

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25400426

研究課題名(和文)プロテアーゼの耐熱性に影響を与える自己分解反応の速度論的解析

研究課題名(英文)Kinetic analysis of the self-digestion effect on the thermal stability of proteases

研究代表者

城所 俊一(Kidokoro, Shun-ichi)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：80195320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：立体構造変化に加えて、自己分解反応を考慮した速度論的モデルを構築し、プロテアーゼの種々条件下の熱測定データを共通のパラメーターで解析するグローバル解法を開発した。金属プロテアーゼであるthermolysin(TLN)とセリンプロテアーゼであるsavinase(SAV)の速度論的安定性が本手法で評価できることを示した。さらに、TLNの安定性への阻害剤の効果と、SAVの安定性へのCaイオンの効果とを評価し、それらの機構を明らかにした。また、本手法の汎用性を検証するため、マルチユニットからなる非プロテアーゼ蛋白質にも適用し、カルモジュリンやアミロマルターゼ等の速度論的安定性の評価に成功した。

研究成果の概要(英文)：Although the kinetic stability of protease was traditionally analyzed by considering only the conformational change, a new kinetic model has been constructed with considering the self-digestion. Based on this method, the global analysis for the calorimetric data of proteases under various experimental conditions has been developed where the kinetic parameters were determined precisely. Using this method, kinetic stability of a metalloprotease, thermolysin (TLN) and a serine protease, savinase (SAV) has been analyzed successfully, and the effect of the inhibitor on the stability of TLN, and the effect of Ca ion on the stability of SAV, have been evaluated. Furthermore, the method has been successfully applied to evaluate the kinetic stability of non-protease proteins consisting of multi-unit, such as calmodulin and amyloamylase, indicating the versatility of the method.

研究分野：蛋白質物性

キーワード：蛋白質分解酵素 速度論的安定性 自己失活 熱測定 速度定数 1次反応 2次反応 活性化エンタルピー

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の安定性については、変性が可逆であれば平衡論が適用可能であり、温度走査熱測定によれば、単量体の熱転移など、解析モデルに依存しない安定性評価が可能な場合や、解析に用いたモデルの検証が可能な場合が多い。しかし、蛋白質の変性は不可逆な場合が多く、この場合には、安定性を評価する場合には、平衡論ではなく、反応速度定数を扱う速度論的解析が必要となる。そして、従来は、単分子反応である立体構造変化(1次反応)が律速とするモデルで解析される場合がほとんどであった。例えば、等温条件のもとで天然(native)状態(以下 N 状態と呼ぶ)のモル分率の時間経過は指数関数とみなして時定数あるいは寿命が評価されることが広く行われている。蛋白質分解酵素 thermolysin の熱変性を示差走査熱測定(DSC)で評価した場合も、この1次反応モデルで測定データが良く説明できることが報告されていた。

一方で、蛋白質分解酵素の長期保存時の変性の抑制には、阻害剤を添加して自己消化反応を遅くすることが有効であることが知られており、酵素・基質結合が律速となる2次反応が律速となる可能性があるが、これらの反応を分離して評価するような試みは報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 従来の1次反応が律速となる過程と平行して、2次反応が律速となる過程を考慮した解析モデルを定式化し、このモデルにより、蛋白質分解酵素の熱変性解析することで、それぞれの速度定数とその温度依存性とを決定するグローバル解析法を確立する。

(2) 各種の蛋白質分解酵素の熱変性過程に、2次反応特有の酵素濃度依存性の有無を実験的に調べるとともに、それらの速度論的パラメータを決定する。また、蛋白質分解酵素へのリガンド共存による安定化の効果や機構を解明する。

(3) 蛋白質分解酵素以外でも、複雑な不可逆的変性を示す蛋白質に対して(1)のグローバル解析法を適用し、モデルの検証を行うとともに速度論的パラメータの決定を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規解析方法

本解析法の基本モデルは、1次反応の反応速度定数を  $k_1$ 、2次反応のそれを  $k_2$  とすると、天然状態が、1次反応を律速とする過程と2次反応を律速とする過程の2つの経路で変性すると仮定すると、そのモル分率  $f$  の時間経過は、

$$\frac{df}{dt} = -k_1(T)f - ck_2(T)f$$

という微分方程式に従うことになる。ここで  $c$  は酵素の濃度である。示差走査熱測定の際の昇温速度を  $v = \frac{dT}{dt}$  とすると前式は

$$\frac{df}{dT} = -\frac{k_1(T)}{v}f - \frac{ck_2(T)}{v}f$$

$$\frac{df}{dT} = -\frac{k_1(T)}{v}f - \frac{ck_2(T)}{v}f$$

と書ける。ここで、速度定数の温度依存性は、絶対反応速度論により

$$k(T) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^+(T)}{RT}\right)$$

で記述する。ここで  $k_B$ ,  $h$ ,  $R$  は、それぞれボルツマン定数、プランク定数、気体定数である。また、活性化自由エネルギー  $\Delta G^+$  の温度依存性は、活性化エンタルピーの温度依存性を無視すると、

$$\Delta G^+(T) = \Delta H^+ \left(1 - \frac{T}{T_0}\right)$$

で記述できる。この微分方程式は一般には解析的に解けないが、ルンゲクッタ法を用いて数値積分することで、温度  $T$  の関数として任意の制度で解を求めることができる。

