

## 第4章 酵素の活性中心に関する知見

### 緒言

第3章までに *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株が菌体外に産生するアルギン酸リアーゼの諸性質、構造などを明らかとした。次に、本酵素がいかに両基質に活性を有するかを調べることを目的として活性中心に関する知見を得るための種々の実験を行った。

第1節では、酵素タンパク質を種々の化学試薬で修飾し、活性に関与するアミノ酸残基の同定を行い、その数を理論的に導き出す。第2節では、アルギン酸オリゴマーを調製し、それらオリゴマーを用いて、反応速度論的解析により本酵素の反応性、サブサイト構造について検討している。第3節では、活性中心に対して両基質がどのように作用するのか、基質であるアルギン酸のエステル化合物であるアルギン酸プロピレングリコールを用いた場合の活性発現について調べている。また、本酵素分子中に一つのみ存在するトリプトファン残基の固有の自然蛍光に基づく酵素と基質の相互作用について Stern-Volmer の関係式より調べている。

## 第 1 節 タンパク質の化学修飾

### 緒言

タンパク質は、それぞれ固有のアミノ酸配列、分子量およびアミノ酸配列で規定される立体構造をもち、酵素タンパク質であれば、生体触媒としての反応特異性および基質特異性を示す。酵素タンパク質を特定の化学試薬で修飾し、その前後での活性の変化を調べることで活性に関与するアミノ酸残基の推定ができる。しかし、タンパク質の化学修飾では、原則として特定の官能基に対する選択的な修飾反応が大切であり、修飾の目的に合うように試薬を選び、反応条件を設定して行わねばならない。これまでにアルギン酸リアーゼの化学修飾による活性アミノ酸残基の推定報告は少ない。Muramatsu and Egawa によってサザエ中腸腺由来の PM Lyase について化学修飾を行ったところ、システイン残基、トリプトファン残基、リジン残基がそれぞれ 1 個ずつ活性に関与していると報告している<sup>41)</sup>。Takeshita *et al.* によって *Vibrio sp.* の PG Lyase の化学修飾を行ったところ、リジン残基、ヒスチジン残基、アルギニン残基、メチオニン残基が活性発現に関与していることが分かっている<sup>49)</sup>。Matsubara *et al.* によって *Corynebacterium sp.* の化学修飾を行ったところ、トリプトファン残基、リジン残基、ヒスチジン残基が活性に関与していることが示唆されている<sup>55)</sup>。Hicks and Gacesa によって *Klebsiella pneumoniae* 由来 PG Lyase は、トリプトファン残基、リジン残基が活性に関与していると報告している<sup>92)</sup>。また、Shimokawa *et al.* は、*Dendryphiella salina* IFO 32139 由来 PM Lyase もトリプトファン残基が活性に関与しているとしている<sup>93)</sup>。これまでの報告から、アルギン酸リアーゼの活性発現には、共通のアミノ酸残基が関与していると考えられるが、本酵素は PG、PM の両基質に活性を有する酵素であり、これまでの酵素とは違った特徴が見出される可能性が存在する。そこで本研究は、特定アミノ酸側鎖の化学修飾による活性への影響を調べ、活性発現に関与すると思われるアミノ酸残基を推定した。

## 実験材料

N-bromosuccinimide、5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)、Phenylmethylsulfonyl fluoride、2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid は、和光純薬社製より購入した。p-Chloromercury benzoate、Diethyl pyrocarbonate、Butane-2,3-dione はナカライテスク社製を用いた。Tetranitromethane は若丸化学工業製を、1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate、シグマ社製を使用した。

## 実験方法

### 1. 種々の化学修飾試薬の活性に及ぼす影響

本酵素のアミノ酸側鎖の化学修飾に用いた試薬は Table 10 の通りである。

**Table 10.** Reagents Used for Chemical Modification of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272

Amino acid	Chemical reagents	Abbreviation
Cys-SH	<i>p</i> -Chloromercury benzoate	PCMB
	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	DTNB
K	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid	TNBS
W	N-bromosuccinimide	NBS
S	Phenylmethylsulfonyl fluoride	PMSF
Y	Tetranitromethane	TNM
H	Diethyl pyrocarbonate	DEP
D (E)	1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho- <i>p</i> -toluenesulfonate	CMC
R	Butane-2,3-dione	BD

