

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380061

研究課題名（和文）サーモライシンの食品工業への利用性拡大を目的とした蛋白質工学と反応制御工学

研究課題名（英文）Protein engineering and reaction control technology targeting thermolysin for the expansion of its use in food industry

研究代表者

井上 國世（INOUE KUNIYO）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10223249

研究成果の概要（和文）：サーモライシン（TLN）は中等度好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* が菌体外に生産する好熱性中性亜鉛プロテイナーゼである。TLN は加水分解の逆反応を利用してペプチドの合成に広く応用されてきた。本研究では、TLN の食品工業への利用性拡大を目的として、蛋白質工学と反応制御工学を用いて TLN の活性や安定性を増大させ、基質特異性を改変した。

研究成果の概要（英文）：Thermolysin (TLN) is a thermostable neutral metalloproteinase produced in the culture broth of *Bacillus thermoproteolyticus*. It is widely used for the peptide bond formation through reverse reaction of hydrolysis. In this study, for the expansion of the use of TLN in food industry, we increased the activity and stability of TLN and altered its substrate specificity using protein engineering and reaction control technology.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,000,000 | 1,800,000 | 7,800,000 |
| 2009年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2010年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 12,300,000 | 3,690,000 | 15,990,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用生物化学

キーワード：酵素化学 酵素利用学

1. 研究開始当初の背景

サーモライシンは (thermolysin ; 以下 TLN と略称) は、中等度好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* が菌体外に生産する好熱性中性亜鉛プロテイナーゼである。TLN は 1 分子あたり活性に必須の 1 個の Zn^{2+} と安定性に寄与する 4 個の Ca^{2+} をもつ。TLN は好熱性酵素や亜鉛プロテイナーゼを代表する酵素として、その構造や機能について多くの研究がなされてきた。また、TLN は既存のプロテアーゼより高い活性と熱安定性ならびに

広い基質特異性という産業酵素として優れた特徴を有しているため、調味料の製造だけでなく、加水分解の逆反応を利用して人工甘味剤アスパルテームの前駆体である *N*-carbobenzoxy-L-Asp-L-Phe methyl ester (ZDFM) をはじめとするペプチドの合成に応用されてきた。一方、TLN を食品蛋白質（ダイズ、コムギ、ホエイなど）に作用させると苦味ペプチドが生成されるという問題点が指摘されている。これは TLN が疎水性アミノ酸残基の C 末端側のペプチド結合に対し高い

基質特異性をもつことに起因する。

本研究代表者はこれまでに、TLN の塩による活性化と安定化ならびに溶解度の上昇、アルコールによる阻害、 Co^{2+} および Ca^{2+} による活性化と阻害、組換え TLN の発現法について広範な研究を行い、成果を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白質工学と反応制御工学を用いて TLN の活性や安定性を増大させ、基質特異性を改変することにより、TLN の食品工業への利用性を拡大させることである。

3. 研究の方法

(1) 組換え TLN の調製: 大腸菌を宿主として、「TLN のプレプロ配列」と「N 末端に pelB リーダー配列を含む TLN の成熟型配列」を TLN をコードする *B. thermoproteolyticus* の *npr* 遺伝子のプロモーター配列の支配下に別々のポリペプチドとして持続的に発現させるプラスミドを構築した。このプラスミドで形質転換された大腸菌 JM109 を 37°C で 48 時間培養した。培養上清から疎水性相互作用クロマトグラフィーと Gly-D-Phe をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより TLN を精製した。

(2) カゼイン分解活性の測定: カゼインを基質として、pH 7.5、25°C で反応を行った。加水分解により生じた酸可溶性ペプチドを 275 nm の吸光度から定量した。

(3) FAGLA 分解活性の測定: 基質として N -[3-(2-furyl)acryloyl]-Gly-L-Leu amide (FAGLA) を用い、pH 4-9、25°C で反応を行った。加水分解に伴う反応液の 345 nm の吸光度変化から反応初速度を求めた。

(4) ZDFM 分解活性の測定: 基質として ZDFM を用い、pH 7.5、25°C で反応を行った。加水分解に伴う反応液の 224 nm の吸光度変化から反応初速度を求めた。あるいは、一定時間後反応を停止させ、反応液を逆相カラムにかけ、アセトニトリルの濃度勾配により FM、ZD、ZDFM の順に溶出させ、257 nm の吸光度から定量し反応初速度を求めた。