DSC で観測されるみかけの部分モル熱容量は、熱変性に伴う部分モルエンタルピー変化  $H$  とその温度依存性  $C_p$  とを用いて

$$C_p^{\text{app}} = C_{p,N} + \Delta C_p(1-f) + \Delta H \frac{df}{dT}$$

と記述できる。ここで、 $C_{p,N}$  は天然状態の部分モル定圧熱容量で、本研究では温度の1次関数で記述した。

このモデルに基づいて、複数の実験条件(蛋白質濃度、昇温速度)のデータを、共通の熱力学的パラメータを用いて fitting 解析可能な、非線形最小2乗法プログラムを作成した。

#### (2) DSC 測定

DSC 測定は各種実験条件で調製・透析した蛋白質溶液を、十分に脱気したのちに、マルバーン社 VP-DSC に充填して実施した。昇温速度は、主として 1 K/min を用いた。蛋白質溶液の濃度は紫外可視分光光度計 UB-25 (日本分光) で測定した。ただし、2次反応速度定数を正確に決めるには活性を持つ酵素濃度の定量は重要であり、吸光度の測定では変性した酵素と区別がつかないため、DSC 測定で観測された変性に伴う部分モルエンタルピー変化  $H$  を使用して酵素濃度の補正を行うことも可能とした。

### 4. 研究成果

(1) 自己分解反応を考慮した DSC の速度論的解析方法の開発

活性を持つ天然状態 (N 状態) から活性を失った変性状態 (D 状態) への、構造転移による 1 次反応と、自己分解反応による 2 次反応とが同時に起きる速度論的モデルに基づいて DSC データを非線形最小 2 乗法で解析する方法を完成させた。この際に、速度定数とその活性化エンタルピー、熱変性エンタルピーとその温度依存性を fitting パラメータとした。さらに、昇温速度やプロテアーゼ濃度を変えた複数の実験データを共通のパラメータを使って解析する、いわゆるグローバル解析も可能とした。なお、2 次反応速度の定量的な決定には、活性を保持している蛋白質分子濃度の正確な評価が要求されるため、変性エンタルピーを用いた濃度補正を行えるようにした。これにより、汎用性の高い解析方法が完成した。

### (2) thermolysin の熱変性の速度論的解析

thermolysin の熱変性は 1 次反応だけでは説明できず、自己分解反応の寄与が無視できないことを明確にし、前項目で開発した解析法を用いて、様々な昇温速度と酵素濃度の測定を 1 組の共通のパラメータでグローバル解析することで thermolysin の 1 次反応と 2 次反応の反応速度定数とその温度依存性を決定することに成功した。

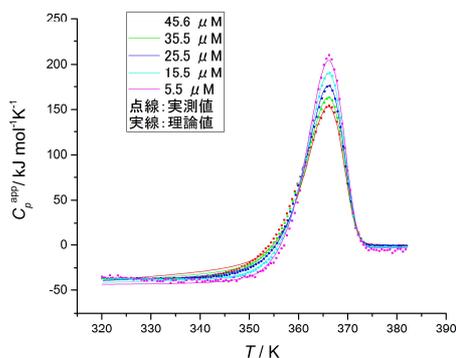


図 1 各種濃度の thermolysin の熱転移の DSC データのグローバル解析による fitting (pH 6.5, 50 mM PIPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 昇温速度 1 K/min)

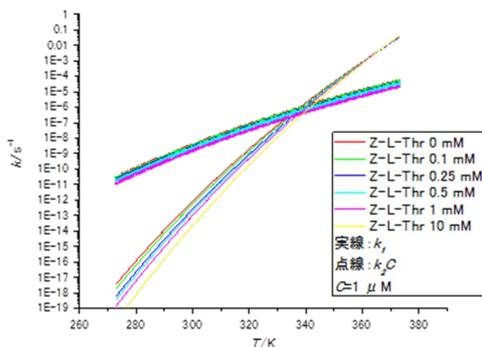


図 2 阻害剤 Z-L-Thr の様々な濃度共存下の thermolysin 変性の 1 次反応・2 次反応速度定数とその温度依存性

様々な濃度の阻害剤 Z-L-Thr 存在下では、2 次反応速度が拮抗阻害を受けて減少することが明らかになった。これと同時に 1 次反応速度は酵素濃度とともに減少し、阻害剤の結合によって、立体構造変化も起きにくくなっていることが明らかになった。