化学修飾反応は、Table 11 の条件で行った。

**Table 11.** Reaction Conditions for the Chemical Modification

Chemical reagent	Final conc. (mM)	Reaction buffer	Reaction time (min)	Temp. (°C)
PCMB	1	100 mM Phosphate buffer, pH 7.0	10	30
DTNB	1	100 mM Phosphate buffer, pH 7.0	10	30
TNBS	1	50 mM Borate buffer, pH 8.0	10	30
NBS	2	100 mM Citric acid buffer, pH 4.0	5	25
PMSF	5	100 mM Phosphate buffer, pH 7.0	10	30
TNM	5	50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0	10	25
DEP	10	100 mM Phosphate buffer, pH 7.0	5	25
CMC	20	50 mM Mes buffer, pH 6.0	10	30
BD	50	50 mM Borate buffer, pH 8.5	5	25

各修飾試薬 (45  $\mu$ l) と酵素 (1.91 mg/ml, 5  $\mu$ l) を混和し、Table 11 に示すような各反応温度と時間でインキュベートし、反応混液 20  $\mu$ l の 0.1% PG、PM 各基質溶液に対する残存活性を測定した。

## 2. リジン残基の TNBS による修飾

50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) に TNBS を溶解し、各濃度の試薬 (終濃度 0.1、0.2、0.3、0.5、0.8 mM) 45  $\mu$ l と本酵素 (0.11 mg/ml) 5  $\mu$ l とを反応させた。反応開始 30、45、60、75、90 分ごとにその混合液から 20  $\mu$ l ずつとり、0.1% PG、PM 両基質に対する活性を測定した。各濃度での時間毎の残存活性の対数をプロットし、擬一次反応速度定数を導き出した。その後、反応の半減期 ( $t_{0.5}$ ) の対数と TNBS の濃度の対数をグラフに表し、そのとき得られた直線の傾きが活性に関与するリジン残基の数になることより求めた (結果の項参照)。

## 3. チロシン残基の TNM による修飾

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に TNM を溶解し、各濃度の試薬 (終濃度 5、10、15、20、25 mM) と本酵素とを反応させ、その残存活性を 15、30、45、60、75、90 分ごとに測定した。なお酵素濃度、容量、活性に関与するチロシン残基の数の求め方は、前記 2. に従って行った。

#### 4. NBS、TNBS、CMC、TNM、BD 不活性化に対する基質の保護効果

本酵素と基質 (PG、PM) を混合し、酵素-基質複合体を形成させ、そこに NBS、TNBS、CMC、TNM、BD の各修飾試薬を加え、酵素分子を修飾し活性の推移を調べた。0.2% PG、PM 溶液 29.25  $\mu$ l、酵素溶液 (0.69 mg/ml) 6.5  $\mu$ l を加え、よく混合し、各修飾試薬 29.25  $\mu$ l を加え活性を測定した。修飾の条件を Table 12 にまとめた。コントロールとして基質を加えないとき、修飾試薬を加えないときの活性も測定し、結果はその残存活性で示した。

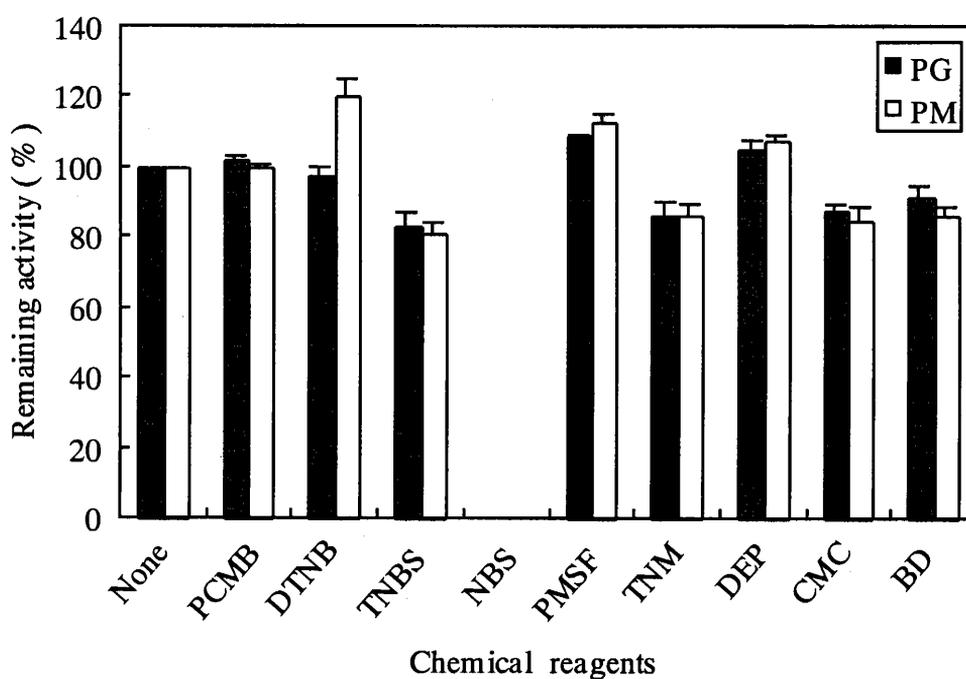
**Table 12.** Reaction Condition for Protection by Substrate

