

第3章 酵素タンパク質の構造解析

緒言

アルギン酸リアーゼの構造解析は、殆どが細菌由来のもので、遺伝子の塩基配列より解析されている。真核生物としては 1996 年、Muramatsu *et al.* がサザエの中腸腺由来 PM Lyase (SP1、SP2) の一次構造をリジルエンドペプチダーゼ、エンドプロテイナーゼ Asp-N、 α -キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ Y を用いたタンパク質化学的手法により決定している。

アルギン酸リアーゼの基質特異性は、プロテアーゼなどと比較すると厳密である。しかし、これまでに報告されているアルギン酸リアーゼの一次構造を生物種間で比較しても相同性は極めて低い。PG と PM の両基質に作用するアルギン酸リアーゼは本酵素以外にもう一種について様々な性質や構造解析がなされている。*Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 について 2001 年、Sawabe *et al.* は遺伝子より一次構造を決定している⁶⁴⁾。その結果が示すところによれば、*Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 由来アルギン酸リアーゼは 234 アミノ酸残基から構成されており、酸性アミノ酸の含有率が多く、分子量 25.4 k である。第 2 章で No. 272 株由来アルギン酸リアーゼのいくつかの性状を明らかとしてきたが、比較可能な性質では Sawabe *et al.* の報告と大きな違いはないように思われた。

両酵素間にタンパク質化学的構造上の違いがあるかどうかを調べるため本研究では、第 1 節でタンパク質化学的手法による一次構造解析結果を、第 2 節で PCR 法による全一次構造解析結果を示す。第 3 節で明らかとなった本酵素と他起源由来アルギン酸リアーゼとの構造に関する比較を行う。第 4 節で CD による二次構造の推定を、また最後に、第 5 節で X 線結晶構造解析に関する知見を記述する。

第 1 節 タンパク質化学的手法による一次構造解析

実験材料

タンパク質の酵素消化に用いた各種酵素は以下の通りであった。リジルエンドペプチダーゼ、エンドプロテイナーゼ Asp-N、V8 プロテアーゼともに和光純薬品社製のものをを用いた。尿素、モノヨード酢酸は、ナカライテスク社製を、トリフルオロ酢酸、アセトニトリルは、和光純薬品社製を使用した。

実験方法

1. タンパク質の還元カルボキシメチル化(RCM 化)

精製した *Pseudoalteromonas* sp. 由来アルギン酸リアーゼを Crestfield らの方法⁸⁶⁾に従って還元カルボキシメチル化 (RCM 化) した。アルギン酸リアーゼを脱塩し、凍結乾燥したタンパク質 5 mg に対して 1.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 0.5 ml、5 % EDTA 50 μ l、尿素 0.6 g を加え温浴中で溶解し、純水で 1.25 ml とした。なお、この反応はキャップ付きスピッツ管で行った。この試料に β -メルカプトエタノール 17 μ l を加え、-SH 基の酸化を防ぐため高純度窒素ガスで置換し、37°C で 1 時間還元した。暗所でモノヨード酢酸 45 mg を含む 1 M NaOH 150 μ l を加え、高純度窒素ガスで置換後、アルミ箔でスピッツ管を覆い、室温で 30 分間カルボキシメチル化した。その直後、0.2 M アンモニア水溶液で平衡化した Sephadex-G50 カラム (1.5 x 45 cm) に供し、RCM 化タンパク質から過剰な試薬を除去した。得られた RCM 化タンパク質を凍結乾燥により得、以下の実験に用いた。

2. RCM 化タンパク質のリジルエンドペプチダーゼ消化とペプチドの分離

RCM 化タンパク質 1 mg を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 250 μ l に溶解し、(タンパク質)/(酵素) = (W/W) = 100 になるようにリジルエンドペプチダーゼ 23.3 μ l を加え、37°C で 1 時間酵素消化した。このようにして得たペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) に供した。RP-HPLC は、625LC system 高速液体クロマトグラフィー (Waters 社製) に逆相カラム Finepak SIL300 C18T-7 (4.6 x 250 mm、日本分光工業社製) を付したものを使用した。溶出溶液は、0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を溶媒 A、溶媒 A/アセトニトリル = (V/V) = 2/3 に調製

したものを溶媒 B として用いた。溶媒 A から溶媒 B への直線的濃度勾配の条件は以下の通りであった。

溶出時間 (分)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
初期	100	0
130	50	50
140	0	100

流速は、1.0 ml/min であった。

3. RCM 化タンパク質のエンドプロテイナーゼ Asp-N 消化とペプチドの分離

RCM 化タンパク質 1 mg を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 500 μ l に溶解し、(タンパク質) / (酵素) = (W/W) = 250 になるようにエンドプロテイナーゼ Asp-N 4 μ g を加え、37°C で 2 時間酵素消化した。このようにして得たペプチドを RP-HPLC に供した。溶媒 A から溶媒 B への直線的濃度勾配の溶出条件は以下の通りであった。しかし、D 15 以降のピーク (Fig. 23 参照) が非常に接近していたため、この部分については勾配をより緩やかにして再クロマトグラフィーを行った。

溶出時間 (分)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
初期	100	0
130	30	70
140	0	100

D 15 以降の溶出条件は、以下の通りであった。

溶出時間 (分)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
初期	100	0
10	62	38
150	0	100

流速は、1.0 ml/min であった。

4. RCM 化タンパク質の V8 プロテアーゼ消化とペプチドの分離

RCM 化タンパク質 0.5 mg を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 250 μ l に溶解し、(タンパク質) / (酵素) = (W/W) = 10 になるように V8 プロテアーゼ 50 μ g を加え、37°C で 1 時間酵素消化した。このようにして得たペプチドを RP-HPLC に

供した。溶媒 A から溶媒 B への直線的濃度勾配の溶出条件は以下の通りであった。

溶出時間 (分)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
初期	100	0
60	50	50
90	20	80
100	0	100

流速は、1.0 ml / min であった。

5. 酵素消化ペプチドの酸加水分解とアミノ酸組成分析

RP-HPLC で分取後、VC-360 遠心濃縮機 (Taitec 社製) で乾燥したペプチドを RP-HPLC の際に用いた溶媒 B で溶解し、10 μ l をそれぞれマイクロチューブ中で減圧乾固した。酸加水分解、アミノ酸組成分析は、第 2 章第 2 節 1.分子量の測定法 c) アミノ酸分析による分子量推定 に従って行った。

6. 酵素消化ペプチドのアミノ酸配列分析

各ペプチドのアミノ酸配列分析は、プロテインシーケンサー 477A と PTH アナライザー 120A (Applied Biosystems 社製) で行った。

結果および考察

1. RCM 化タンパク質のリジルエンドペプチダーゼペプチドマップおよび各ペプチドのアミノ酸配列

RCM 化タンパク質を前述した方法でリジルエンドペプチダーゼで酵素消化し、RP-HPLC で溶出したペプチドマップを Fig. 10 に示す。各ペプチドには溶出の早い順に L1~L25 まで番号をつけた。各ペプチドのアミノ酸配列を Table 7 に示す。

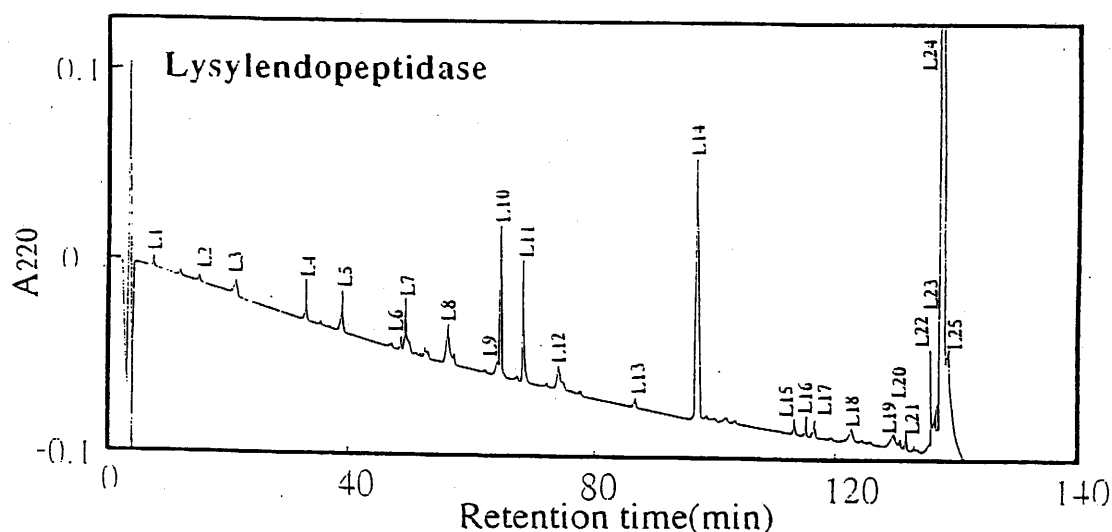


Fig. 10. Separation of Lysylendopeptidase Peptides of RCM-Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

RCM-protein (1 mg) was dissolved in 0.25 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, and digested with lysylendopeptidase (10 μ g) at 37°C for 1 hr. The peptides were subjected to RP-HPLC and eluted with linearly increasing concentration of acetonitrile, as described in Methods, at a flow rate of 1.0 ml/min. Peptides were numbered in order of elution with the prefix to L.