### (3) savinase の熱変性の速度論的解析

同様の手法で、洗剤に使用される subtilisin 相同蛋白質である savinase の速度論的安定性が、前項のモデルで解析可能なことを示した。また、共存する Ca イオン濃度による速度定数への影響を解析したところ、1 次反応・2 次反応ともに Ca イオン濃度の減少に伴って反応速度定数が増加することがわかった。Ca イオン濃度依存性からは、それぞれの反応の遷移状態で Ca イオンに対する親和性が減少して確率的に Ca イオンが外れていることが推測された。

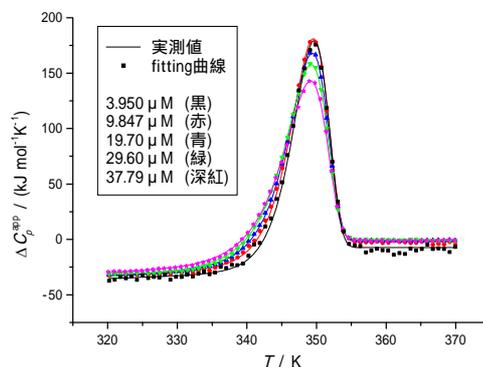


図 3 各種濃度の savinase の DSC データとグローバル解析による fitting (pH 7.0, 50 mM PIPES, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 走査速度 1 K/min)

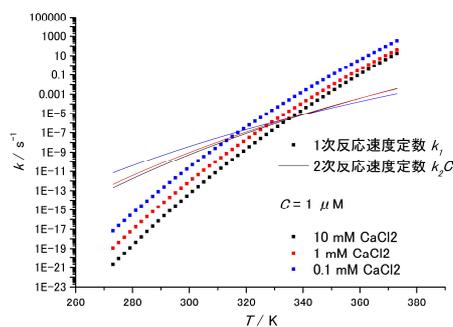


図 4 各種 Ca イオン濃度共存下の savinase 変性の 1 次反応・2 次反応速度定数とその温度依存性

### (4) マルチユニット蛋白質の速度論的解析

複数の協同的な構造ユニットから構成されている蛋白質の速度論的安定性を評価するには、多くの速度定数を一度に決定する必要があり、昇温速度の異なる多数のデータを用いてグローバル解析を行うのが有効である。(1)で開発したグローバル解析法を応用して、カルモジュリンやアミロマルターゼの

速度論的安定性を評価することに成功した。

#### 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 11 件)

Sugawara K, Nakagawa M, Yonezawa M, Nakamura S, Kidokoro S, Wakui H, Nunomura W, Similarity and differences in the physicochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes from different tissues of Japanese sandfish *Arctoscopus japonicus*, *Fish. Sci.*, 査読有, 82, 2016, 519-527

DOI:10.1007/s12562-016-0972-1

Nimpiboon P., Kaulpiboon J., Krusong K., Nakamura S., Kidokoro S., Pongsawasdi P., Mutagenesis for improvement of activity and thermostability of amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 査読有, 86, 2016, 820-828

DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.022.  
Kidokoro S, Nakamura S, IATC, DSC and PPC analysis of reversible and multi-state structural transition of cytochrome *c*, *Method Enzymol.*, 査読有, 567, 2016, 391-412

DOI:10.1016/bs.mie.2015.08.002.

Shida Y, Yamaguchi K, Nitta M, Nakamura A, Takahashi M, Kidokoro S, Mori K, Tashiro K, Kuhara S, Matsuzawa T, Yaoi K, Sakamoto Y, Tanaka N, Morikawa Y, Ogasawara W, The impact of a single-nucleotide mutation of *bgI2* on cellulose induction in a *Trichoderma reesei* mutant, *Biotechnol Biofuel*, 査読有, 8:230,2015, 1-18

DOI:10.1186/s13068-015-0420-y

Kaewpathomsri P, Takahashi Y, Nakamura S, Kaulpiboon J, Kidokoro S, Murakami S, Krusong K, Pongsawasdi P, Characterization of amylomaltase from *Thermus filiformis* and mutation to increase in alkaline and thermo-stability, *Process. Biochem.*, 査読有, 50, 2015, 1814-1824

DOI:10.1016/j.procbio.2015.08.006

Islam M, Nakamura S, Noguchi K, Yohda M, Kidokoro S, Kuroda Y, Analysis and control of protein crystallization using short peptide tags that change solubility without structure, thermal stability and function, *Crystal Growth Design*, 査読有, 15, 2015, 2703-2711