Reagent	Final conc. (mM)	Reaction buffer	Reaction time (min)	Temp. (°C)
NBS	2	100 mM Citric acid buffer, pH 4.0	5	25
TNBS	1	50 mM Borate buffer, pH 8.5	5	30
CMC	25	50 mM Mes buffer, pH 6.0	5	25
TNM	60	50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0	5	25
BD	50	50 mM Borate buffer, pH 8.5	5	25

## 結果および考察

### 1. 種々のアミノ酸側鎖化学修飾試薬の活性に及ぼす影響

本酵素を Table 11 に示した各試薬で修飾した時の残存活性を Fig. 22 に示す。何も試薬を加えていない時の活性を 100% とし、その相対活性で表した。トリプトファン残基を修飾する NBS では本酵素は完全に失活した。リジン残基を修飾する TNBS、チロシン残基を修飾する TNM、カルボキシル基を修飾する CMC、アルギニン残基を修飾する BD でも程度の差はあるものの、活性の低下が認められた。PG、PM 両基質間で活性低下には大きな差はなかった。トリプトファン残基の修飾は完全失活を起こすが、*Sphingomonas* sp. A1-III 由来菌体内アルギネートリアーゼ以外の同酵素でも活性に顕著に関わるアミノ酸残基として報告されている。リゾチームの触媒反応にみられるように、トリプトファン残基はインドール環と糖のピラノース環との相互作用 (水素結合や両環のスタッキング) により基質との結合に関与し、直接触媒作用を有するのではない。第 3 章で述べた通り、本酵素には 1 分子中 1 モルのトリプトファン残基が存在する。本酵素 233 アミノ酸残基中、51 番目のトリプトファンは X 線結晶構造解析よりクレフトの内側にある  $\beta$ -strand に位置し、酵素-基質結合部位に関与していることを強く示唆されるが、側鎖のインドール環は外方向に配位している。基質との結合により配位の方向が変化すると考えられるが、酵素-基質複合体の結晶構造解析が現在行われている。本酵素の活性に関与するアミノ酸残基は、他起源由来のアルギニン酸リアーゼとほぼ同じであった。しかし、カルボキシル基についてのデータがこれまでに報告されていないのでアスパラギン酸やグルタミン酸の関与については、初めての知見である。トリプトファン残基については、活性に関与するアミノ酸残基の数を特定することができるが、その他の活性が低下したものについては、酵素分子中に複数存在するため、数を理論的に導き出す必要があった。TNBS、TNM、CMC、BD で反応速度論的解析を行い、数の推定を行ったところ、CMC、BD は理論値を求めることが出来なかった。TNBS、TNM の結果のみを後述する。

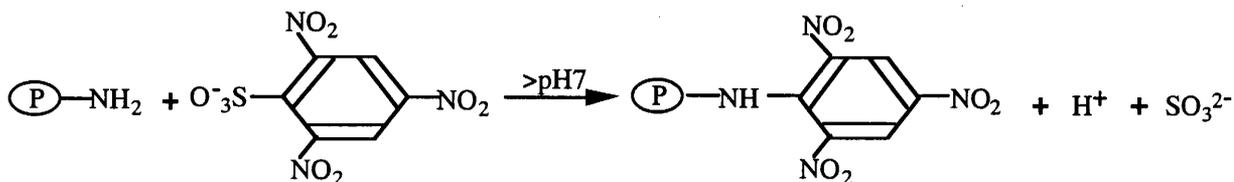


**Fig. 22.** Effect of Chemical Reagents on Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No.272.

This reaction was done under the condition in Table 11. The remaining activity after treatment with each reagent was assayed with PG and PM as substrates.