Table 7. Amino Acid Sequence of Lysylendopeptidase Peptides by Protein Sequencer

Peptide	Amino acid sequence
L1	VK
L2	TVK
L3	XNTSGNEE
L4	NTSGNEEK
L5	VEMSGGK
L6	XGEAGNXNX-
L7	XGEAGNXNXFK
L8	MTNVSYTXETN
L9	MTNVSYTRETN
L10	TIISQHHASDTGTISK
L11	VTMTNVSYTRETN
L12	QHITPXXNG
L13	GNYLQSQDPYTLDK
L14	X
L15	VAMTQTYEVFEAT
L16	FALGTMTSGETFNL
L17	SFGIPVEDGSQSYFK
L18	VYVSDTDESGFNDSVANXGI
L19	X
L20	VYVSDTDESGFNDXVA-
L21	X
L22	VVNNYGDVEXTAFGNSFGI
L23	X
L24	ESLRVAMTQXYEVFXAX
L25	X

2. RCM 化タンパク質のエンドプロテイナーゼ Asp-N ペプチドマップおよび各ペプチドのアミノ酸配列

RCM 化タンパク質を前述した方法でエンドプロテイナーゼ Asp-N で酵素消化し、RP-HPLC で溶出したペプチドマップを Fig. 11 に示す。各ペプチドには溶出の早い順に D1~D29 まで番号をつけた。各ペプチドのアミノ酸配列を Table 8 に示す。

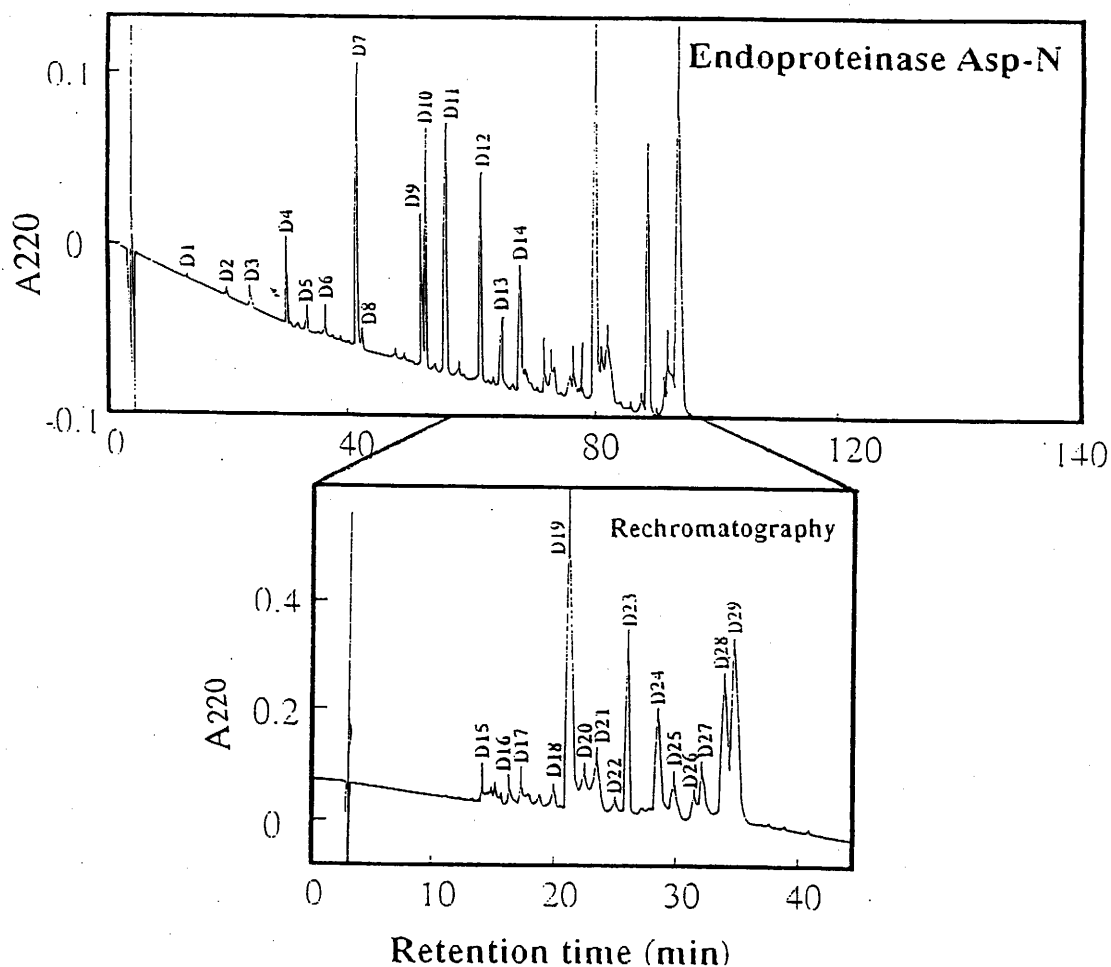


Fig. 11. Separation of Endoproteinase Asp-N Peptides of RCM-Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

RCM-protein (1 mg) was dissolved in 0.5 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, and digested with endoproteinase Asp-N (4 μ g) at 37°C for 2 hr. Others were same as described in Fig. 10.

Table 8. Amino Acid Sequence of Endoproteinase Asp-N Peptides by Protein Sequencer

Peptide	Amino acid sequence
D1	ND
D2	ND
D3	DLEG
D4	DESGFN
D5	DTDESGFN
D6	TNVSYTRETN
D7	DGGKTIISQHHAS
D8	MTNVSYTRETN
D9	DNPNPLV
D10	DTGTISKVYVS
D11	DPYTL
D12	DKXGEAGNXNXFKNXFE
D13	DSVANXGI
D14	DLGITESKVTMT-
D15	DLGITESKVTMTNVSYT
D16	DLGIXESK
D17	ETFNLXVVNNYG
D18	DGSQSYFKFG
D19	DGSQSYFKFGNYLQSQ
D20	AFGNSFGIPVE
D21	NGSTIPSSITXG
D22	DVYVXLXNTSGNEEKFALGX-
D23	DVYVXLX-
D24	DDSTLVFVPLEAQH-
D25	DXSTLVFVPLEAQHITP
D26	DVEVTAFG
D27	DXSTLVFVPLEAQHITPX
D28	DVEVTAFGNSFGIPVE
D29	DXSTLVFVPLEAQHITP

3. RCM 化タンパク質の V8 プロテアーゼペプチドマップおよび各ペプチドのアミノ酸配列

RCM 化タンパク質 1 mg を前述した方法で V8 プロテアーゼで酵素消化し、RP-HPLC で溶出したペプチドマップを Fig. 12 に示す。各ペプチドには溶出の早い順に V1~V34 まで番号をつけた。各ペプチドのアミノ酸配列を Table 9 に示す。

