

## プロテオーム解析汎用性グルタミン酸特異的細菌性プロテアーゼ発現法の改良

根本孝幸, 根本優子

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

口腔分子生化学分野

〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1

TEL: 095-849-7640, FAX: 095-849-7642

e-mail: tnemoto@nagasaki-u.ac.jp

### キーワード

グルタミン酸特異的プロテアーゼ, V8 プロテアーゼ, リコンビナントタンパク質,  
プロ配列, 自己消化

### 略語

GluV8, 黄色ブドウ球菌 V8 株由来グルタミン酸特異的プロテアーゼ

GluSE, 表皮ブドウ球菌由来 GluV8 類縁グルタミン酸特異的プロテアーゼ

GluSW *Staphylococcus warneri* 由来 GluV8 類縁グルタミン酸特異的プロテアーゼ

SDS, ナトリウムドデシル硫酸

PAGE, ポリアクリルアミド電気泳動

CBB, クマシーブリリアントブルー

## 要旨

感染性細菌である黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) V8株が産生するグルタミン酸(Glu)特異的プロテアーゼ (V8プロテアーゼ/GluV8) は本菌の病原因子と考えられている。GluV8は、そのユニークな基質特異性と界面活性剤存在条件下でも活性が保持されるという性質から、タンパク質断片化の主要な酵素として用いられている。われわれはすでに GluV8を大腸菌発現系で生産する新規の発現法を開発して特許申請している(特願 2007-077746)。本研究ではさらに収量をあげる改良法を確立したので報告する。以前の方法は GluV8類縁酵素である表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*)由来 Glu 特異的プロテアーゼ (GluSE) のプロ配列が自己消化されにくいという事実を利用して、このプロ配列と GluV8成熟部分の配列とをキメラ型分子として発現するというものであった。しかしこの方法ではまだ GluSEの発現量よりも低かった。そこで本研究ではまずどの程度自己消化によって収量が低下しているのかを定量化するために、プロテアーゼ活性に必須の Ser237を Alaに置換して不活性型分子を作成した。この不活性型分子の収量は数倍に増加したため、キメラ型 GluV8は自己消化が完全にはブロックされていないと判断された。そこでさらに GluV8本来のプロペプチドを用いる新たな方法を試みた。その結果 68アミノ酸からなる GluV8プレプロ配列内部の自己消化の可能性のあるアミノ酸をすべて変異させた GluV8 (GluV8mut5と命名)を大腸菌発現すると、従来のキメラ型分子よりも発現効率が上昇し、その収量は不活性型 GluV8と同程度までに高まることを見出した。さらにC末領域の3アミノ酸の12回繰り返し構造の欠失により、発現量がさらに上昇した。この理想的な GluV8mut5プレプロ配列を利用して同属の *S. warneri* Glu 特異的プロテアーゼをキメラ型分子として大量発現することも可能であった。本研究では、自己消化完全抵抗性 GluV8プロ配列を利用することにより、特願 2007-077746の方法よりさらに収量のよい GluV8および近縁プロテアーゼの発現が可能となった。

## 緒言

黄色ブドウ球菌の産生するグルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluV8) は界面活性剤であるナトリウムドデシル硫酸(SDS)や高温条件にさらされても、それらの条件を取り去れば活性を回復する (Stennicke and Breddam, 1998). また酸性アミノ酸, 特にグルタミン酸のカルボキシル側のペプチド結合のみを切断するという厳密な基質特異性のためにタンパク質のアミノ酸配列決定やプロテオーム解析に汎用されている (Breddam and Meldel, 1992). 現在, 産生細菌である *Staphylococcus aureus* V8 株培養上清から精製された標品が市販されているが, 大腸菌での大量発現が可能となれば大幅なコストダウンが可能になる. 同時に大腸菌ではすでに確立されている遺伝子工学的手法によって, 高活性や高い安定性を有する改変酵素の生産も可能である. さらに病原性細菌である *S. aureus* 由来の精製標品には, 種々の病原因子の混入の可能性も否定できないことから, リコンビナント標品の発現・精製が可能になれば本酵素の利用範囲が実験科学だけでなく, 食料業界や洗濯業界まで広がることも期待される.

われわれの特許出願 (根本と根本, 2007) 以前は, GluV8 の大腸菌発現系は, 藪田ら(1995)の特許のみであった. 操作の煩雑さや, 変性分子再生性の効率の問題のために, その方法は今日一般には利用されていない. そのため, われわれの GluV8 の大腸菌発現法の確立は大きな進歩であった. 類縁種の表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermis* の産生する酵素 (GluSE) では培養液 1 リットル当たり 12 mg の精製品が得られた. GluV8 でも同程度と報告したが, 繰り返し試みたところ, GluSE のそれよりはやや低く, 平均 3 mg であった. この収量のよい GluSE でもプロテオーム解析に利用可能ではあるが, GluSE よりも GluV8 の方が比活性が高いこと (根本と根本, 2007), GluV8 に関してはすでに多くのデータが蓄積していることを考え合わせれば, やはり GluV8 の方が有用性が高いと考えられる.

そこで今回は自己消化を抑制することにより, GluSE と同程度の収量で GluV8 を得ることを目的とした. 検討の結果, GluV8 のプロ領域の自己消化を完全に抑制する配列をアミノ酸変異によって導入することによって, より効率のよい GluV8 の発現と精製が可能となった.

## 材料と方法

### 材料

発現ベクター pQE60 および pREP4 と Hot Star PCR キットはキアゲン (Chatsworth, CA, USA), タロンアフィニティーゲルはクロンテック (Palo Alto, CA, USA), サーモライシンは大和化成 (滋賀), KOD Plus DNA ポリメラーゼは東洋紡 (東京), DNA 修飾酵素は日本ジーン (東京), グルタミン酸特異的蛍光ペプチド性基質 (Z-Leu-Leu-Glu-MCA) とロイペプチンはペプチド研究所 (大阪), DEAE-Sepharcel と低分子量 SDS 電気泳動分子量マーカーはアマシャムバイオサイエンス (Piscataway, NJ, USA), アゾカゼインはシグマより購入した. オリゴプライマーはジーンネット (福岡) より購入した. その他の一般試薬は特級を用いた.

