

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380065

研究課題名（和文）

超好熱菌由来サチライシンの成熟化機構の解明と利用法の開発

研究課題名（英文）

Elucidation of the maturation mechanism of subtilisins from hyperthermophiles and development of their potential use

研究代表者

金谷 茂則 (KANAYA SHIGENORI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30273585

研究成果の概要（和文）：超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来サチライシン、Tk-subtilisin と Tk-SP の成熟化機構を解析した。その結果、いずれもN末端プロペプチドの自己切断と分解により活性化（成熟化）すること、Tk-subtilisin の構造形成は Ca^{2+} -結合ループへの Ca^{2+} イオンの結合により誘導されること、Tk-SP は Ca^{2+} 非存在下でも成熟化するが、その高い安定性にはC末端 β ジェリーロールドメインが必要であることを明らかにした。また、Tk-subtilisin が異常型プリオンタンパク質の分解に有効であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The maturation mechanisms of subtilisins, Tk-subtilisin and Tk-SP, from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* were analyzed. The results indicate that both proteins are activated (matured) upon autoprocessing and degradation of N-terminal propeptides, folding of Tk-subtilisin is induced upon binding of the Ca^{2+} ions to the Ca^{2+} -binding loop, Tk-SP is matured in the absence of the Ca^{2+} ions, Tk-SP requires C-terminal β -jelly roll domain for hyperstability. It was also shown that Tk-subtilisin is useful for degradation of abnormal prion proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質工学、微生物酵素、構造生物学

1. 研究開始当初の背景

サチライシン (subtilisin) は、菌体外に分泌されるアルカリ性セリンプロテアーゼで、ペプチド結合の加水分解を触媒する。サチライシンは、幅広い基質特異性を示すことから、産業用酵素として洗剤、食品加工、皮革加工、下水処理、機能性ペプチド生産などに広く利

用されている。しかし、医療器具などに付着した異常型プリオン、アミロイドなどの感染性タンパク質、食品に混入した強毒性アレルゲン、排水を妨げる髪の毛や羽毛、などの分解に有効なサチライシンは当時開発されていなかった。これらのタンパク質を効率よく分解するためには、高温、強アルカリ、変性剤

存在下などの過酷な条件でも高い活性を示すサチライシンを用いる必要があるが、このような超安定なサチライシンはまだ単離されていなかったか、単離されていたとしても、その成熟化機構や耐熱化機構に関する研究はそれほど進んでいなかった。超好熱古細菌 *T. kodakaraensis* KOD1 のゲノムにはサチライシンをコードする遺伝子が2つある。これらのサチライシンはTk-subtilisin、Tk-SPと命名されている。いずれも分泌に必要と考えられているシグナル配列、プロペプチド、成熟体から成る。Tk-subtilisin に関しては、前駆体と成熟体の結晶構造が決定されており、プロペプチドの切断・分解により成熟化すること、極めて高い耐熱性を示すこと、Ca²⁺の結合により構造が形成されること、成熟体にはCa²⁺が7個結合すること、その構造はプロペプチドの切断前に形成され、プロペプチドの切断・分解によりほとんど変化しないこと、などが明らかにされていた。しかし、成熟化の最初のステップであるフォールディング機構についてはまだ明らかにされていなかった。また、異常型プリオンタンパク質やケラチンなどの難分解性タンパク質の分解への有効性についてもまだ検討されていなかった。一方、Tk-SP に関しては、結晶構造も諸特性も解析されておらず、その成熟化機構は明らかにされていなかった。さらに、KOD1 のゲノムにはセリンプロテアーゼを特異的に阻害する serpin (Tk-serpin) をコードする遺伝子が1つあるが、その解析はされていなかった。

2. 研究の目的

(1) Tk-subtilisin のプロペプチド機能やCa²⁺結合ループの役割を解析することにより、Tk-subtilisin のフォールディング機構を明らかにする。

(2) Tk-SP の成熟体の諸特性を明らかにする。また、結晶構造を決定することにより、その成熟化機構を明らかにする。

(3) Tk-serpin の諸特性を明らかにする。

(4) Tk-subtilisin の難分解性タンパク質分解除去剤としての新たな利用法を開発する。

3. 研究の方法

(1) Tk-subtilisin のフォールディング機構の解析

①プロペプチドのシャペロン機能の解析

プロペプチドおよびその変異体の存在、非存在下におけるTk-subtilisin のフォールディング速度を解析することにより、プロペプチドのシャペロン活性に必要な領域を同定し、そのシャペロン機能を明らかにする。