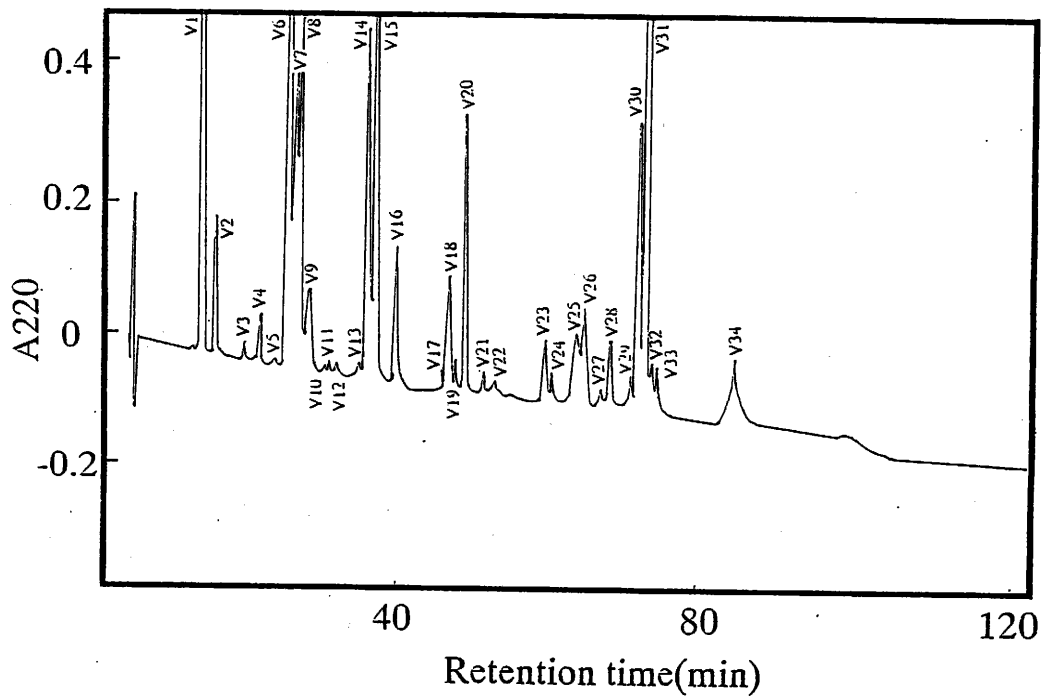


Fig. 12. Separation of V8 Protease Peptides of RCM-Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

RCM-protein (0.5 mg) was dissolved in 0.25 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5, and digested with V8 protease (50 μ g) at 37°C for 1 hr. Others were same as described in Fig.10.

Table 9. Amino Acid Sequence of V8 Peptides by Protein Sequencer

Peptide	Amino acid sequence
V1-1	YKVKE
V1-2	ATVKVE
V2	VFE
V3	MTNVSYTRE
V4-1	MSDGGKTII-
V4-2	VTAFGN
V5	n.d.
V6	AQHITPNGN
V7	DLGITE
V8	SKVTMTNVSYTRE
V9	TGTISKVYVSDTDE
V10	n.d.
V11	n.d.
V12	n.d.
V13	n.d.
V14-1	AGNSNSFKNXFE
V14-2	SLXVAMTQTYE
V15	MSDGGKTIISQHHASD
V16	KFALGTMTSGE
V17	n.d.
V18	SGFNDSVAN
V19	SGFNDSVANX
V20	TFNLRVVNNYGDVE
V21	TFNLRVVNNYGDVE
V22	MSDGG-
V23-1	SQSYFKFGNYL-
V23-2	DESGFX
V24	STLVFVPLE
V25	DNSXGXIOX
V26	GGXTIIS-
V27	SGFNDSVAN-
V28	NSFGIPVED
V29	VTAFGNSFGIPVE
V30	GDNPNPLVDXXTLVFPLE
V31	VTAFGNSFGI-
V32	n.d.
V33	VTAFGNSFGI-
V34	n.d.

4. Edman 法による一次構造解析

RCM 化タンパク質をリジルエンドペプチダーゼ、エンドプロテイナーゼ Asp-N、V8 ペプチダーゼで消化して得られた各ペプチドのオーバーラップを見たところ、4 つの部分配列を得ることが出来たが、全体を連結することはできなかった (Fig. 14 参照)。特に、N 末端側のアミノ酸配列を求めることが困難であった。ネイティブなタンパク質を直接プロテインシーケンサーに供することで本酵素タンパク質の N 末端アミノ酸配列が D-N-S-N-G-S-T-I-P-S-S- であることが分かった。この配列は、V8 プロテアーゼ消化により得られた V25 と一致した。また、リジルエンドペプチダーゼ消化により得られたピークのうち、L11 が有意義にリジン残基で終わっていないことが分かった。よって、現段階において、L11 の配列が本酵素の C 末端アミノ酸配列 (-V-T-M-T-N-V-S-Y-T-R-E-T-N) であると考えられた。これらの N 末端、C 末端のアミノ酸配列を基に、*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株の染色体 DNA を鋳型とし、PCR (複製連鎖反応) 法により本酵素の全一次構造解析を行った。

第 2 節 PCR 法による一次構造解析

実験材料

Premix Taq は宝酒造製を、TA Cloning Kit (INVαF *E. coli* を含む) は Invitrogen 社製を用いた。GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit と GFX™ Micro Plasmid Prep Kit は Pharmacia 社製を用いた。ジゴキシゲニン-11-dUTP (DIG) とアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体は、Roche 社製を用いた。5-ブromo-4-クロロ-3-インドール-β-D-ガラクトシド (X-Gal) と *EcoRI* はニッポンジーン社製を使用した。

実験方法

1. オリゴヌクレオチド(プライマー、プローブ)のデザイン

未処理の *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来アルギン酸リアーゼをプロテインシーケンサーに供して明らかとなった N 末端アミノ酸配列とリジルエンドペプチダーゼにより得られた有意にリジンで終わっていないペプチドを C 末端アミノ酸配列としてこれらからプライマーのデザインを行った。プライマー、プローブの合成は Pharmacia 社に委託した。

本酵素の N 末端から 1~9 残基:D-N-S-N-G-S-T-I-P の配列をセンス側 DNA 配列に読み替え、27 mer の N 末端側プライマー PriN-Mix とした。アンチセンス側 DNA 配列は C 末端から 9~1 残基:N-V-S-Y-R-E-T-N の配列から読み替え、27 mer の C 末端側プライマー AAL-CP1 とした。そして、第 1 節で行った 3 種類の酵素消化で得られたペプチドのオーバーラップ (L18、V9・V18、D5・D13) が認められた部分アミノ酸配列 -D-T-D-E-S-G-F-N-D-S-V-A-から読み替え、36 mer のミックスプローブ AAL-pro2 とした。

PriN-Mix	5'-GAYAAAYWSNAAYGGNWSNACNATHCCN-3'
AAL-CP1	5'-AATGTTACTTATACTAGTGAAACAAAC-3'
AAL-pro2	5'-GATACTGATGAATCGGGCTTTAATGATAGCGTAGCG-3'

2. オリゴヌクレオチド(プローブ)の 3'末端ラベル

プローブとして目的断片の検出に用いるため、ジゴキシゲニン-11-dUTP で 36 mer の AAL-Pro2 の 3' 突出末端をラベルした。

ラベリングシステムを用いプロトコールに従って、ジゴキシゲニン-11-dUTP (DIG) をプローブにラベリングした。純エタノール、4 M LiCl₂ を加え、-80°C で 20 分間インキュベートし、18,800 x g で 15 分間遠心した後、ペレットを 70% エタノールでリンスし、同条件で遠心後、15 分間ドライアップし、20 µl の滅菌高純度蒸留水にピペッティングによって溶解させ、これをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションの際に用いた。

3. PCR 法による目的断片の増幅

Pseudoalteromonas sp. No. 272 株の染色体 DNA 抽出は、Saito and Miura の方法⁸⁸⁾ に従った。調製した染色体 DNA をテンプレートとし、以下の組成で PCR 用チューブに調製し、PCR 反応 (変性、94°C で 1 分間; アニーリング、45°C で 1 分間; 伸長反応、72°C で 1 分間) を 40 サイクル行った。

H ₂ O	23.0 µl
Primer Pri-NMix	0.5 µl
Primer AAL-CP1	0.5 µl
dNTP-Mix	25.0 µl
Template DNA	1.0 µl
Total	50.0 µl

4. サザンハイブリダイゼーションによる目的 DNA 断片の検出

PCR プロダクトを 1% アガロースゲル電気泳動に供し、アルカリ変性、中和処理後、ナイロンメンブレン (Hybond-N+, Pharmacia 社製) に転写し、120°C で 30 分間ベークすることで塩基をメンブレンに固定した。2.オリゴヌクレオチド (プローブ) の 3'末端ラベルの方法でラベルしたプローブ 8 µl を標準ハイブリダイゼーション溶液 8 ml に加え、この溶液と固定したメンブレンをバッグに入れ、53°C で 90 分間ハイブリダイズした。メンブレンの洗浄、ブロッキングを行いプローブを固定した。これに抗体を加え、洗浄を行ってから基質 (100 倍希釈 CSPD) 500 µl にメンブレンを浸し、遮光して 5 分間発光させた。発光させたメンブレンをハイブリダイゼーションバッグに入れ、気泡が入らないようにポリシーラーでシールし、37°C で 10 分間インキュベートした後、X 線フィルムに 10 分間感光させた。