### 組換えタンパク質発現ベクターの作成

すべて pQE60 (キアゲン社) を発現ベクターとして用いた。すでに GluSE (野生型), GluV8 (野生型), GluSE-V8 (GluSE のプレプロペプチドと GluV8 成熟配列のキメラ分子) のコンストラクトの作成については報告した(根本と根本, 2007)。これらのプラスミドを基にして, *in vitro* 点突然変異導入法によって, アミノ酸の変異を導入した。GluV8 (336 アミノ酸) に関しては C 末に 3 アミノ酸 (Pro-Asp-Asn または Pro-Asn-Asn) の 12 回繰り返し構造を有するが, これを含む 52 アミノ酸の欠失を導入した (Table 1)。その結果, GluV8 のアミノ酸は 284 アミノ酸からなり, 成熟配列部分 (アミノ酸 69-284) は GluSE (アミノ酸 67-282) と同一長となった。In vitro 遺伝子変異により GluV8 のプロペプチド (アミノ酸 1-68) 内の 2 か所, 4 か所, 5 か所にアミノ酸置換を導入し, それぞれ GluV8mut2, mut4, mut5 と命名した。導入するアミノ酸は, GluV8 と GluSE のプロ配列をアラインメントの結果を用いて GluSE のアミノ酸と一致させた (Table 1 と Fig. 1)。Staphylococcus warneri グルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluSW と命名) の遺伝子の増幅に関しては Yokoi ら (2001) の報告を元に, BamHI 部位 (下線部) を挿入したプライマーセット (5' プライマー, 5'-TTTGGATCCAAAGTTAAGTTTTTTACAGCA ; 3' プライマー, 5'-GGCGGATCCCGCTGCGTCTGGATTATCGTA) により, Lys<sub>2</sub>-Ala<sub>316</sub> をコードする DNA 断片を増幅し pQE60 の BamHI 部位に挿入した。GluV8mut5 プレプロ配列と GluSW 成熟配列とのキメラ分子は, PCR 法によって作成した。

#### リコンビナントタンパク質の発現と精製

従来の報告(Matsumoto ら, 2002)に従い, 0.2 mM β-イソプロピルガラクトピラノシド存在下, 30°C で 4 時間, リコンビナントタンパク質を発現誘導後, 菌体を回収した。0.5 mg/ml リゾチームと 10 μg/ml ロイペプチンを含むライゼート溶液 (20 mM トリス塩酸, pH 8, 0.1 M 塩化ナトリウム, 10 mM イミダゾール) 中で凍結融解法により菌を溶解した後, 遠心して上清を回収しバクテリアライゼートとした。リコンビナントタンパク質は, 溶出液 (0.1 M イミダゾール, pH 8.0, 10%グリセロール) を用いたタロンアフィニティーゲルクロマトグラフィーにより精製した。精製標品は使用時まで-80°Cに保存した。

#### サーモライシン処理とプロテアーゼ活性の測定

精製リコンビナントタンパク質に 10 mM ホウ酸(pH 8), 2 mM CaSO<sub>4</sub>, 0.005% TritonX100 中で, 0.1 または 0.3 μg のサーモライシンを加え, 36°C, 4 時間加温した。この条件ではリコンビナントタンパク質/サーモライシンのモル比はそれぞれ 100/1, 33/1 となる。その後, 一定モル (7.8 pmol, GluSE では 0.25 μg) をプロテアーゼ活性測定溶液 0.2 ml [50 mM トリス塩酸 (pH 8), 5 mM EDTA, 20 μM Z-Leu-Leu-Glu-MCA]に添加し 25°C で保温した。サーモライシンの不活化剤として 5 mM EDTA を加えた。2 時間後, 励起光 380 nm として測定光 460 nm の蛍光を蛍光スペクトル光度計 F-4000 (日立) を用いて測定した。

#### SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は 11% のポリアクリルアミドゲルを用いて実施した。試料は 1% SDS を含むサンプル緩衝液中で 94°C, 10 分間熱変性させた。電気泳動後, クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色した。

### **N末端アミノ酸配列**

リコンビナントタンパク質とそのサーモライシン切断分子を SDS-PAGE で分離後、PVDF膜(バイオラッド)に転写した. 膜上のタンパク質バンドを CBB で染色し N 末端配列を Precise 49X cLC タンパク質配列決定装置 (ABI) を用いて決定した (Nemoto ら, 1997).

### **タンパク質の定量**

ウシ血清アルブミンを標準として用い, ビシンコニック酸法によって定量した (ピアス, Rockford, IL, USA).

## 結果

### 3種のグルタミン酸特異的プロテアーゼおよびそれらの誘導体の発現

Yokoi ら (2001) は *S. warneri* 菌 M株のグルタミン酸特異的プロテアーゼ GluSW の精製と遺伝子クローニングを報告している。GluSW は典型的な 3 アミノ酸 (Pro-Asp/Asn-Asn) の繰り返し配列ではないが、11 残基の Asp と 16 残基の Asn を含む 34 アミノ酸からなる C 末配列を有する。C 末繰り返し配列は GluSE には存在しない。GluV8 の C 末繰り返し構造や GluSW の Asp/Asn リッチ配列を除き、GluSE C 末端の Gln<sub>282</sub> に相当する GluV8 の Ala<sub>284</sub>, GluSW の Ser<sub>282</sub> までのアミノ酸配列を比較した (Fig. 1)。成熟領域では GluV8 と GluSW が 80.1% とともに相同性が高く、ついで、GluSE と GluSW が 61.1%, GluV8 と GluSE の相同性が 58.5% と、わずかに GluSW と GluSE の相同性の方が高かった。プレおよびプロ配列でもその傾向は同様で、共に GluV8 と GluSW の方が、GluSE と GluV8 あるいは、GluSE と GluSW よりも相同性が高かった。プレ、プロ、成熟配列の 3 領域では、成熟部分の方が 58.8-80.1% と他の 2 領域よりも相同性が高く、プロ配列の相同性は 15.4-51.3% と最も低かった。これらのことから、GluV8 と GluSW がより近縁であることがわかる。第二に、各領域の変異速度には差があり、このことは、プロ領域がその機能を発揮するために必要な構造には、成熟領域が機能、すなわち酵素活性を発揮するために必要な構造に比べて、大きなアミノ酸置換の自由度があることを示している。