②Ca²⁺結合ループの役割の解析

Tk-subtilisin に結合する7個のCa²⁺イオン

のうち4個 (Ca₂~Ca₅) が結合するループ (Ca²⁺結合ループ) に着目し、4個のうちどれか1個が結合できなくなるような変異体を各種構築し、これらの変異体のフォールディング速度や安定性を解析することにより、Ca²⁺結合ループの役割を明らかにする。

(2) Tk-SP の成熟化機構の解析

①Tk-SP の諸特性の解析

Tk-SP のプロ体 (Pro-Tk-SP) をコードする遺伝子をPCRにより増幅し、pETベクターに導入することにより、発現ベクターを構築する。発現誘導後、大腸菌内に可溶性あるいは不溶性タンパク質として蓄積することを確認した後、精製する。ついで、成熟化を検討し、成熟体を同定する。さらに、成熟体の活性、安定性、基質特異性などの諸特性を明らかにする。

②Tk-SP の結晶構造解析

Pro-Tk-SP の活性中心変異体の結晶構造を決定する。また、プロペプチドやC末端ドメインを欠失した活性中心変異体を各種構築し、その諸特性を解析することにより、これらの役割を明らかにする。このようにして、Tk-SP の成熟化機構を明らかにする。

(3) Tk-Serpin の諸特性の解析

Tk-Serpin をコードする遺伝子をPCRにより増幅し、pETベクターに導入することにより、発現ベクターを構築する。発現誘導後、大腸菌内に可溶性あるいは不溶性タンパク質として蓄積することを確認した後、精製する。ついで、Tk-Serpin がTk-subtilisin やTk-SP の活性を阻害するか解析する。

(4) Tk-subtilisin の新たな利用法の開発

Tk-subtilisin はいずれも耐熱性が高いだけでなく、10% SDS、8 M 尿素、5% Triton X-100 等で処理してもほとんど活性を失わず、広いpH範囲で安定である。2% SDS 存在下煮沸しても活性を示す。これらのサチライシンの新たな利用法を開発するために、通常のプロテアーゼでは分解されにくい異常型プリオンタンパク質の分解を検討する。

4. 研究成果

(1) Tk-subtilisin のフォールディング機構の解明

①プロペプチドによるTk-subtilisin のフォールディング促進機構を明らかにする目的で、プロペプチド変異体を各種構築し、そのフォールディング促進能を解析した。その結果、Tk-subtilisin のコア領域 ($\alpha\beta\alpha$ サブ構造) と相互作用するループ領域が、プロペプチドによるフォールディングの開始に必要なであることを明らかにした (図1)。この結果は、Tk-subtilisin がフォールディングのための高いエネルギー障壁を2つの異なる方法 (Ca²⁺の結合とプロペプチドとの相互作用) で下げていることを示唆しており興味

深い。

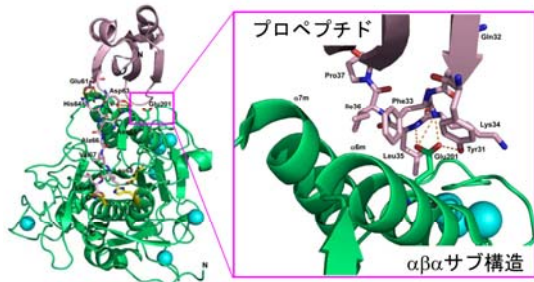


図1 プロペプチドとTk-subtilisinコア領域の相互作用

② Ca^{2+} 結合ループを削除するとTk-subtilisin は Ca^{2+} 存在下でもフォールディングしなくなることを明らかにした。また、 Ca^{2+} 結合ループに結合する4つの Ca^{2+} イオンのうち Ca_2 が結合しなくても Ca_3 が結合しなくてもTk-subtilisin のフォールディング速度は大きく低下することを明らかにした。いずれの場合もTk-subtilisin の安定性に変化はなかった。以上の結果、 Ca^{2+} 結合ループに Ca^{2+} イオンが結合すると、Tk-subtilisin のコア領域 ($\alpha\beta\alpha$ サブ構造) の構造形成が誘導されることを明らかにした (図2)。