5. 目的断片の回収

1% アガロース電気泳動に供した PCR 産物からサザンハイブリダイゼーションで確認された位置のバンドをカッターで切り出し、GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて抽出した。

6. プラスミドベクターへのライゲーションと形質転換

TA Cloning Kit を使い、プロトコールに従いプラスミドベクター (pCR™ 2.1) へのライゲーションを行った。ライゲーションのライゲーション反応液の組成は以下の通りであった。

PCR products	1.0 µl
pCR™ 2.1	1.5 µl
10 x buffer	1.0 µl
T4 DNA ligase	1.0 µl
H ₂ O	5.5 µl
Total	10.0 µl

この反応液を 14°C で一晩インキュベートした。目的断片をライゲーションしたプラスミドを One Shot™ コンピテントセル (INVαF⁺) のプロトコールに従って形質転換した。X-Gal によるカラーセレクションを行い、ホワイトコロニー 4 株 (ブルーコロニーは 57 株) を得た。得られたホワイトコロニーが少なかったため、コロニーハイブリダイゼーションを行わず、それらの形質転換体からプラスミドを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った。

7. 目的断片を含むプラスミドの抽出とサザンハイブリダイゼーション

プラスミドの抽出には GFX micro Plasmid Prep Kit を用いた。トランスフォーメーションにより得られたホワイトコロニー 4 株についてプラスミドを抽出し、EcoRI で消化し、アガロース電気泳動後 4.サザンハイブリダイゼーションによる目的 DNA 断片の検出と同様にして目的断片の確認を行った。

8. DNA のシーケンシング

DNA のシーケンシングは DNA シーケンサー ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いてダイターミネーター法で行った。DNA のシーケンシン

グに供する試料は以下の組成で混合し、PCR 反応を行った。

Template DNA	3.0 μ l
Premix	4.0 μ l
Primer	4.0 μ l
H ₂ O	9.0 μ l
Total	20.0 μ l

これらをプライマーの Forward と Reverse で 1 試料につき 2 種類ずつ調製し、PCR 反応 (変性、96°C で 10 秒 ; アニーリング、50°C で 5 秒 ; 伸長反応、60°C で 4 分間) は 25 サイクル行った。このようにして得た PCR 産物を DNA シーケンサーに供した。

結果および考察

1. PCR 増幅断片の解析

Pseudoalteromonas sp. No. 272 株から抽出した染色体 DNA を鋳型とし、プライマー PriN-Mix と AAL-CP1 を用いて PCR による増幅を行い、得られた PCR 増幅断片を 1% アガロースゲル電気泳動に供した。アルカリ処理を行ってできた 1 本鎖 DNA をナイロンメンブレンに転写し、プローブ AAL-pro2 を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。それらの結果を Fig. 13 (A, B) に示す。得られた PCR 増幅断片のサイズは、約 700 bp と推定された。また、サザンハイブリダイゼーションの結果からこの PCR 産物には、*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来アルギン酸リアーゼの遺伝子の一部が含まれていると推定された。次に、TA Cloning Kit を用いてこの PCR 増幅断片 (700 bp) をプラスミドベクター pCR2.1 に挿入し、目的断片を含んだプラスミドを One Shot™ コンピテントセル (INVαF) に形質転換し、クローニングを行った。同時に、形質転換体のスクリーニングを行うために X-Gal によるカラーセレクションを行い、ブルーコロニーを 57 株、ホワイトコロニー (プラスミドベクター中にある種の遺伝子を取り込まれた菌株) を 4 株得た。

得られた形質転換体が 4 株と少なかったため、コロニーハイブリダイゼーションを行わず、菌体よりプラスミド DNA を抽出し、制限酵素 *EcoRI* で消化し、ゲル電気泳動に供し、先程と同様にサザンハイブリダイゼーションを行った。それらの結果を Fig. 13 (C, D) に示す。ベクターの位置にも発光が見られたが、4 株のホワイトコロニーから得た PCR 断片全てにアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子の一部が含まれていることが明らかとなった。

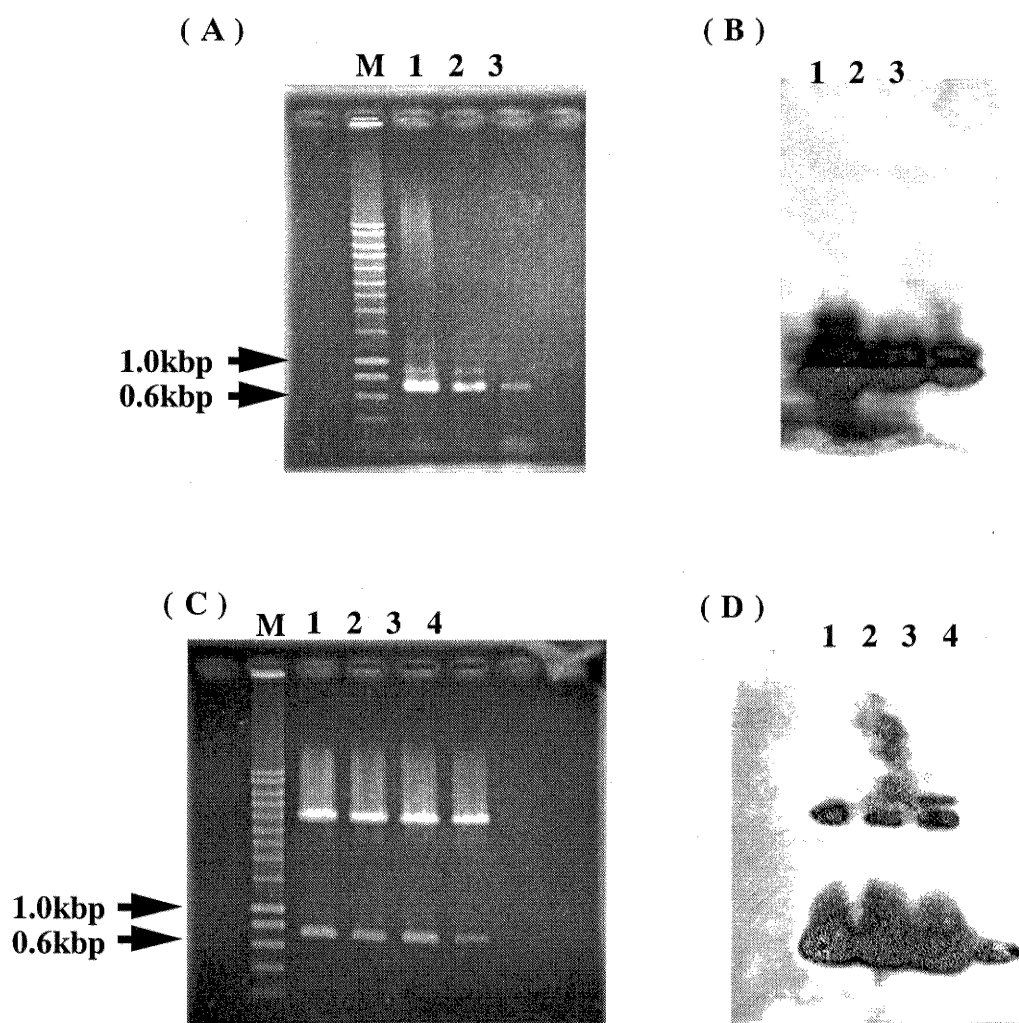


Fig. 13. Agarose Gel Electrophoresis (A and C) and Southern Analysis (B and D) of PCR Products (A and B) and *EcoRI*-digested Plasmid DNA (C and D).

(A) Lane M, marker; Lane 1, PCR products (template DNA:1 ml); Lane 2, PCR products (template DNA:0.1 ml); Lane 3, PCR products (template DNA:0.01 ml). (C) Lane 1~4, white colony's number.