pQE60 発現ベクターの *Bam*HI 部位に全長分子をコードする 3 種類のグルタミン酸特異的プロテアーゼ GluSE, GluV8, GluSW 遺伝子 (Ohara-Nemoto ら, 2002; Carmona and Gray, 1987; Yokoi ら, 2001) を挿入し、その誘導体の遺伝子を挿入して大腸菌発現を試みた。発現リコンビナント分子の N 末端には制限酵素部位に由来する Gly-Gly-Ser が、一方 C 末端は His<sub>6</sub> タグをコードする。さらに 3 種類の発現ベクターを元に、それらの誘導体を発現するベクター 9 種類、計 12 種類を発現した (Table 1)。

12 種類の発現分子を含むバクテリアライゼートを SDS-PAGE で分離し、タンパク染色した (Fig. 2)。レーン 1, 7, 8, 9, 10, 12 では発現タンパク質のバンドが確認された (Fig. 2a, 矢頭)。後で判明するが、レーン 5, 6 にも 44 kDa 分子が定量的に発現していたが、その位置に大腸菌由来のタンパク質があるために、ライゼートでは発現を確認することはできなかった。分離したタンパク質を His<sub>6</sub> タグ特異的なモノクローナル抗体により検出したところ、すべてのレーンで陽性バンドの存在が確認された (Fig. 2b)。多くのレーンでは複数のバンドが検出され、部分分解を起こしていることが判明した。本抗体と反応するエピトープ His<sub>6</sub> は C 末に局在するので、N 末側の異なる部分で切断されていると推察された。

バクテリアライゼートよりアフィニティークロマトグラフィー (タロンアフィニティークロマトグラフィー) によってリコンビナントタンパク質を精製した (Fig. 2c)。そのバンド強度は発現量を反映していると考えられた。発現量は GluSE (レーン 1) で、GluV8 (レーン 2) を大きく上回っていた。すでに報告しているように GluV8 のプレプロ配列を GluSE のそれと入れ替えることで GluV8 の発現効率が上がった (レーン 3, Nemoto ら, 2008)。この改善は GluV8 のプ

レプロ配列を自己消化されにくい GluSE のプレプロ配列に置換したためだと考えられた。しかし、Fig. 2a に示すように、GluV8 と同様に GluSE も複数のバンドを生じ部分分解が生じていた。

2種のプロテアーゼのプロ配列を比較すると GluV8 では、プロ配列部の C 末付近に Glu<sub>62</sub> と Glu<sub>65</sub> という GluV8 による消化を最も受けやすいペプチド結合を形成するアミノ酸が存在する。一方、GluSE プロ配列では、Glu<sub>40</sub> が成熟配列の N 末に最も近接しており、非効率的ながら切断されうる Asp も、C 末に最も近いもので Asp<sub>46</sub> である。私たちはすでに、Glu<sub>62</sub> と Glu<sub>65</sub> の位置で切断された GluV8 は、成熟型の 1/1,000 程度の活性を有することを示している (Nemoto ら, 2008)。つまり GluV8 の低発現は宿主内で自己消化を起こして宿主にダメージを与えるためであると推測された。

プロ配列内の自己消化を抑える目的で、本来の GluV8 のプロ配列を用いて発現する改良法を検討した。2アミノ酸 (Fig. 2c, レーン 4)、4アミノ酸 (レーン 5)、5アミノ酸 (レーン 6) と、順次 GluSE のプロ配列のアミノ酸に変異してゆくと、バンド強度が次第に増した。特に GluV8 のプレプロ配列内のすべて (2か所の Glu および 1か所の Asp) と、プロ配列 C 末端部の 2アミノ酸を GluSE のアミノ酸に置換した分子はもっともバンド強度が強かった (レーン 6)。

GluV8 には C 末端に 3アミノ酸 (Pro-Asp-Asn または Pro-Asn-Asn) の 12 回繰り返し構造がある (Carmona and Gray, 1987)。しかし、この配列は GluV8 ファミリータンパク質で保存されているわけではなく、例えば GluSE にはこの配列はないことから、プロテアーゼ活性には無関係だと考えられる。実際にこの部分を欠失させた GluV8 を発現しても活性を有する分子が得られている (Yabuta ら, 1995)。そこで C 末の繰り返し配列を含む 52アミノ酸 (アミノ酸 285-336) の欠失分子 (GluV8mut5 ΔC) を発現したところ、非欠失分子 (GluV8mut5, レーン 6) よりもさらにバンド強度が増した (レーン 7)。

### 恒常不活性型 GluV8 と潜在型 GluV8 発現効率の比較

上記のように GluV8 プロ配列を自己消化抵抗性のアミノ酸に置換することで、GluV8 の収率が改善し、GluV8mut5 ΔC で、その発現は最高となった。しかし、この条件でも発現中にまだ自己消化が起きているのかどうかは不明である。そこで対照とするために恒常的に活性のない GluSE および GluV8 の発現を試みた。グルタミミン酸特異的プロテアーゼファミリーメンバーは、セリンプロテアーゼであり、GluSE の Ser<sub>235</sub> および GluV8 の Ser<sub>237</sub> が活性発現に必須であると考えられる (Ohara-Nemoto ら, 2002 ; Prasad ら, 2004)。実際に GluV8 の Ser<sub>237</sub> を Ala に置換すると、その後のサーモライシンによる試験管内の活性化によっても全く活性を示さなかった (Nemoto ら, 2008)。そこで自己消化を全く生じない恒常不活性型分子 GluSE Ser235Ala, GluV8mut4 Ser237Ala, GluV8ΔCmut4 Ser237Ala を発現すると、いずれも良好な発現が達成できた (Fig. 2, レーン 8-10)。ところで、すでに述べた潜在型分子 GluSE (Fig. 2, レーン 1)、GluV8mut5 (レーン 6) および GluV8mut5 ΔC (レーン 7) において、もし自己消化が完全に抑制されているならば、それぞれの恒常性不活性型分子と同程度の発現が期待さ

