E/E60R と A167E よりも熱安定性が増した。Pro⁸¹ はペニシロリシンの熱安定性にとって同様に重要な残基であることがわかった。さらに R33E/E60R/T81P のトリプル変異体を作成したが、熱安定性は見られなかった。酵素の熱安定性は様々な要因によって影響されるが、現時点で、 β 3- β 4 シートのループ上の Pro⁸¹

残基、そして α A ヘリックス上の Glu³³ と α C ヘリックス上の Arg⁶⁰ 間の相互作用、そして C 末端の α H と亜鉛結合サイトが存在する α E 間の水素結合がペニシロリシンの熱安定化に重要であることを明らかにした⁹⁾。

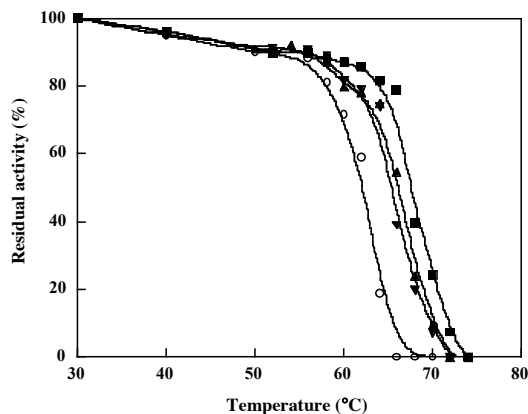


図 4. 温度変化による各変異酵素の残存活性 (pH 5.0)
○ ; WT, ▲ ; R33E/E60R, ▼ ; A167E, ■ ; T81P

7. 結論

本論文は 19 kDa の亜鉛プロテアーゼ、アスブジンシン・モチーフ・ファミリー、分子の構造的特性と特異性に関し詳細な検討を加えた。19 kDa 亜鉛プロテアーゼの熱安定性は、N 末端付近の α A と α C の間の Glu³³-Arg⁶⁰ 間の結合、そして β 3- β 4 シート間のループ上の Pro⁸¹ 残基の存在、さらに C 末端の α H 上の Ala¹⁶⁷ の変異体 A167E と亜鉛結合サイトに近い Thr¹²⁵ との水素結合によってもたらされることをはじめて明らかにしたもの⁹⁾である。

8. 参考文献

- 1) Fushimi, N., Ch'ng, E. E., Nakajima, T. and Ichishima, E. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24195-24201
- 2) Sekine, H. (1972) *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 207-216
- 3) Tatsumi, H., Ikegaya, K., Murakami, S., Kawabe, H., Nakano, E. and Motai, H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1208**, 179-185
- 4) McAuley, K. E., Jia-Xing, Y., Dodson, E. J., Lehmbeck, J., Ostergaard, P. R. and Wilson, K. S. (2001) *Acta Cryst.*, **D57**, 1571-1578
- 5) Yamaguchi, M., Hanzawa, S., Hirano, K., Yamagata, Y. and Ichishima, E. (1993) *Phytochemistry*, **33**, 1317-1321
- 6) Doi, Y., Lee, B. R., Ikeguchi, M., Ohoba, Y., Ikoma, T., Yero-Kubota, S., Yamauchi, S., Takahashi, K., and Ichishima, E. (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 264-270
- 7) 西村敏英 (2001) 食品の呈味形成におけるペプチドの役割を探る—ペプチドの呈味性および味覚変革作用。化学と生物, **39**, 177-183
- 8) Hori, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Nonaka, T., Tanaka, N., Hashimoto, Y., Ueki, T. and Takio, K. (2001) *Acta Cryst.*, **D57**, 361-368
- 9) Doi, Y., Akiyama, H., Yamada, Y., Ch'ng, E.E., Lee, B.R., Ikeguchi, M. and Ichishima, E. (2004) *PEDS*, **17**, 261-266