2. アルギン酸リアーゼの全一次構造解析

この形質転換体の保持するプラスミドを DNA シーケンサーに供し、塩基配列の決定を行った。その結果、本酵素の N 末端から C 末端のアミノ酸まで解読することが出来た。しかし、ミックスプライマーを用いたためプライマー部分の塩基配列は、正しく増幅されていない可能性が高い。実際に、第 1 節 タンパク質化学的手法による一次構造解析で求めた N 末端側アミノ酸配列と C 末端側アミノ酸配列にはいくつか違いが見られた。N 末端から 3 番目、227 番目、230 番目のアミノ酸は PCR では W、T、S であったが、タンパク質化学的手法によるとそれぞれ、S、S、R であった。その他の配列は、タンパク質化学的手法と完全に一致した。よって、一次構造の解析は、タンパク質化学的手法により求めた部分アミノ酸配列との比較により行った。結果を Fig. 14 に示す。

Pseudoalteromonas sp. No. 272 株が産生するアルギン酸リアーゼは、233 アミノ酸残基から構成されており、分子量 25549.5 であった。アミノ酸組成分析で求めることの出来なかったトリプトファン残基は、N 末端から 51 番目に 1 個存在することが分かった。システイン残基は、N 末端から 198、210 番目に 2 個存在しこれらがジスルフィド結合していることは過ギ酸酸化したタンパク質のアミノ酸分析から確認済みである。全体の各アミノ酸の含有率は、アミノ酸組成分析の結果とほぼ一致した。酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (アスパラギン) やグルタミン酸 (グルタミン) が多数占めており、本酵素が非常に強い酸性タンパク質であることが一次構造の結果からも説明できた。疎水性のアミノ酸である P、M、W が少ないことも本酵素の特徴と言えるであろう。

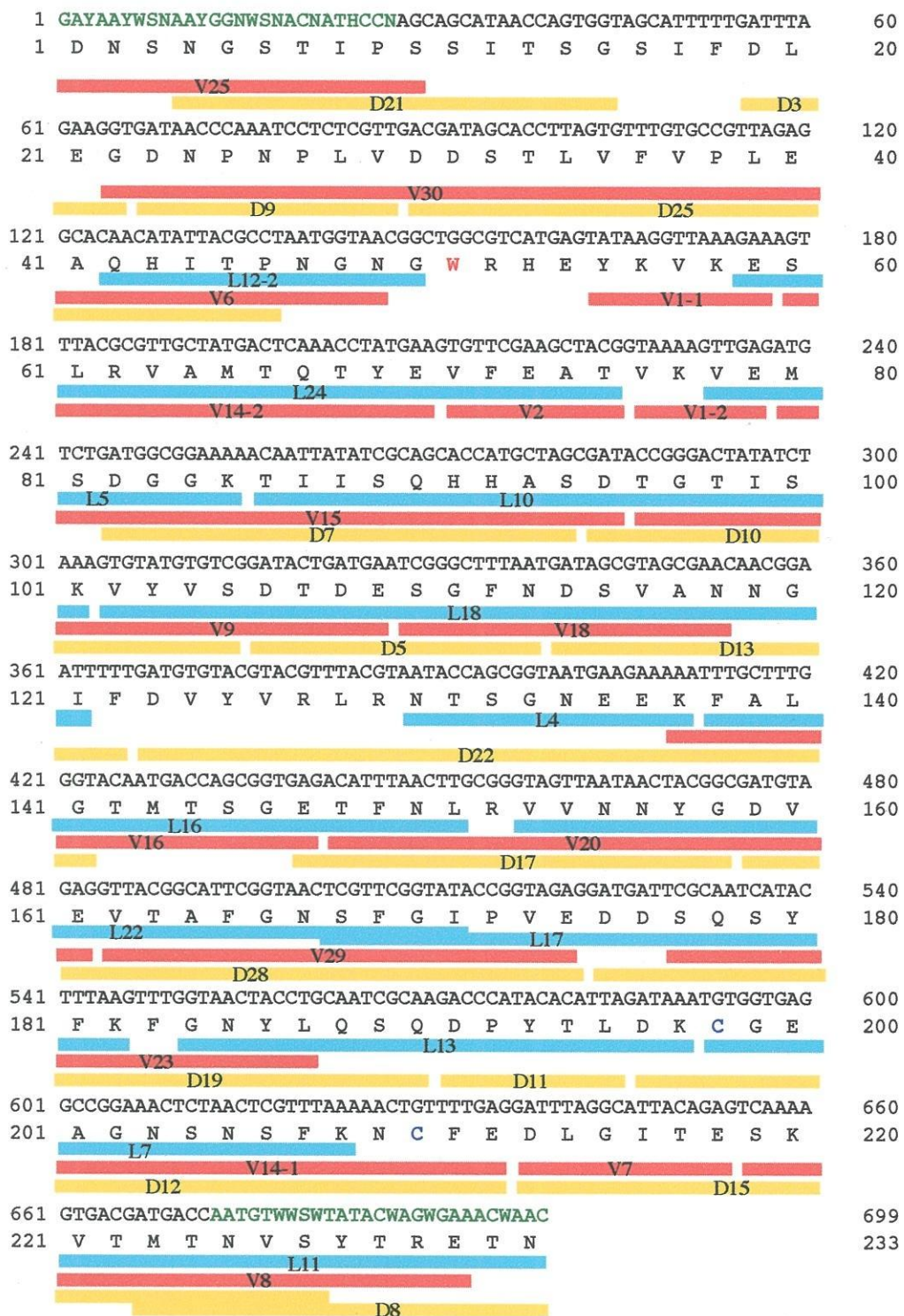


Fig. 14. Nucleotide and Amino Acid Sequence of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The nucleotide and amino acid sequence numbers are given on the right. Blue (lysylendopeptidase), red (V8 protease) and yellow (endoproteinase Asp-N) bars indicate peptide regions where amino acid sequence were determined by protein sequencer, respectively. Green characters show nucleotide sequences as 5' and 3' terminal primers.

第3節 他起源由来アルギン酸リアーゼとの一次構造の比較

本酵素のアミノ酸配列と他起源由来の全一次構造のホモロジーを解析ソフト DANASIS を用いて行った。その結果を Fig. 15 に示す。ホモロジー検索の対象となった酵素は、本酵素、同じく PG、PM の両基質に活性を有する *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594⁶⁴⁾ 由来酵素、*Vibrio* sp. 由来 PG Lyase⁵²⁾、*Corynebacterium* sp. ALY-1 株由来 PG Lyase⁵⁴⁾、*Klebsiella pneumoniae* subsp. 由来 PG Lyase⁸⁹⁾、サザエ中腸腺由来 PM Lyase⁴³⁾ の 6 種類であった。

PG、PM の両基質に活性を有する酵素間では、80.3% の高い相同性が見出されたが、酵素源が同属の細菌であり、同じ基質特異性を有する酵素を菌体外に産生することによるものと考えられる。その他の酵素については、*Vibrio* sp. で 4.2%、*Corynebacterium* sp. で 5.3%、*Klebsiella pneumoniae* subsp. で 4.2%、サザエ SP2 で 3.8% であった。これらの酵素間との相同性は非常に低かったが、タンパク質はある特有の立体構造をとってはじめて活性を有する酵素となる。それゆえ、ある立体構造をとった場合の活性中心周辺のアミノ酸残基の位置づけが重要である。アルギン酸リアーゼの場合、このことが強く言えると思われる。つまり一次構造においては異なるものの、三次元配置は相互に類似していることが推定される。

6 種類を通して非常に低い相同性を示したが、コンセンサスシーケンスが C 末端側に存在する。Fig. 15 に赤で記してある YFK (180-182) である。また、真核生物であるサザエを除いた原核生物のみで比較すると、YFKhG+Y-Q (180-188)⁹⁰⁾ が共通の配列となる(h は疎水性アミノ酸、+ は中性アミノ酸)。第 4 章で詳しく述べるが、これまで報告されているアルギン酸リアーゼの化学修飾による活性に関与すると思われるアミノ酸として、チロシンやリジンが挙げられる。このコンセンサスシーケンスにもこれらのアミノ酸は含まれていることからこの赤で示した領域のアミノ酸残基の活性への関与が強く示唆される。