れる。実際に、GluSE (レーン 1) と GluSE Ser235Ala (レーン 8), GluV8mut5 (レーン 6) と GluV8mut4 Ser237Ala (レーン 9), GluV8mut5 ΔC (レーン 7) と GluV8mut4 ΔC (レーン 10) とを比較すると、ほぼ同水準の発現が達成されていた。

### **S. warneri** グルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluSW) とそのキメラ型分子 (GluV8-SW) の発現

これまで GluSW の大腸菌およびその他の宿主での発現の報告はない。Yokoi らは (2001) は、*S. warneri* 菌の産生する GluSW を精製してその成熟型の N 末端配列が、GluV8 (Val<sub>67</sub>-Ile-Leu-Pro---) や GluSE (Val<sub>67</sub>-Ile-Leu-Pro---) とは異なり、Arg<sub>64</sub>-Ala-Asn-Val-Ile-Leu-Pro---であったと報告している。もしそうならば、Glu<sub>63</sub>-Arg<sub>64</sub> の自己消化による活性化機構が考えられる。そこで本研究の発現手法が GluSW にも応用できるかどうかと、その後の *in vitro* 活性化が GluSW では自己消化によって起きるのか、それともサーモライシンファミリー酵素によるのかを明らかにするために、大腸菌発現系を構築することとした。

野生型 GluSW ではイムノプロットや精製標品で 33 kDa を主要なバンドとする 3 本のバンドが認められるものの、その収量はかなり低く、ライゼートタンパク質を CBB 染色した段階では発現は確認できなかった (Fig. 2, レーン 11)。そのプロ配列内には Glu<sub>28</sub>, Asp<sub>34</sub>, Asp<sub>51</sub>, Glu<sub>60</sub>, Glu<sub>63</sub> と自己消化のターゲットとなるアミノ酸が存在する (Fig. 1B)。特にプロ配列 C 末付近の Glu<sub>60</sub> と Glu<sub>63</sub> は GluV8 にも共通していた。つまり GluV8 と同様に GluSW の低発現も発現宿主内で自己消化を起こすためであると推測された。

GluV8 で成功したような GluSW プロ配列の 7 アミノ酸 (3Glu, 2Asp とプロ配列末端部の Ala-Asn, Fig.1b) を変異させることで、GluSW の自己消化による活性化を抑制できるものと考えられた。しかし、Fig. 1a に示した GluSW と GluV8 のプロ配列の高い相同性を考慮すれば、7 種類のアミノ酸を変異させるという煩雑な手法よりも、すでに作成している変異型 GluV8 (GluV8 mut5) のプロ配列を利用してキメラ分子 (GluV8 mut5-SW) を作成することで、この目的を達成できるのではないかと考えた。そこで実際にキメラ分子を作成して発現したところ、ほぼ 38 kDa の単一分子として発現され (Fig. 2c, レーン 12)、しかも、ライゼートタンパク質の段階でバンドが認められるまで発現量は改善した (Fig.2a, レーン 12)。

### **GluV8** および **GluSW** の大量発現と精製

GluV8mut5 ΔC は野生型の分子よりも、また以前のキメラ型 GluV8 よりも少量 (12 ml) の発現系で収量が改善したが (Fig. 2)、実際に大量発現 (800 ml 培養) でもその発現量が大幅に改善することが示された (Fig. 3a)。1 リットルカルチャーあたり 20 mg の精製表品が得られた。GluSW でもまったく同様に、1 リットルあたり 25 mg の標品が得られた。

### 発現リコンビナントプロテアーゼの *in vitro* プロセッシング

今回の目的は活性のあるプロテアーゼを大量に得ることにあるので、精製したプロ型プロ

テアーゼが *in vitro* で成熟型に変換されるかどうかをテストした。精製 GluSE (10 µg) あるいは等モルのその他のリコンビナントプロテアーゼ当たり 0.1 または 0.3 µg のサーモライシンで加温すると、0.1 µg 処理 [リコンビナントプロテアーゼ/サーモライシン (モル比) = 100/1] では中間分子量のバンドが生じたが、0.3 µg (モル比, 33/1) で処理したものはほぼ単一バンドが得られた (Fig. 4a)。GluV8mut5 (レーン 6) では 2 本のバンドを生じたが、これはすでに報告しているように、本来の黄色ブドウ球菌の産生する GluV8 でも同じ位置に 2 本のバンドを生じる (根本と根本, 2007)。C 末の繰り返し構造内で切断された分子が生じているものと考えられた。

3 種のグルタミン酸特異的プロテアーゼの活性を Z-Leu-Leu-Glu-MCA ペプチドを基質として測定した。精製標品は活性をまったく示さないが、サーモライシン処理によって、その活性が発現した。GluV8 の比活性は他の 2 種に比べて圧倒的に高かった。GluSW は GluSE と同程度だった (Fig. 4b)。高活性の GluV8 を除いて、GluSE と GluSW に注目して同じデータを再プロットしたのが Fig. 5c である。2 つのサーモライシン処理条件のどちらでも 43% (0.1 µg サーマライシン処理), 86% (0.3 µg 処理) GluSW の方が GluSE よりも活性が高かった。以前に報告したように、GluV8 と GluSE の Z-Leu-Leu-Glu-MCA に対する比活性の大きな違いは、遺伝子操作によって引き起こされた人工的な変異によるものではなく、本来のそれぞれの菌の産生する酵素の活性の違いをそのまま反映していた (根本と根本, 2007)。