DOI:10.1021/acs.cgd.5b00010

Yamaguchi A, Niimura N, Nakamura S, Kidokoro S, Chatake T, Yokoyama T, Tanaka I, ATP binding and hydration state analyses of DAPK: Step toward neutron protein crystallography studies, *JPS Conference Proceedings*, 査読有, 8, 2015, 03308-1-6

DOI:10.7566/JPSCP.8.033008

Nunomura W, Isozumi N, Nakamura S, Jinbo Y, Sasakura D, Ohki S, Kidokoro S, Wakui H, Takakuwa Y, Unique structural changes in calcium-bound calmodulin upon interaction with protein 4.1R FERM domain: novel insights into the calcium-dependent regulation of 4.1R FERM domain binding to membrane proteins by calmodulin, *Cell Biochem. Biophys.*, 査読有, 69, 2014, 7-19

DOI:10.1007/s12013-013-9758-6.

城所俊二, タンパク質の熱力学的安定性と分子機能の精密熱量測定, 熱測定, 査読有, 41, 2014, 2-9

Wakai S, Kidokoro S, Masaki K, Nakasone K, Sambongi Y, Constant Enthalpy Change Value during Pyrophosphate Hydrolysis within the Physiological Limits of NaCl., *J. Biol. Chem.*, 査読有, 288, 2013, 29247-29251

DOI:10.1074/jbc.M113.502963

Nakamura S, Koga S, Shibuya N, Seo K, Kidokoro S, A New Multi-Binding Model for Isothermal Titration Calorimetry Analysis of the Interaction between Adenosine 5'-Triphosphate and Magnesium Ion, *Thermochim. Acta*, 査読有, 563, 2013, 82-89

DOI:10.1016/j.tca.2013.04.008

##### [学会発表](計 11 件)

中村成芳、城所俊二、圧力摂動熱量測定によるシトクロム *c* のモルテングロビュール状態の安定性・体積変化の評価、日本蛋白質科学会、2015年6月26日、あわぎんホール(徳島県・徳島市)

福嶋大智、瀬尾和聖、城所俊二、加藤悦子、ウイルス由来スーパーファミリー1ヘリカーゼのNTP加水分解の評価、日本蛋白質科学会、2015年6月25日、あわぎんホール(徳島県・徳島市)

中村成芳、中川瑞希、米澤美香、涌井秀樹、布村渉、城所俊二、マルチドメイン蛋白質の不可逆熱転移の速度論的解析、熱測定討論会、2015年10月8日、東京電機大学・鳩山キャンパス(埼玉県・比企郡)

中澤晶子、森谷圭介、中村成芳、志田洋介、小笠原渉、城所俊二、2本のジスルフィド結合を導入した低温ショック蛋白質変異体の結合性と安定性、熱測定討

論会、2015年10月9日、東京電機大学・  
鳩山キャンパス（埼玉県・比企郡）  
土井淳、中村成芳、志田洋介、小笠原  
涉、城所俊二、低温ショック蛋白質の  
cavity内アミノ酸置換が安定性や1本  
鎖DNAとの結合性に与える影響、熱測定  
討論会、2015年10月9日、東京電機大  
学・鳩山キャンパス（埼玉県・比企郡）  
福嶋大智、中村成芳、城所俊二、等温滴  
定型熱量計によるペプチド加水分解酵  
素反応測定における緩衝剤の効果、熱測  
定討論会、2015年10月9日、東京電機  
大学・鳩山キャンパス（埼玉県・比企郡）  
越智敬太、城所俊二、低カルシウム濃度  
条件のsavinaseの速度論的安定性解析、  
熱測定討論会、2014年9月28日、大阪  
大学（大阪府・大阪市）  
中村成芳、Mohammad M Islam、和智友香、  
清水凌、黒田裕、城所俊二、蛋白質の熱  
転移における可逆的なオリゴマー形成  
過程の熱力学的解析、熱測定討論会、  
2014年9月28日、大阪大学（大阪府・  
大阪市）  
森谷圭介、志田洋介、小笠原涉、城所俊  
二、高い安定性と結合性とをめざした低  
温ショック蛋白質ジスルフィド結合導  
入変異体の熱量測定、熱測定討論会、  
2014年9月28日、大阪大学（大阪府・  
大阪市）  
城所俊二、永田彰宏、越智敬太、蛋白質  
分解酵素の速度論的安定性の熱測定に  
よる評価、日本生物物理学会年会、2013  
年10月28日、京都国際会館（京都府・  
京都市）  
越智敬太、永田彰宏、城所俊二、Savinase  
の熱変性の自己消化を考慮した速度論  
的解析、熱測定討論会、2013年10月31  
日、千葉工業大学（千葉県・幕張市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城所 俊一 (KIDOKORO, Shun-ichi)  
長岡技術科学大学・工学研究科・教授  
研究者番号：80195320