<i>P. sp. No.272</i>	1	-DNSNGSTIP	SSITS-----	GSIFDLE--	GDNPNPL-	VD--DSTL-V	50
<i>P. ely. IAM 14594</i>	1	GDTGSGSGIA	SNITN-----	GSIFDLE--	GNNPHPL-	VN--SNTL-E	50
<i>vibrio sp.</i>	1	-G-----SN	DWDISDWKLT	IPASKDTWYG	SGGDSAAELE	PERCESKDL	50
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	-AEPCDYPAQ	QLDLTDWKT	LPI-----G	SSGKPSIEIQ	PAL-----	50
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	1	-AVPA--PGD	KFELSGWSLS	VPVDS-----	NDGKADQIKE	KTL-----	50
<i>Turbo cornutus</i>	1	-TLLWTHKEF	DPNNYRDGMH	ALTSNDYDH-	GS-G--K	VVT--DPD--G	50
<i>P. sp.No.272</i>	51	FVPLEAQHIT	PNGNGW----	RHEYKVKE	SIRVAMTQTY	-----EVFE	100
<i>P. ely. IAM 14594</i>	51	FVPLEARHIT	PNGNGW----	RHEYKVKE	SARAAMTETY	-----EVFE	100
<i>vibrio sp.</i>	51	LANDSDVYDS	DIGLSYFNTD	E--GRMHFRA	DMGYGTSTQN	SNYIRSELRE	100
<i>Corynebacterium sp.</i>	51	-----DTFAT	A---PWFQVN	AKCTGVQFRA	AVN-GVTTSG	SGYPRSELRE	100
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	51	-----AAGYRN	S-----DFFTLS	DA-GGMVFKA	PISGARTSKN	TTYTRSELRE	100
<i>Turbo cornutus</i>	51	GSNHVLRVWY	EKRWSSH--	GPNEGVOQFF	ATPTQDHSV	TFSYD--L-Y	100
<i>P. sp. No.272</i>	101	ATVK--VEMS	DGKTIISQH	HAS--DTGTI	SKVYVSDTDE	SGFNDSVANN	150
<i>P. ely. IAM 14594</i>	101	ATVK--VEMS	DGKTIISQH	HAS--DTGTI	SKVYVSDTDE	SGFDDSVAGN	150
<i>vibrio sp.</i>	101	LYQSSQTQDC	STSDSDTSWY	LN-----DT	RTNKTNHQLT	ATLRVEDYPN	150
<i>Corynebacterium sp.</i>	101	NTDGG-----	---EEKASW-	-----	SATSGTHT	MVFR-EAFNH	150
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	101	MLRKGDTZIA	TQGVSRNNWV	LSSAPLSEQK	KAGGVDGTFE	ATLSVDHVTT	150
<i>Turbo cornutus</i>	101	--LSHDFDFR	RGGKLPGLYG	GWT--NCSGG	RHSDNCF-S-	T---RFMWRK	150
<i>P. sp. No.272</i>	151	GIFDV-YVRL	RNTSGNEEF	ALGT-----	MTSGETFNLR	VVN----NYG	200
<i>P. ely. IAM 14594</i>	151	GIFDV-YVRL	RNTSGKEEKH	ALGT-----	IRSGGSFNLK	VVN----NYG	200
<i>vibrio sp.</i>	151	-I--NNQDPKV	VLQIHWKI	NQAL--VKLL	WEGESKPVRV	ILNSDFERNN	200
<i>Corynebacterium sp.</i>	151	--LPEVKPHL	VGAQIHDGDD	DVT--VFRL-	-EGTSL--YI	TKGDDTHHKL	200
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	151	TGVNWQVGRV	IIGQIHANN	EPYRKYRKL	PHHQKGSVYF	A-----HEPR	200
<i>Turbo cornutus</i>	151	DGDGEVYAYI	PDYHHQVSGE	C-DHNVCNS-	---VKGYSLG	RGKWKFE-RG	200
<i>P. sp. No.272</i>	201	DVEVTAFGNS	----FGIPVE	DDSQS-----	-----	-----	250
<i>P. ely. IAM 14594</i>	201	DVDVTALGTT	----FGIPVE	DDSES-----	-----	-----	250
<i>vibrio sp.</i>	201	QDCNHCDFPS	VELGTYSASE	EWRYTIRAN-	QNGVYLA---	THDLGDTNTV	250
<i>Corynebacterium sp.</i>	201	VT---DSYK	LN-TVFE--	--KFVVS--G-	KIKVY-----	-----	250
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	201	KGFGDEQWYE	M-IGTLQPSH	GNQTAAPTEP	EAGIALGETF	SYRIDATGNK	250
<i>Turbo cornutus</i>	201	KWQN-IAQHV	HLNTPGKTG	SIKVVHNGKL	VYTIDQLNIV	SKAS-VDIDG	250
<i>P. sp. No.272</i>	251	-----	-----	-----	YFKFGNYLQ	-----SQDF	300
<i>P. ely. IAM 14594</i>	251	-----	-----	-----	YFKFGNYLQ	-----SQDF	300
<i>vibrio sp.</i>	251	SHLIPWQDY	TDKDGDTVSL	TSDWTSTDA	FYFKAGIYPO	FK--PDSYI	300
<i>Corynebacterium sp.</i>	251	-----Y	NGVLQTTISH	TSS-----G	NYFKAGAYTO	ANCSNSPCS	300
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	251	LTVTLMREGR	PDVVKTVDMS	KSGYSEAGQY	LYFKAGVYNO	NKTGKPEDD--	300
<i>Turbo cornutus</i>	251	IFFSTFFGGS	DSSWAPTHDC	YS-----	YFKNFALST	DSSHPTIL..	300
<i>P. sp. No.272</i>	301	YTLKCGEAG	NSNSFKNCFE	DLGITESKVT	MTNVSYTRET	N.....	350
<i>P. ely. IAM 14594</i>	301	YTLDECGESG	NSDSFKKCFK	DLGITKAKVT	MTDVSYTRRT	N.....	350
<i>vibrio sp.</i>	301	GEVF-DVSFS	SLRAEHY...	350
<i>Corynebacterium sp.</i>	301	S---SN---	YGQVSLYKLO	VTHS.....	350
<i>K.pneumoniae subsp.</i>	301	YVQATFYRLK	ATHGAQR...	350
<i>Turbo cornutus</i>	301	350

Fig. 15. Comparison of Amino Acid Sequences of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 with Selected Alginate Lyases.

P. sp. No. 272 and *P. ely. IAM 14594* are *Pseudoalteromonas* sp. strain No. 272 and *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594, respectively. Red boxes indicate homologous amino acid residues to *P. sp. No. 272*. Yellow boxes indicate homologous amino acid residues except *P. sp. No. 272*.

第4節 円偏光二色性(CD)による二次構造解析

実験方法

1. CD スペクトル測定

ネイティブなアルギン酸リアーゼの二次構造を調べる為に、本酵素の CD スペクトル測定を行った。測定法は、第2章第2節5.基質特異性と同様に行った。遠紫外領域 (190~260 nm) の測定には、0.12 mg/ml の酵素を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 200 μ l について 1 mm のセルを用いて測定した。近紫外領域 (250~320 nm) の測定には、0.49 mg/ml の酵素を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml について 10 mm のセルを用いて測定した。結果は、4 回測定した平均をスペクトルとして示した。平均残基分子量は、108.9 を用い、平均楕円率は、第2章第2節5.基質特異性と同様に求めた。

結果および考察

1. CD スペクトル

測定結果を Fig. 16 に示す。遠紫外領域 (A) を見ると、215 nm 付近に谷を持つ典型的な β -構造を示した。これまでに CD スペクトルで測定し、報告されている他起源由来アルギン酸リアーゼと同様の結果であった (*Sphingomonas* sp. A1-III⁶⁶を除く)。芳香族アミノ酸残基の存在環境を示す近紫外領域 (B) を見ると、他のアルギン酸リアーゼには見られない、本酵素特有のパターンを示した。この近紫外領域の CD スペクトルは酵素源によって異なっていることがわかっている。以上の考察から、大多数のアルギン酸リアーゼはコアとして、 β -構造があり、それを取り巻く立体的な分子環境が酵素源によって異なっているものと思われる。