(5) ZDFM 合成活性の測定: 基質として ZD と FM を用い、pH 7.5、25°C で反応を行った。一定時間後反応を停止させ、反応液を逆相カラムにかけ、上記(4)に記載の方法により反応初速度を求めた。

(6) 熱安定性の測定: TLN を 55°C~95°C で一定時間熱処理後、残存する FAGLA 分解活性を pH 7.5 で上記(3)に記載の方法により測定した。

4. 研究成果

(1) TLN の活性部位を構成するポリペプチド領域の役割: TLN の活性部位は以下の 5 つのポリペプチド領域から構成される。

- N-terminal sheet (Asn112-Trp115)
- α -helix 1 (Val139-Thr149)
- C-terminal loop 1 (Asp150-Gly162)
- α -helix 2 (Ala163-Val176)
- C-terminal loop 2 (Gln225-Ser234)

α -helix 1 は活性に必須の Glu143 や亜鉛リガンドである His142 と His146 を含む。他の 4 つの領域の役割を解析するために、12 残基 (Ala113, Phe114, Trp115, Asp150, Tyr157, Gly162, Ile168, Ser169, Asp170, Asn227, Val230, Ser234) のうち 1 残基を荷電性残基 (Asp, Glu, His, Lys, Arg) および Ala に置換した。N-terminal sheet あるいは α -helix 2 のアミノ酸残基の変異型酵素のうち 85% (29/34) は FAGLA 分解活性とカゼイン分解活性を消失した。このことから、N-terminal sheet と α -helix 2 は活性に重要であることが示された。一方、C-terminal loop 1 あるいは C-terminal loop 2 のアミノ酸残基の変異型酵素のうち 43% (15/35) は FAGLA 分解活性を消失し、カゼイン分解活性を保持した。このことから、C-terminal loop 1 と C-terminal loop 2 は基質認識に重要であることが示された。作製した変異型酵素のうち、D150E の FAGLA 分解活性 (k_{cat}/K_m) は野生型酵素 (WT) の 2.7 倍に、ZDFM 分解活性 (k_{cat}/K_m) は WT の 3.5 倍に増加した。また、I168A の FAGLA 分解活性は WT の 2.1 倍に、ZDFM 分解活性は WT の 1.8 倍に増加した (表 1)。

(2) S₂ サブサイトを構成する Phe114 への変異: Phe114 を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した。疎水性側鎖をもつアミノ酸残基 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met) および His に置換した変異型酵素のカゼイン分解活性は WT と同じであったが、FAGLA 分解活性は WT の 20-60% に、ZDFM 分解活性は 1-20% に低下した (表 1)。高分子基質と低分子基質では 114 位の残基との相互作用に差があると考えられる。荷電性側鎖をもつアミノ酸残基 (Arg, Lys, Asp, Glu) に置換した変異型酵素のカゼイン、FAGLA、ZDFM 分解活性は WT の 1-20% に低下した。

(3) S₂ サブサイトを構成する Trp115 への変異: Trp115 を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した。W115F のカゼインおよび ZDFM 分解活性は WT と同じであったが、FAGLA 分解活性は WT の 2.0 倍に増加した。W115Y のカゼイン分解活性は WT と同じであったが、FAGLA 分解活性は WT の 8.0 倍に、ZDFM 分解活性は WT の 3.0 倍に増加した (表 1)。このように、Gly117 に変異を導入することにより基質特異性が変化した。他の 17 種類のアミノ酸残基に置換した変異型酵素は活性を消失した。このことから、触媒活性には 115 位に芳香族アミノ酸残基が必要であることが示された。

(4) Si' サブサイトを構成する Leu202 への変異 : Leu202 を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した。L202Y のカゼイン分解活性は WT の 40%に低下したが、FAGLA 分解活性は WT の 2.6 倍に、ZDFM 分解活性は WT の 2.1 倍に増加した。L202V、L202K、L202R のカゼイン分解活性は WT のそれぞれ 30%、10%、10%に低下し、FAGLA 分解活性は WT の 70%、60%、30%に低下したが、ZDFM 分解活性は WT の 2.1 倍、3.7 倍、3.7 倍に増加した (表 1)。このように、L202 に変異を導入することにより基質特異性が変化した。P₁ の残基が電荷をもたない FAGLA と負電荷をもつ ZDFM では 202 位の残基との相互作用に差があると考えられる。