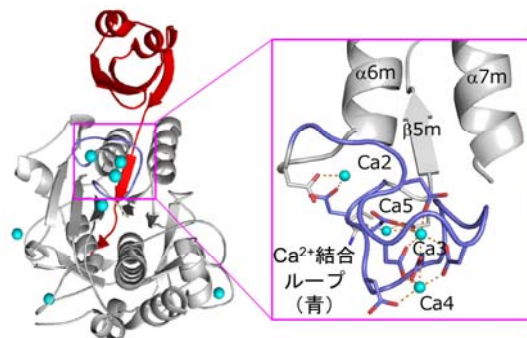


図2 Tk-subtilisinのカルシウム結合ループ

(2) Tk-SP の成熟化機構の解析

①Tk-SP のプロ体 (Pro-Tk-SP) を大腸菌で発現させると、Pro-Tk-SP は菌体内に可溶性タンパク質として蓄積し、一部は成熟化することを明らかにした。精製中も成熟化は進行するが、最終的に熱処理によりN末端プロペプチドとC末端ドメインの両方が切断されたTk-SP*を精製することに成功した。Tk-SP*は100℃で最も高い活性を示し (図3)、Tk-subtilisin 同様、極めて熱、変性剤、界面活性剤に対して安定であることを明らかにした。

②C末端ドメインを欠失したPro-Tk-SP変異体 (ProN-Tk-SP) の結晶構造を決定することに成功した。その結果、ProN-Tk-SPはN末端プロペプチド、サチライシンドメイン、C末端βジェリーロールドメインから成ること、その構造はβジェリーロールドメインを除くとTk-subtilisin や細菌由来サチライシン

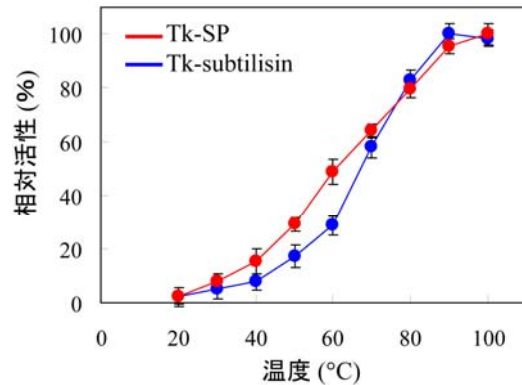


図3 Tk-SPの活性の温度依存性

のプロ体の構造と良く似ていることを明らかにした (図4)。また、βジェリーロールドメインはTk-SPの耐熱化に大きく寄与することを明らかにした。この結果は、βジェリーロールドメインの付加によりTk-SPが高温環境に適応したことを示唆しており興味深い。

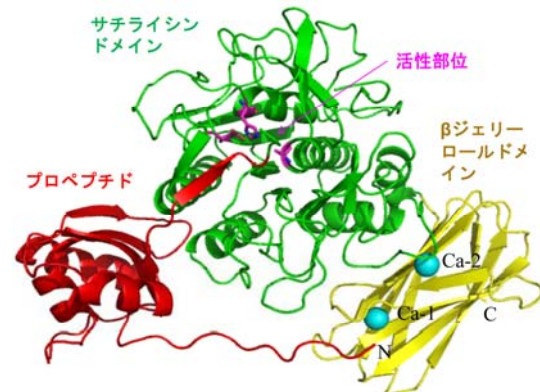


図4 ProN-Tk-SPの結晶構造

③C末端ドメインを欠失したTK-SP変異体 (Tk-SPΔC) とC末端ドメイン (Cドメイン) をそれぞれ発現、精製し、諸特性を解析することにより、C末端ドメインは Ca^{2+} イオン存在下でTk-SPの安定化に寄与することを明らかにした。

(3) Tk-Serpin の諸特性の解析
Tk-Serpin の大量発現、精製を行い、Tk-subtilisin および Tk-SP の阻害活性を解析した。その結果、Tk-Serpin はこれらのプロテアーゼの活性を阻害することを明らかにした。また、この阻害活性は高温になるほど強くなることを明らかにした。高温になるほど強く阻害する Serpin の報告はこれまでないので、本結果は大変興味深い。