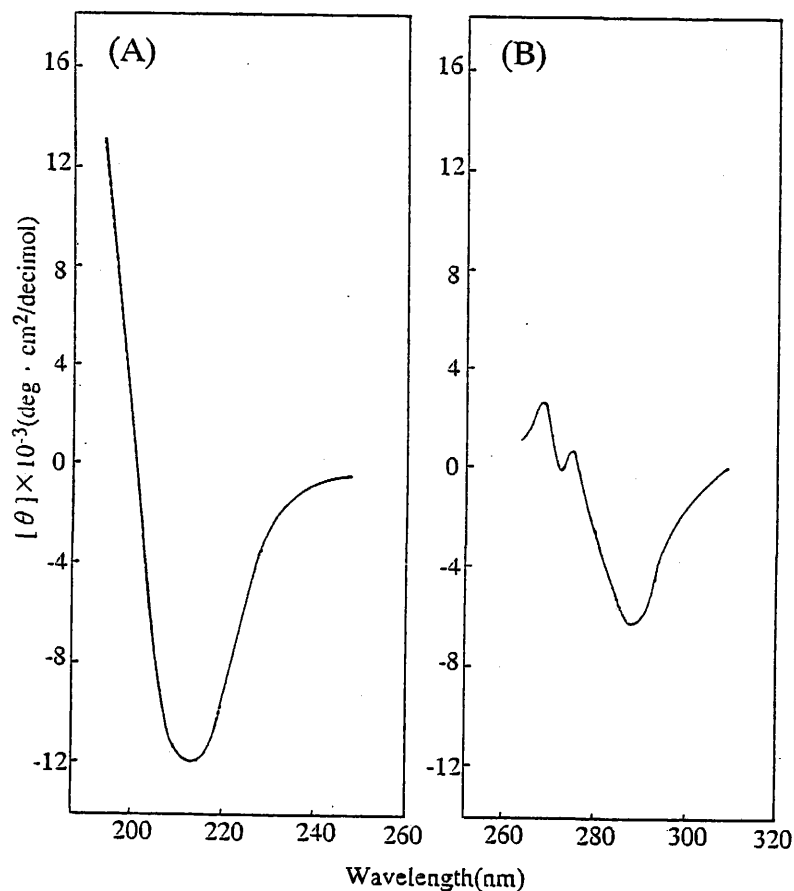


Fig. 16. CD Spectra of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The protein concentration was 0.12 mg/ml and 0.49 mg/ml in 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) in far-ultraviolet region (A) and near-ultraviolet region (B), respectively.

第 5 節 酵素タンパク質の結晶化による三次元構造解析

実験方法

精製したアルギン酸リアーゼをマイクロバッチ法にて結晶化を行った。沈殿剤は 0.1 M クエン酸ナトリウム、17.5% トレハロース、30% PEG 8000、0.1 M MgSO_4 、pH 5.5 を用い、4°C で行った。位相決定は、 K_2PtCl_4 を用いて重原子同形置換法にて行い、これにより得られた結晶の回折データを用いた。モデルの精密化は、プログラム CNS を用いた。結晶構造解析に用いたソフトは、MOLSCRIPT⁹¹⁾ であった。

結果および考察

沈殿剤として 0.1 M クエン酸ナトリウム、17.5% トレハロース、30% PEG 8000、0.1 M MgSO₄、pH 5.5 を用い、4°C でマイクロバッチ法にて結晶化を行った結果、棒状の結晶が得られた。格子定数は、 $a=b=46.2 \text{ \AA}$ $c=387.2 \text{ \AA}$ $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$ 、六方晶系 (hexagonal) の単結晶で、空間群は $P6_122$ 非対称単位中に本酵素分子が 1 分子であった。本酵素の結晶を Fig. 17 に示す。プログラム CNS を用いて位相決定及び精密化を解析したところ、分解能 2 \AA で $R\text{-factor}=19.4\%$ $R_{\text{free}}\text{-factor}=24.8\%$ であり、かなり信頼度の高い解析像が得られた。本酵素を構成する 233 アミノ酸残基のうち、N 末端の 5 残基を除くアミノ酸残基に関して立体配位を構築し、全体の構造を三方向から見たリボンモデルを Fig. 18 に、ワイヤーモデルを Fig. 19 に、二次構造のトポロジー図を Fig. 20 に示す。酵素分子中に硫酸イオン 1 つとカルシウムイオン 1 つ、水分子約 300 が見られた。本酵素は、第 4 節 円偏光二色性 (CD) による二次構造解析での結果と同様、主に β -構造をしていた。本解析によると、二次構造は 3_{10} -helix が 4 つ、 α -helix が 1 つ、 β -strand が 14 本から構成されており、二次構造を構成しているアミノ酸の 87% が β -構造であった。この β -構造は 2 層からなり、活性クレフトを形成していた。このクレフト内は、疎水性のアミノ酸残基が多く配置していた。第 3 節 他起源由来アルギン酸リアーゼとの一次構造の比較で記述したように、本酵素の C 末端側にある活性発現へ関与すると考えられるコンセンサスシーケンス中の Tyr 180、Phe 181、Lys 182 は、Fig. 18 中の赤で示したクレフト内にいずれも存在し、Tyr 180 と Lys 182 の側鎖はともにクレフト側を向いていた。ゆえに、この両アミノ酸残基が活性発現に深く関与していることが示唆された。また、本酵素分子中に一つしか存在せず、活性に深く関与すると考えられる Trp 51 は、第 4 章で明らかとするが、 β -構造の一部を形成していた。Fig. 21 に S-S 結合を表示したりボン構造を示す。Cys 198、Cys 210 によって形成される S-S 結合は、ループと α -helix (残基数 204-213) を連結しており、 α -helix の構造の安定化に深く寄与していると思われる。カルシウムイオンは Asp 106 と Asp 114 との間に等間隔で配位しており、クレフト溝のフタを形成

するようになっていた。EDTA (第 2 章 第 2 節) による処理で活性の低下が見られなかったことからこのカルシウムイオンは酵素分子中に強固に結合し、酵素そのものの立体構造を保つのに役立っていると考えられる。今回得られた立体構造はこれまでに報告されてない新規な構造である可能性が高い。



Fig. 17. Hexagonal Crystal of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

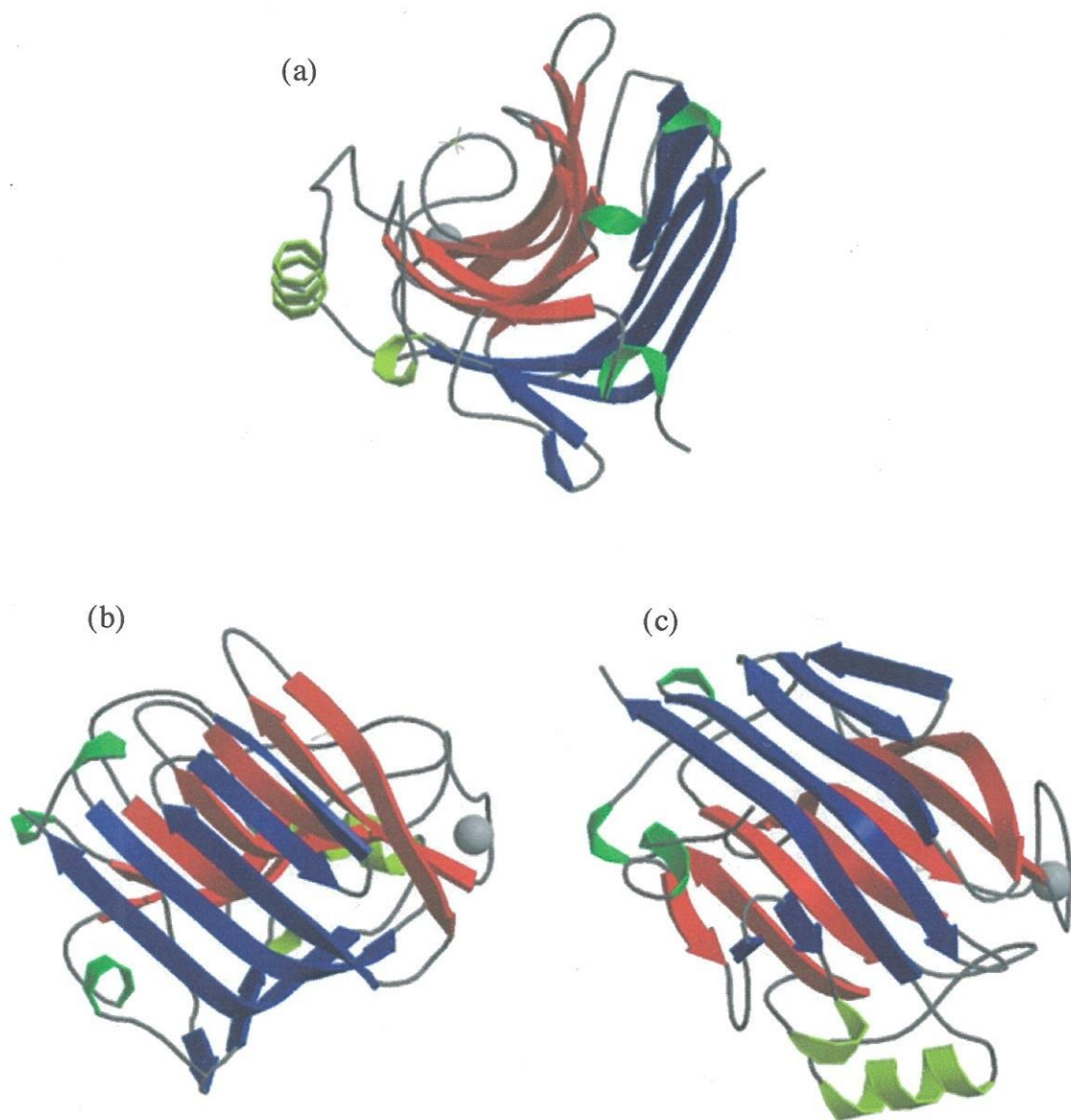


Fig. 18. Ribbon Presentation of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