このような大きな比活性の違いに関してさらに検討を進めた。アゾカゼインを基質としてその活性を測定したところ、比活性の順位は GluV8 > GluSW > GluSE と活性の違いは同様だったが、Z-Leu-Leu-Glu-MCA の場合とは異なり、GluV8 とそれ以外の 2 種のプロテアーゼ間で大差なかった。またこれら 2 種類の基質を用いた比較から、GluV8 の C 末の 52 アミノ酸を欠失した分子でも、活性には全く差がないことが判明した。

## 発現 GluSW の N 末配列

発現したリコンビナント GluSW の N 末配列を決定したところ、GluV8mut5-SW では、GluV8 の Leu<sub>30</sub> を持っていた (Table 1)。すなわち GluV8mut5-SW キメラ分子、かつ大腸菌発現系でも本来のプレ配列-プロ配列間で切断されていた。一方、野生型 GluSW の N 末は Arg<sub>64</sub> で、プロ配列の大部分を欠き、プロ配列の最後の 3 アミノ酸だけを保持していた。Glu<sub>63</sub>-Arg<sub>64</sub> 結合は GluSW に切断されうる結合であり、予想したように自己消化が起きていると考えられた。そのため、自己消化を抑制することで発現の収量があがるのが、GluSW においても確認できた。

## 考察

私たちはこれまで困難であった GluV8 の大腸菌発現系を開発してその大腸菌での大量生産に道を開いた (根本と根本, 2007)。しかし特願 2007-077746 の方法では、まだ大腸菌宿主内

での発現中の自己消化を完全に抑制することができず、まだ低収率であったことが今回明らかになった。さらに、本来の GluV8 のプロペプチドの 5 残基のアミノ酸を GluSE 型に置換し、活性をまったく持たない変異分子の発現を対照として比較することにより、今回の発現系では自己消化がほぼ完全に抑えられていることを示した。また、C 末の 3 アミノ酸の 12 回繰り返し構造を含む 52 残基を除くことによりさらに収量が改善した。この発現分子 GluV8mut5 ΔC もサーモライシンによる *in vitro* のプロセッシングによって成熟型に変換すること、そして、C 末の 52 アミノ酸が活性にはまったく無関係であることを証明した。また、本研究で開発した GluV8mut5 のプロ配列が、GluV8 の発現のみならず、GluSW の発現にも有効であることを明らかにした。

Ala<sub>67</sub>-Asn<sub>68</sub> を GluSE 型の Pro<sub>67</sub>-Ser<sub>68</sub> に置換することも収量の改善につながった。われわれは Ala<sub>67</sub>-Asn<sub>68</sub> を同時に Pro<sub>67</sub>-Ser<sub>68</sub> に置換したために、それぞれのアミノ酸置換の影響は定量できていないものの、それぞれの置換が発現改善につながっていると推測している。まず、Asn<sub>68</sub>Ser 置換であるが、Asn-X 結合は一般に GluV8 ファミリープロテアーゼの基質にはならないとされている。しかし Asn と Asp は類似の側鎖を有するために Asn<sub>68</sub>-Val<sub>69</sub> の自己切断が起こりうる可能性を私たちは考えている。実際に、GluV8mut5 ΔC は、Z-Ala-Ala-Asn-MCA を Z-Leu-Leu-Glu-MCA の 0.12%、スクシニル-Ala-Glu-MCA の 5.4% の速度で分解することを認めた（根本、未発表）。既に報告したように、Glu<sub>62</sub> や Glu<sub>65</sub> の C 末側のペプチド結合で切断されたプロペプチドを有する GluV8 は、Val<sub>69</sub> を N 末に持つ本来の成熟分子の 0.1% 程度の活性を有し、同時に宿主の成育が大きく遅延する（Nemoto ら、2008）。つまりたった 0.1% のプロテアーゼ活性でもリコンビナント分子発現レベルを大きく低下させるのである。そのため、仮に発現 GluV8 分子の 0.1% の Asn<sub>68</sub>-Val<sub>69</sub> 結合が切断されても、同様に発現に大きく影響すると考えられる。

では Ala<sub>67</sub> の Pro<sub>67</sub> への置換はどのように発現分子の安定化に寄与しているのだろうか？ GluV8 のプロセッシング酵素であるサーモライシンの Glu-Pro 結合の分解速度は Glu-Val 結合の 0.004% 程度であると報告されている（Breddam and Meldel, 1992）。そのため、Ala<sub>67</sub>Pro 置換もこの前後のペプチドのサーモライシンによる切断効率を低下させていると考えられる。これらの効果のために、GluV8mut2 (Fig. 2, レーン 4) よりも GluV8mut4 (レーン 5) の発現がよいのだろう。

われわれは、さらに、GluV8mut4 より GluV8mut5 でさらに収量が改善することを認めた。われわれは当初、この Asp<sub>36</sub> の His への置換は、収量に大きな影響を与えないかもしれないと予想していた。その理由は、GluV8 の Asp-X 結合切断活性は Glu-X 活性よりもかなり弱いこと、またもし切断されても、プロペプチド Leu<sub>30</sub>---Asn<sub>68</sub> (mut5 型酵素では Leu<sub>30</sub>---Ser<sub>68</sub>) の大部分を保持しているため自己消化にはあまり影響がないだろうと考えたためである。しかし、実際には GluSE や GluSE-V8 キメラ分子の発現実験の結果、Glu<sub>42</sub>-Asn<sub>43</sub> が切断された 29 kDa 分子のみならず、Asp<sub>48</sub>-Ile<sub>49</sub> で切断された 30 kDa 分子も見いだされたため、宿主内では Asp-X 結合も実際に切断されていることが判明した。Asp<sub>36</sub>-Asn<sub>37</sub> 部位で自己消化された GluV8 はまだプロペプチドの大部分 (Asn<sub>37</sub>-Ser<sub>68</sub>) を保持しているにもかかわらず、収量が下がるのはなぜだろうか？ プロペプチド全長の場合に比べて、短小プロペプチドは安定性が劣る可能性があると思われる。ズブチリジンのプロペプチドは、単独では決まった二次構造