## 2. リジン残基の TNBS による修飾

TNBS はタンパク質中のアミノ基と反応し、アミノ酸の TNP (Trinitrophenyl-) 誘導体を生じる<sup>94)</sup>。



一般にアミノ基はタンパク質分子内の官能基のうちでも生理的条件下で正の電荷を担い、主として表面に露出している。正の電荷の為にタンパク質の水溶液中での安定性に寄与しており、また場合によっては酵素やインヒビターなどの活性発現部位として重要な役割を持っていることが知られている。このアミノ基は、反応性の高い残基であるので多くの修飾試薬を用いることができるが、特に TNBS は pH 8.0 でいかなる副産物を伴うことなくタンパク質のアミノ基と特異的に反応する。

ここで、活性発現に関するアミノ酸残基の数を導き出す方法について説明する。

酵素の修飾試薬による不活性化反応は (1) 式で表される。



ここで、E は酵素、I は修飾試薬、n は取り込まれた修飾試薬の数、EIn は不活性化した酵素-修飾試薬複合体、 $k_1$  は反応の二次速度定数である。不活性化速度は (2) 式で表される。

$$-d(\text{E})/dt = k_1(\text{E})(\text{I})^n \quad (2)$$

修飾反応は一般に、酵素濃度に対して試薬濃度は大過剰にあるので、(2) 式の反応二次速度定数と試薬濃度との関係は (3) 式のように表すことができる。

$$k_1(\text{I})^n = k_2 \quad (3)$$

ここで  $k_2$  は擬一次反応速度定数である。

ゆえに、(2) 式、(3) 式より (4) 式の様にまとめることができる。

$$-d(\text{E})/dt = k_2(\text{E}) \quad (4)$$

(4) 式を積分すると、

$$\text{Log}(\text{E}) = -(k_2/2.303)t + C \quad (5)$$

Log (E) を時間に対してプロットした時、直線関係が得られたならば、その反応は擬一次反応に従う。Fig. 23 (A) に示すように、本酵素の TNBS による不活性化もこの理論に従っていることがわかる。 $k_2$  は不活性化の半減期の逆数  $(t_{0.5})^{-1}$  で置き換えることができるので、(3) 式は次式のように表すことができる。

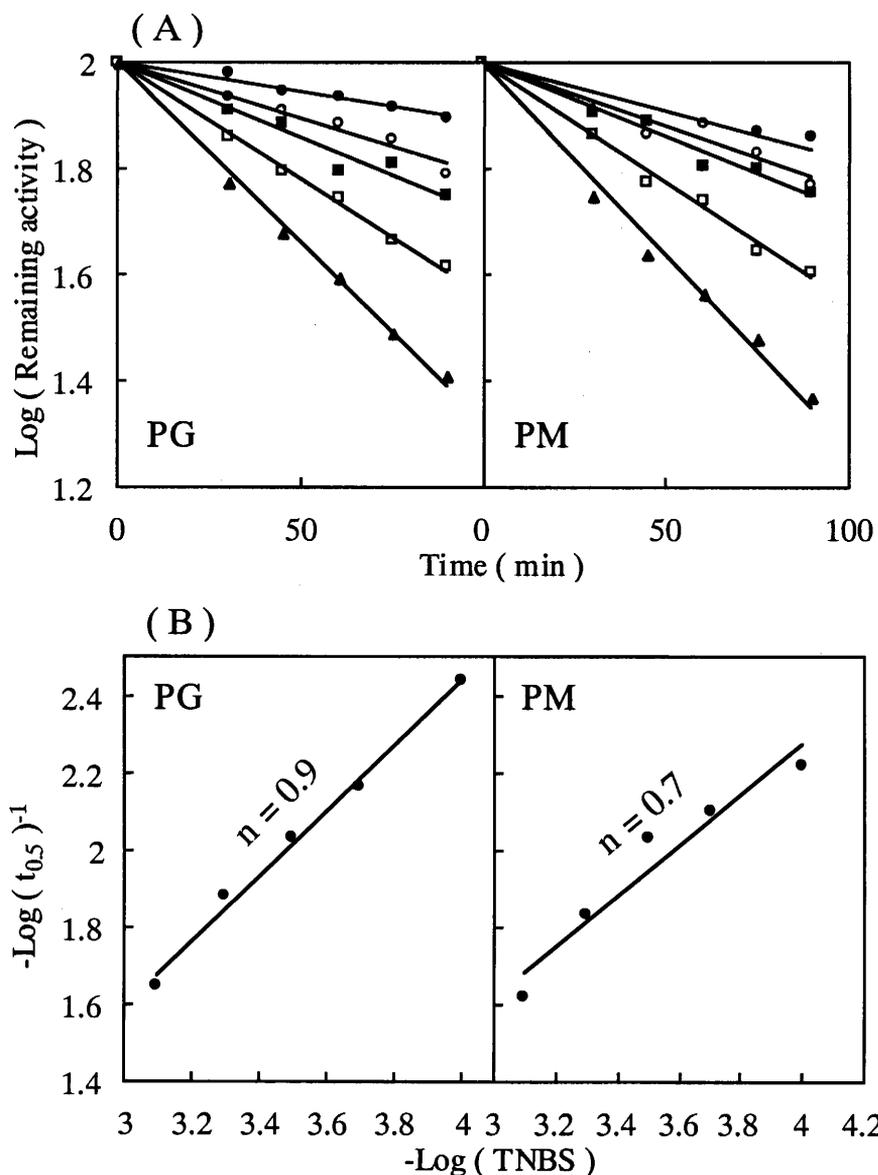
$$(t_{0.5})^{-1} = k_1 (I)^n \quad (6)$$