(4) Tk-subtilisin の新たな利用法の開発
Tk-サチライシンが、プリオン病に感染したマウスの脳ホモジネート中の異常プリオンを分解することを明らかにした (図5)。また、分解条件を検討することにより、Tk-サ

チライシンは、3%SDS 存在下、100°Cの条件であれば5分程度の短時間で異常プリオンを分解できることを確認した。さらに、Tk-サチライシンは既存のプリオン分解酵素である Prionzyme より非常に高いプリオン分解活性を有することを明らかにした。

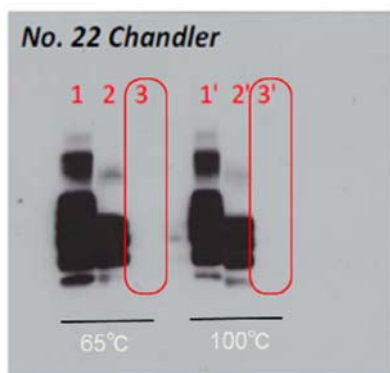


図5. プリオン分解試験
1. 全プリオン蛋白質
2. 異常型プリオン蛋白質
3. Tk-subtilisin 分解物

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6件)

① Sinsereekul, N., Foophow, T., Yamanouchi, M., Koga, Y., Takano, K. and Kanaya, S. (2011) An alternative mature form of subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis* identified in the presence of Ca²⁺. FEBS J. 278, 1901-1911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443525> 査読有

② Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2011) Inhibition of chymotrypsin- and subtilisin-like serine proteases with Tk-serpin from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. Biochim. Biophys. Acta, 1814, 299-307.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112419> 査読有

③ Foophow, T., Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Crystal structure of a subtilisin homologue, Tk-SP, from *Thermococcus kodakaraensis*: requirement of a C-terminal β -jelly roll domain for hyperstability. J. Mol. Biol. 400, 865-877. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595040> 査読有

④ Tanaka, S., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2009) Identification of the interactions

critical for propeptide-catalyzed folding of Tk-subtilisin. J. Mol. Biol. 394, 306-319.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766655> 査読有

⑤ Takeuchi, Y., Tanaka, S., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2009) Requirement of a unique Ca²⁺-binding loop for folding of Tk-subtilisin from a hyperthermophilic archaeon. Biochemistry 48, 10637-10643.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19813760> 査読有

[学会発表] (計21件)

① 金谷茂則 「Unique maturation mechanism of Tk-subtilisin from a hyperthermophilic archaeon」 2011年度日本農芸化学会(シンポジウム)、2012年3/22-25、京都女子大学(京都)

② Shigenori Kanaya 「Unique folding and stabilization mechanisms of subtilisin-like serine proteases from a hyperthermophilic archaeon」、International Conference on Enzyme Science and Technology (ICEST2011)、2011年10/31-11/4、Kusadasi (Turkey)

③ Yuichi Koga, Shun-ichi Tanaka, Akikazu Sakudo, Kazuyoshi Ikuta, Kazufumi Takano, and Shigenori Kanaya. 「Degradation of abnormal prion protein by a new protease from a hyperthermophile」、PRION 2010、2010年9/8-11、Salzburg (Austria)

④ 古賀雄一、田中俊一、作道章一、高野和文、金谷茂則 「超好熱菌由来プロテアーゼによる異常プリオン蛋白質分解」、日本生物工学会、2010年10/27-29、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎)

⑤ 上田泰徳、田中俊一、古賀雄一、高野和文、金谷茂則 「高アルカリ性、高温でのTk-subtilisinの成熟化促進機構の解析」日本生化学会、2009年10/20-24、神戸国際会議場(神戸市)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

① 名称: プロテアーゼの製造方法、並びにプロテアーゼ溶液およびプロテアーゼのプロ体溶液

発明者: 金谷茂則、田中俊一、竹内勇希、高野和文、古賀雄一

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2009/64629

出願年月日: 平成21年8月21日

国内外の別：国外

②

名称：新規なプロテアーゼおよびその利用
発明者：金谷茂則、チタ フーパオ、高野和
文、古賀雄一

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2009/063547

出願年月日：平成21年7月30日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 茂則 (KANAYA SHIGENORI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30273585

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

古賀 雄一 (KOGA YUICHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30379119