をとりえないが、成熟部分が存在すると一定の構造をとりうるということが知られている (Subbianら, 2005). このような構造の不安定なプロ配列の場合は、たとえ9残基 (Leu<sub>28</sub>-Asp<sub>36</sub>) が失われただけでもプロペプチド全体が不安定化して、さらにプロ配列内分解を受けるのかもしれない。

GluV8に存在するC末端の3アミノ酸の12回繰り返し配列の機能はわかっていない。この配列は、黄色ブドウ球菌でも菌株によって繰り返しの程度が違うこと、GluSEではそのような配列は全くないこと、GluSWでは、かなり異なる配列と長さになっていることから、酵素活性そのものには必要がないだろうと考えられている。われわれ以前にも、このC末繰り返し構造を除いたGluV8ΔCを発現し活性を有する分子が得られている (Yabutaら, 1995)。しかしながら、全長を保持した分子と欠失分子とを同時に発現して活性を比較した報告はこれまでなかった。われわれは本研究でこれを実現して、C末繰り返し配列が、活性にまったく影響を及ぼさないことを示した。さらに欠失分子の方が収量もよかった。一般に、立体構造や機能に影響がない構造であるならば無駄な配列は除いたほうが大腸菌での発現量は上昇する。特にGluV8C末部は特殊で、大部分をPro, Asp, Asnが占めるため、宿主のアミノアシル tRNA プールの枯渇が制限因子になっている可能性もある。

以上、本報告でわれわれは大腸菌発現系で自己消化による収量の低下をほぼ完全に抑制するGluV8および類縁酵素ファミリーの大腸菌発現系を確立した。本法はプロテオーム解析に汎用されるGluV8の大量発現を可能にした。また本報告の結果は、GluV8ではプロ配列の一部が必要なのではなく、完全長のプロ配列を安定的に保つことや、わずかな自己消化産物の発生でも収量に大きな差異が生じることを示した。

いまだに大腸菌発現の困難な多くのプロテアーゼが存在する。その理由は自己消化による分解によると、ジスルフィドの形成が達成されないためなどによるフォールディング異常と推察されてきた。そのため、これまでは最初から活性のない沈殿物として大腸菌で発現し、精製した後、変性 (可溶化)、フォーリディングさせて活性のあるプロテアーゼを得るという戦略がとられることもあった。実際にGluV8もこの方法での精製法が報告されている (Yabutaら, 1995)。今回はこれらの2つの問題のうち、第一の問題についてはプロペプチドの配列を工夫することで、可溶性プロテアーゼの大腸菌大量発現に道が開けた。私たちは本法の原理は、GluV8だけでなくGluSWなどのグルタミン酸特異的プロテアーゼファミリーに応用できることを示したが、さらに発現困難な他のプロテアーゼにも適用可能だと考えている。例えば、Arg-X配列を特異的に切断する *Porphyromonas gingivalis* の Arg-ジンジパインも沈殿物として発現したという報告があるが (Margettsら, 2000)、この分子もわたしたちの方法での発現を現在検討中である。

ところで、第2の、ジスルフィド結合をはじめとするフォールディングの困難さはどう克服すべきだろうか？一番の問題は、このことがどの程度プロテアーゼ発現の障害になっているかが実際にはよくわかっていないことである。複雑なサブユニット構造をとるほかのタンパク質分子とは異なり、モノマー構造をとることが多いプロテアーゼの場合は、この問題は重大な障害でないことも多いのではないかとわれわれは推測している。私たちの結果から、

プロ配列の遺伝子改変を徹底的におこなえばプロテアーゼの自己消化の問題は回避できる見込みがついたので、今後は高次構造形成が本当にうまくゆかないケースがあるのかどうかを定量的に解析してゆくことができる。例えば、origami (Novagen) などのジスルフィド結合を促進する大腸菌株の使用もあわせて研究を進めれば、今後この問題の理解も進むだろう。

## 謝辞

本研究の遂行当たり、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔分子生化学分野の小野俊雄博士の協力に感謝いたします。N末端のアミノ酸配列分析をしていただいた岩手医科大学歯学部の下山佑博士に感謝いたします。本研究の一部は文部科学省科研費 (TKN) を用いておこなわれました。

Table 1. 大腸菌発現分子の性質

1	GluSE	野生型 GluSE 全長
2	GluV8	野生型 GluV8 全長
3	GluSE-V8	GluSE のプレプロ配列-GluV8 成熟配列
4	GluV8mut2	GluV8 プロ配列の 2 アミノ酸の変異 (Gln62Gln/Glu65Ser)
5	GluV8mut4	GluV8 のプロ配列 4 アミノ酸の変異 (Glu62Gln/Glu65Ser/Ala67Pro/Asn68Ser)
6	GluV8mut5	GluV8 のプロ配列 4 アミノ酸の変異 (Asp36His/Glu62Gln/Glu65Ser/Ala67Pro/Asn68Ser)
7	GluV8mut5 ΔC	GluV8 mut5 の C 末端 52 アミノ酸の欠失
8	GluSE Ser235Ala	GluSE の 1 アミノ酸の置換 (Ser235Ala)
9	GluV8mut4 Ser237Ala	GluV8mut4 の 1 アミノ酸の置換 (Ser237Ala)
10	GluV8mut4 ΔC Ser237Ala	GluV8mut4 ΔC の 1 アミノ酸の置換 (Ser237Ala)
11	GluSW	野生型 <i>S. warneri</i> プロテアーゼ全長
12	GluV8mut5-SW	GluV8 mut5 プレプロ配列-GluSW 成熟配列

1-12 は Fig. 2 のレーンナンバーに一致する.