(5) 逆平行 β シートを構成する 2 つのポリペプチド (Asn112-Trp115 と Ser118-Tyr122) をつなぐループ (Asn116-Gly117) への変異 : Asn116 と Gly117 をそれぞれ Ala、Asp、Glu、Lys、Arg に置換した。N116D のカゼイン分解活性は WT の 80%に低下したが、FAGLA 分解活性は WT の 2.3 倍に、ZDFM 分解活性は WT の 1.4 倍に増加した。G117E のカゼイン分解活性は WT の 1.1 倍であり、FAGLA 分解活性は WT の 80%に減少し、ZDFM 分解活性は WT の 1.3 倍に増加した (表 1)。このように、Gly117 に変異を導入することにより基質特異性が変化した。他の変異型酵素の FAGLA および ZDFM 分解活性は WT の 0-80%に減少した。このことから、ループ Asn116-Gly117 はポリペプチド Asn112-Trp115 と Ser118-Tyr122 の構造に影響を及ぼすと考えられた。

(6) 亜鉛配位性残基 Glu166 への変異 : TLN は 3 つの残基 His142、His146、Glu166 により触媒活性に必須の Zn²⁺ を保持している。今回、Glu166 に着目し、Glu166 を Ala、Cys、Asp、His、Gln に置換した。E166D のカゼイン分解活性は WT の 8%に減少したが、FAGLA 分解活性は NaCl 非存在下では WT の 2.5 倍に増加した (表 1)。WT では 4 M NaCl 添加により活性が 13 倍に増加したが、E166D では 3.8 倍しか増加しなかった。その結果、E166D の 4 M NaCl 存在下での活性は WT の 70%に低下した。このように、E166D の NaCl による活性化は WT と大きく異なった。WT では 1 mM CoCl₂ の添加により FAGLA 分解活性が非添加時の 3.4 倍に増加したが、E166D では非添加時の 13%に減少した。このように、WT では Zn²⁺ が Co²⁺ に置換されると活性化されたが、E166D では活性が低下した。E166D は WT よりも Co²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ に対する親和性が高かった (E166D の Co²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ に対する K_{1/2} はそれぞれ 4.9、1100、8.0 μM、WT のそれらは 180、6800、1600 μM)。一方、E166D の Cu²⁺、Cd²⁺ に対する親和性は WT と同程度であった (E166D の Cu²⁺、Cd²⁺ に対する K_{1/2} はそれぞれ 0.33、1.6 μM、WT のそれらは 0.56、

2.2 μM)。他の変異型酵素 (E166A、E166C、E166H、E166Q) はカゼインおよび FAGLA 分解活性をもたなかった。Zn²⁺ を保持していないか、保持しても空間的な配置が変化しているために活性を消失したと考えられる。

(7) 変異の組み合わせによる活性と熱安定性の向上 : L144S の FAGLA 分解活性は WT の 6.3 倍、ZDFM 分解活性は WT の 5.3 倍に増加した。D150E の FAGLA 分解活性は WT の 2.7 倍、ZDFM 分解活性は WT の 3.5 倍に増加した。L155A を 80°C で熱処理したときの一次の熱失活定数 (k_{obs}) は WT の 30%に減少した。この 3 つの変異を組み合わせさせた 3 重変異型酵素 L144S/D150E/L155A の FAGLA 分解活性は WT の 8.6 倍、ZDFM 分解活性は WT の 10.2 倍、 k_{obs} は WT の 60%であった (表 1)。すなわち、TLN に活性を向上させる変異と安定性を向上させる変異を組み合わせると、活性と熱安定性がともに向上した。

(8) 活性が向上した変異型 TLN による ZDFM の合成 : ZD と FM を基質として pH 7.5、25°C で ZDFM 合成反応を行った。D150E の k_{cat} は WT の 2.9 倍であった。初濃度が 100 nM TLN、5 mM ZD、5 mM FM のとき、D150E は 4 時間で平衡に達したが、WT は 12 時間を要した。このことから、活性が向上した変異型 TLN を用いることにより、ZDFM を効率的に合成できることが示された。

(9) ZDFM 分解反応における生成物の放出順序 : TLN に ZD を加えると、TLN の蛍光スペクトルの強度が減少したが、FM を加えても蛍光スペクトルは変化しなかった。TLN に ZD を加えると ZDFM 加水分解において混合型阻害が見られたが、FM を加えても阻害が見られなかった。以上のことから、ZDFM 合成反応では ZD、FM の順で TLN に結合し、ZDFM 分解反応では、FM、ZD の順に TLN から放出されることが示唆された。