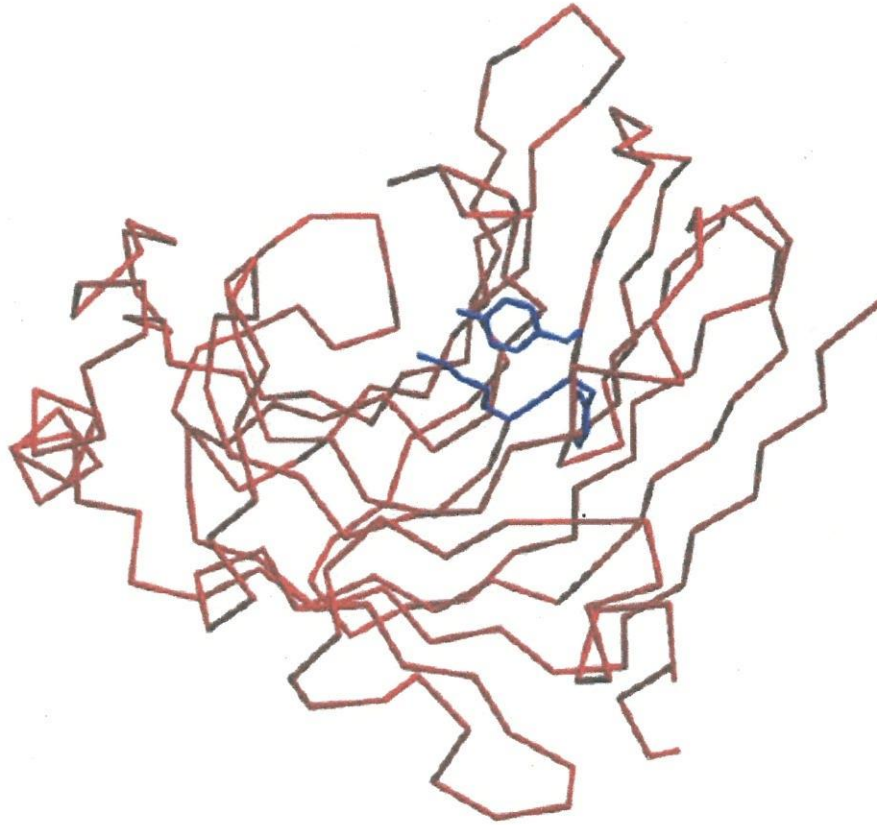


Fig. 19. Wire Model of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

Blue represents Tyr 180 and Lys 182 in a consensus sequence.

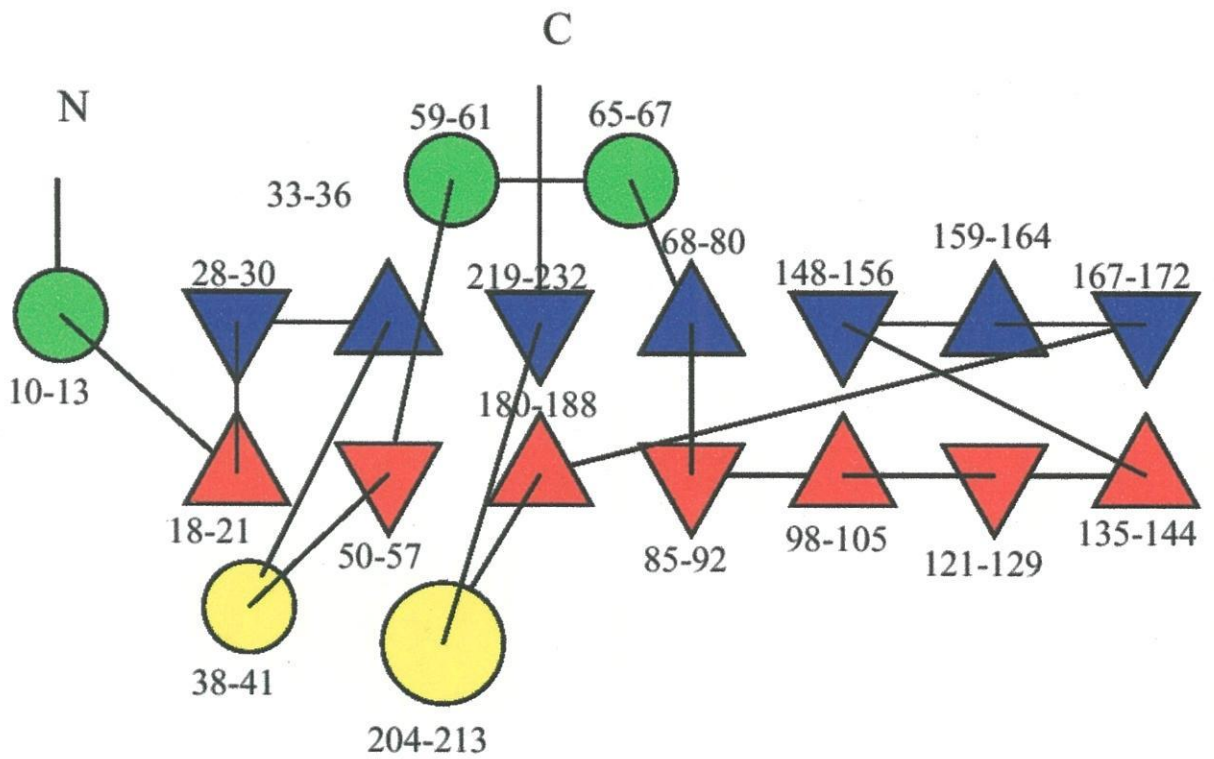


Fig. 20 Topology Map of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

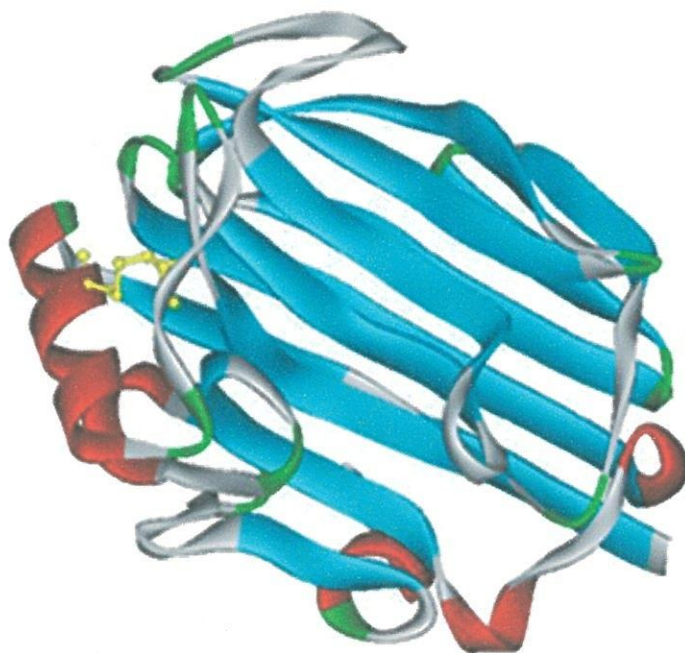


Fig. 21. S-S Bond Location of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

S-S bond is presented by yellow.