Table 2. GluSW および GluV8mut5-SW の N 末配列

リコンビナント分子	分子量 (kDa)	検出アミノ酸	決定したアミノ酸配列
GluSW	36	RANVILPNN	E <sub>63</sub> /R <sub>64</sub> ANVILPNN
Thermolysin-treated GluSW	32	VILPNNDRHQ	N <sub>66</sub> /V <sub>67</sub> ILPNNDRHQ
GluV8mut5-SW	38	LSSKANHMNP	A <sub>29</sub> /L <sub>30</sub> SSKANHMNP

## 参考文献

- Breddam, K. and Meldel, M. Substrate preference of glutamic-acid-specific endopeptidases assessed by synthetic peptide substrates based on intramolecular fluorescence quenching. *Eur. J. Biochem.* **206**, 103-107 (1992)
- Carmona C., and Gray G.L. Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6757 (1987)
- Margetts M.B., Barr I.G., and Webb E.A. Overexpression, purification, and refolding of a *Porphyromonas gingivalis* cysteine protease from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **18**, 262-268 (2000)
- Matsumoto S., Tanaka E., Nemoto T. K., Ono T., Takagi T., Imai J., Kimura Y., Yahara I., Kobayakawa T., Ayuse T., Oi K., and Mizuno A. Interaction between the N-terminal and middle regions is essential for the in vivo function of HSP90 molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* **277**, 34959-34966 (2002)
- Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y., Ono T., Kobayakawa T., Shimoyama Y., Kimura S. and Takagi T. Characterization of the glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus aureus* expressed in *Escherichia coli*. *FEBS J.* **275**, 573-587 (2008)
- 根本孝幸, 根本優子 組換えプロテアーゼの製造方法 特願 2007-077746 (2007)
- Ohara-Nemoto Y., Ikeda Y., Kobayashi M., Sasaki M., Tajika S., Kimura S. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis* *Microb. Pathog.* **33**, 33-41 (2002)
- Prasad, L., Leduc, Y., Hayakawa, K., Delbaere, L.T. The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crysta.* **60**, 256-259 (2004)
- Stennicke H.R. and Breddam K. Glutamyl endopeptidase I. In: Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner F. F. Jr. Eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. San Diego: Academic Press, 243-246 (1998)
- Subbian E., Yabuta Y., and Shinde U.P. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperon: intrinsically unstructured propeptide mediates stochastic activation of subtilisin. *J. Mol. Biol.* **347**, 367-383 (2005)
- Yokoi K., Kakikawa M., Kimoto H., Watanabe K., Yasukawa H., Yamakawa A., Taketo A., and Kodaira K.I., Genetic and biochemical characterization of glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus warneri* M. *Gene*, 281, 115-122 (2001).
- Yabuta M., Ochi N., and Ohsuye K. Hyperproduction of a recombinant fusion protein of *Staphylococcus aureus*. V8 protease in *Escherichia coli* and its processing by OmpT protease to release an active V8 protease derivative. *Appl. Microbiol. Biotech.* **44**, 118-125 (1995)
- 藪田雅之他一名 蛋白の製造方法 特許公開平 8-18709 (1996)

## 図の説明

**Fig. 1. GluSE, GluV8 および GluSW のアミノ酸配列の比較** (a) 表皮ブドウ球菌 GluSE, 黄色ブドウ球菌 GluV8, *S. warneri* 菌 GluSW のプレ配列, プロ配列, 成熟配列のアミノ酸の相同性を比較した. GluV8 の C 末の繰り返し配列(アミノ酸 385-336), GluSW の C 末の Asn/Asp リッチ領域(アミノ酸 283-316) は比較から除外した. (b) GluSE, GluV8, GluSW, GluV8mut5 のプレプロペプチド配列を示す. 小文字は発現ベクター-pQE60 由来の配列である. 下線部は自己消化される可能性のあるアミノ酸を示す. 相同性を最大にするために導入した 2 残基の欠失をハイフンで示す. GluV8mut5 において GluV8 型から GluSE 型へ変換した 5 アミノ酸 (Asp36His, Glu62Gln, Glu65Ser, Ala67Pro, Asn68Ser) に星印をつけた. 矢印はプロセシング部位(プレプロ境界およびプロ成熟領域境界)を示す. すべてに共通のアミノ酸は青で示した(カラー図の場合).

**Fig. 2. リコンビナントプロテアーゼの発現** リコンビナントを発現する大腸菌ライゼート(5 ml)を SDS-PAGE で分離した. (a) CBB 染色 (b) His<sub>6</sub> タグ特異的モノクローナル抗体を用いたイミノブロッキング (c) リコンビナントタンパク質を発現する培養液(12 ml)から調製したライゼート(1 ml)からタロンアフィニティーゲル(20 μl)により精製されたリコンビナントタンパク質(40 μl)のうち, 5 μl を SDS-PAGE で分離した. レーン 1-12 のタンパク質は Table 1 の Nos. 1-12 に一致する. レーン M, 分子量マーカー.

**Fig. 3. リコンビナントプロテアーゼの大量発現** (a) GluV8 (野生型, 白丸) と GluV8mut5 ΔC (黒丸), (b) GluSW (野生型, 白丸) と GluV8mut5-SE (黒丸) を 800 ml の培養液にて発現し, ライゼート(60 ml)とした. タロンアフィニティーカラム(1.5 x 5 cm)で精製した. 溶出液を 1 ml ずつ分画し, 280 nm の吸光度を測定した. 溶出ピークとその前後(5 μl)を SDS-PAGE (インサート図)により分離した.