(10) TLN の Tyr 残基と Trp 残基の存在状態 : TLN は 1 分子あたり Tyr 残基を 28 個、Trp 残基を 3 個もつ。グリセロールを用いた溶媒効果分光法による *N*-Ac-Tyr、*N*-Ac-Trp、TLN の紫外吸収差スペクトルを解析した結果、TLN では 17.9 個の Tyr 残基と 2.2 個の Trp 残基が溶媒に接触していることが示唆された。これは、結晶構造解析から得られた結果 (6.0 個の Tyr 残基と 0.2 個の Trp 残基が溶媒に接触) と大きく異なった。

(11) TLN の熱安定性と溶解度に対する糖類の効果 : TLN の 30 分間の熱処理によって活性が半減する温度 (T_{50}) は、糖類を添加しないときは 67.7°C であったが、1 M トレハロース添

加時は 85.8°C、2 M トレハロース添加時は 95°C以上、1 M マルトース添加時は 80.2°C、1 M スクロース添加時は 84.6°Cであった。TLN の溶解度は、糖類を添加しないときは 1.2 mg/ml であったが、トレハロース濃度が増加すると指数関数的に増大し、2 M 添加時では 140 mg/ml に達した。マルトースやスクロースでも同様の効果が見られた。このように、糖類添加により TLN の熱安定性と溶解度が上がった。

(12) TLN の活性に対する LiCl の効果: TLN の FAGLA 分解活性は LiCl 濃度が 4 M までは指数関数的に増大したが、4 M から 7 M では減少し、7 M 以上では消失した。6 M LiCl では、活性は経時的に減少したが、LiCl 濃度を減少させると回復した。一方、8 M LiCl では、活性は不可逆的に消失した。

表 1. 本研究により得られた変異型酵素の FAGLA 分解活性 (k_{cat}/K_m)、ZDFM 分解活性 (k_{cat}/K_m)、80°C で熱処理したときの一次の熱失活定数 (k_{obs}) の、WT の値を 1.0 としたときの相対値。

| TLN | 相対値 (倍) | | | |
|------------------------------|---------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | casein 比活性 | FAGLA k_{cat}/K_m | ZDFM k_{cat}/K_m | k_{obs} ^a |
| WT | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L144S | 0.3 | 6.3 | 5.3 | 1.0 |
| D150A | 1.0 | 2.7 | 3.5 | 0.9 |
| I168A | 0.9 | 2.1 | 1.8 | 1.1 |
| L144S/D150E | 0.3 | 7.0 | 10.5 | 0.9 |
| L144A/I168A | 0 | 0 | 0 | NT |
| D150E/I168A | 0.7 | 4.9 | 8.9 | 1.8 |
| S53D | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 0.2 |
| L155A | 0.6 | 0.9 | 0.7 | 0.3 |
| G8C/N60C/S65P | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 0.3 |
| S53D/L155A | 0.9 | 1.1 | 1.0 | 0.1 |
| S53D/G8C/ N60C/S65P | 1.1 | 1.1 | 0.8 | 0.3 |
| L155A/G8C/ N60C/S65P | 0.8 | 1.2 | 0.8 | 0.2 |
| S53D/L155A/ G8C/N60C/S65P | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.1 |
| L144S/D150E/ L155A | 0.3 | 8.6 | 10.2 | 0.6 |
| F114V | 1.2 | 0.3 | 0.02 | NT ^b |
| F114L | 1.4 | 0.5 | 0.2 | NT |
| W115Y | 1.0 | 8.0 | 3.0 | NT |
| L202V | 0.3 | 0.7 | 2.1 | NT |
| L202Y | 0.4 | 2.6 | 2.1 | NT |
| L202K | 0.1 | 0.6 | 3.7 | NT |
| L202R | 0.1 | 0.3 | 3.7 | NT |
| N116D | 0.8 | 2.3 | 1.4 | 1.9 |
| G117E | 1.1 | 0.8 | 1.3 | 1.5 |
| E166D | 0.1 | 3.8 | NT | NT |