**Fig. 4. リコンビナントプロテアーゼのサーモライシンによる活性化** 3.2 nmol の精製 GluSE, GluV8mut5, GluV8mut5 ΔC, および GluV8mut5-SW を処理なし(レーン 1, 4, 7, 10, または 37°C でサーモライシン 0.1 μg (レーン 2, 5, 8, 11) または 0.3 μg (レーン 3, 6, 9, 12) 存在下で 4 時間保温した. リコンビナントタンパク質/サーモライシンのモル比はそれぞれ 100/1, 33/1 となる. SDS 存在下で熱変性後 3.2 pmol (GluSE では 1 μg に相当する)を SDS-PAGE にて分離した. (b と c) サーモライシン未処理あるいは処理試料(0.8 pmol, GluSE では 0.25 μg)のグルタミン酸特異的プロテアーゼ活性を測定した. c には Fig. 3b のカラム 4-9 を除いて同一データを拡大してプロットした. (d) アゾカゼインを基質として分解活性を測定した. b-d で 0.1 μg (C1) および 0.3 μg (C2) サーモライシンでリコンビナント非存在下で同様に処理して, その一部で活性測定した対照である. b-d のカラム 1-12 の試料は a のレーン 1-12 と同一である.

図の説明

Fig. 1a

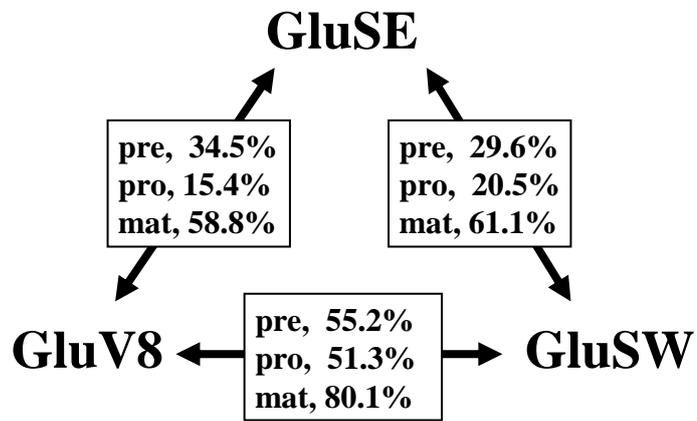


Fig. 1b

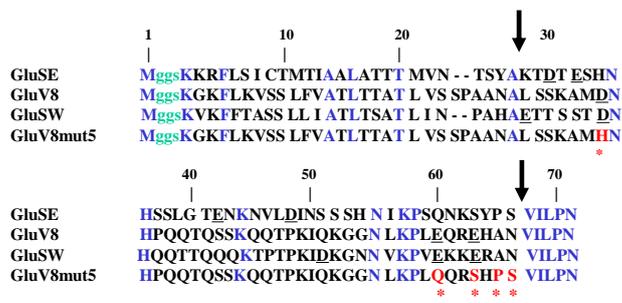


Fig. 2

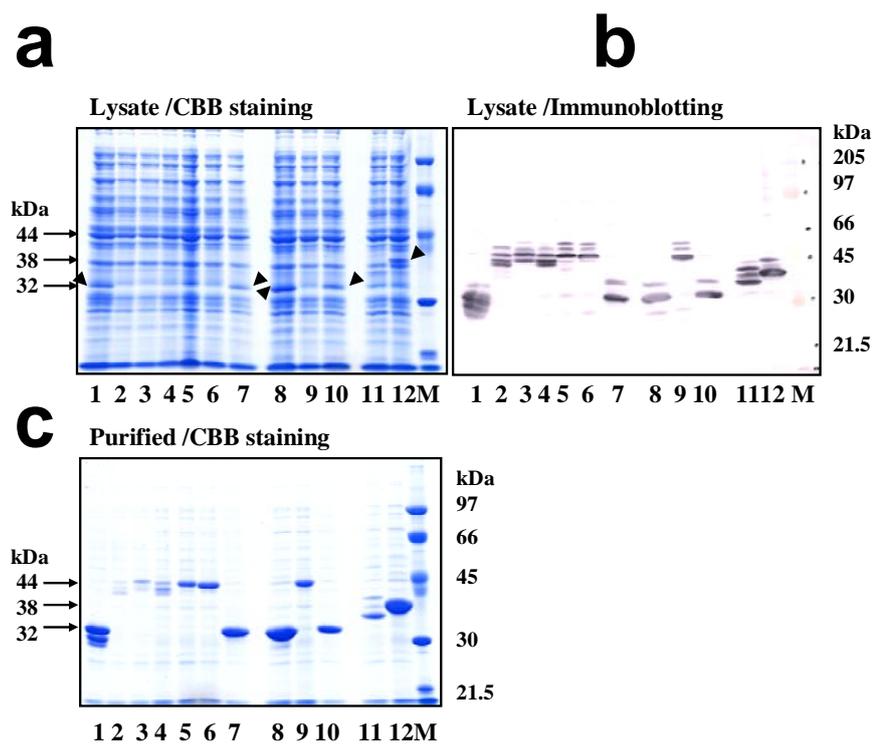


Fig. 3

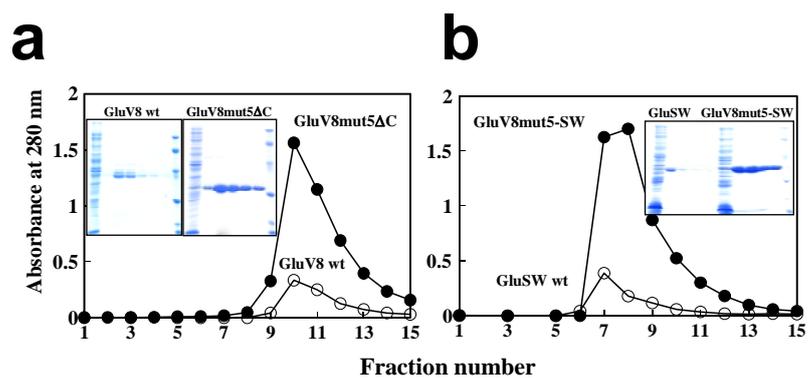


Fig. 4