^a 80°C で熱処理したときの一次の熱失活定数

^b not tested

(13) まとめ: TLN の活性部位の残基 (Leu144、Asp150、Ile168) に変異を導入するとペプチド基質分解活性が向上した。N 末端領域の残基 (Ser53、Gly8、Asn60) および活性部位の残基 (Leu155) に変異を導入することにより熱安定性が向上した。これらの変異を組み合わせると、活性と熱安定性がともに向上した。N 末端領域のループの残基 (Asn116、Gly117)、S₂ サブサイト (Trp115)、S₁' サブサイト (Leu202)、亜鉛配位性残基 (Glu166) に変異を導入することにより、基質特異性が変化した。LiCl の添加により活性が向上した。糖類の添加により熱安定性と溶解度が向上した。このように、蛋白質工学と反応制御工学を用いて、TLN の活性と熱安定性を向上させ、基質特異性を改変した。今後、より特徴のある変異型 TLN が得られ、効率のよい反応条件が見出されることが期待される。そして、特徴的な機能をもつ変異型 TLN が将来、食品工業や他の分野で利用されると信じている。

なお、本研究を推進することにより得られた知見は、本研究代表者が関与するヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ 7、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、ヒトマトリプターゼ、コムギ由来 α -アミラーゼ阻害剤 0.19 AI、ダイズタンパク質の研究に対しても貴重なものであり、その推進に有益であったことを付記する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Menach, E., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Effects of site-directed mutagenesis of the loop residue of the N-terminal domain of Gly117 of thermolysin on its catalytic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 2457-2462, 2011 査読有
- ② Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Effects of the mutational combinations on the activity and stability of thermolysin. *J. Biotechnol.*, 147: 7-16, 2010 査読有
- ③ Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K.: Synthesis of *N*-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester catalyzed by thermolysin variants with improved activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 46: 320-325, 2010 査読有
- ④ Kusano, M., Yasukawa, K., and Inouye, K. Insights into the catalytic roles of the polypeptide regions in the active site of thermolysin and generation of the thermolysin variants with high activity and stability. *J. Biochem.*, 145: 103-113,

2009 査読有

[学会発表] (計 60 件)

- ① 井上國世、橋田泰彦. Regulation of the activity and stability of thermolysin by zinc and other divalent cations (シンポジウム：亜鉛タンパク質をキーワードにした異分野交流). 2011 年度日本農芸化学会大会. 2011 年 3 月 28 日. 京都女子大学
- ② 兒島憲二、伊達明子、井上國世. サーモライシンの Leu202 への部位特異的変異導入による基質特異性の変化. 2011 年度日本農芸化学会大会. 2011 年 3 月 27 日. 京都女子大学
- ③ 樋爪彩子、兒島憲二、井上國世. サーモライシンの 115 位における芳香族性アミノ酸残基の必要性. 2011 年度日本農芸化学会大会. 2011 年 3 月 27 日. 京都女子大学
- ④ 村山浩一、井上國世. サーモライシン (TLN) によるペプチド基質の加水分解反応における生成物の放出順序の決定. 2011 年度日本農芸化学会大会. 2011 年 3 月 27 日. 京都女子大学
- ⑤ 吳旬、兒島憲二、井上國世. サーモライシンの活性に対する LiCl の添加効果. 2011 年度日本農芸化学会大会. 2011 年 3 月 27 日. 京都女子大学
- ⑥ 村山浩一、井上國世. 溶媒効果分光法による Thermolysin (TLN) のチロシン残基およびトリプトファン残基の存在状態の解析. 2010 年度日本農芸化学会関西支部大会. 2010 年 10 月 3 日. 近畿大学農学部
- ⑦ 樋爪彩子、兒島憲二、橋田泰彦、井上國世. サーモライシンの S₁ サブサイトに存在する Phe114 の役割. 第 57 回日本生化学近畿支部例会. 2010 年 5 月 22 日. 奈良先端科学技術大学院大学
- ⑧ 草野正雪、保川清、井上國世. 変異の組み合わせによるサーモライシンの活性と熱安定性の向上. 第 82 回日本生化学会. 2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド
- ⑨ 福井善弘、橋田泰彦、井上國世. サーモライシンの亜鉛配位性残基 Glu166 の改変がその触媒活性に及ぼす効果. 第 56 回日本生化学近畿支部例会. 2009 年 5 月 23 日. 大阪医科大学

[図書] (計 8 件)

- ① 井上國世、橋田泰彦、草野正雪、保川清: サーモライシンの応用と高機能化. 産業酵素の応用技術と最新動向 (井上國世、監修) p. 58-68、シーエムシー出版、東

京、2009

[その他]

ホームページ等
<http://www.enzchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 國世 (INOUE KUNIYO)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10223249

(2) 研究分担者

保川 清 (YASUKAWA KIYOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：30397559

(3) 連携研究者

該当なし