両辺の対数をとると (7) 式が得られる。

$$\text{Log } (t_{0.5})^{-1} = \text{Log } k_1 + n \text{Log } (I) \quad (7)$$

この式に従い、Log (I) に対して Log  $(t_{0.5})^{-1}$  をプロットして得られる直線の傾きは、酵素の活性部位に結合する修飾試薬分子の数  $n$  を表している。

これらのことに基づいて、TNBS と本酵素を pH 8.0 下で反応し、各反応時間で測定した残存活性を反応時間の関数としてプロットした。その結果が Fig. 23 (A) であり、TNBS 濃度の対数に対し、Fig. 23 (A) から得られた  $t_{0.5}$  の逆数をプロットしたものが Fig. 23 (B) である。グラフの傾きはそれぞれ、PG が 0.9、PM が 0.7 であった。よって、両基質に対して本酵素中の 1 個のリジン残基が関与していることが示唆された。第 3 章 第 5 節の結晶構造解析からも Lys 182 がクレフトの内側を向いており、この 1 個のリジン残基の修飾による失活が Lys 182 によるものかもしれない。

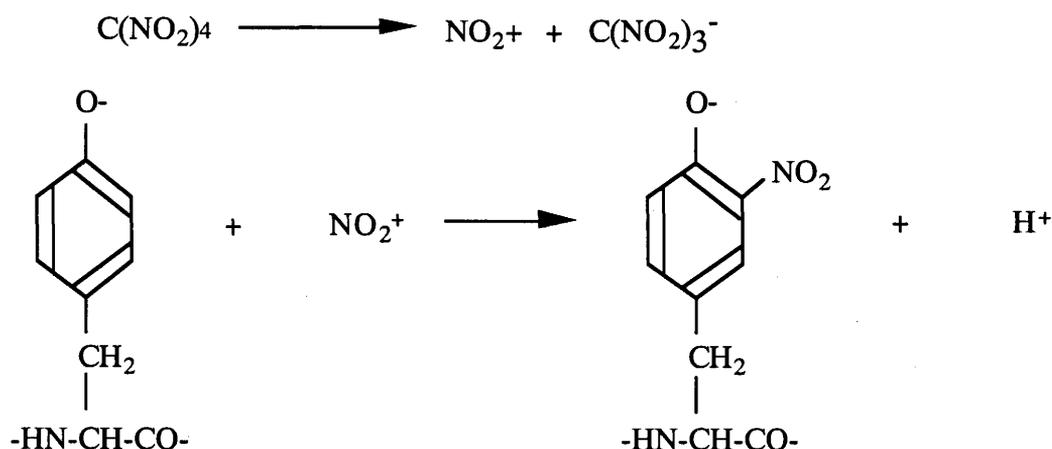


**Fig. 23.** Rate of Inactivation of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 with Various Concentrations of TNBS (A) and Determination of the Order of Enzyme Inactivation with Respect to TNBS (B).

The enzyme (0.6  $\mu\text{g}$ ) was incubated with TNBS (45  $\mu\text{l}$ ) of 0.1 (●), 0.2 (○), 0.3 (■), 0.5 (□), and 0.8 (▲) mM in final concentrations in 50 mM borate buffer (pH 8.0) at 28°C for time intervals shown in figure before assay. The remaining activity was assayed as described in Methods, using PG and PM as substrates.  $t_{0.5}$  represents the half-time of inactivation and is obtained from (A) and plotted according to equation (3) in the text.

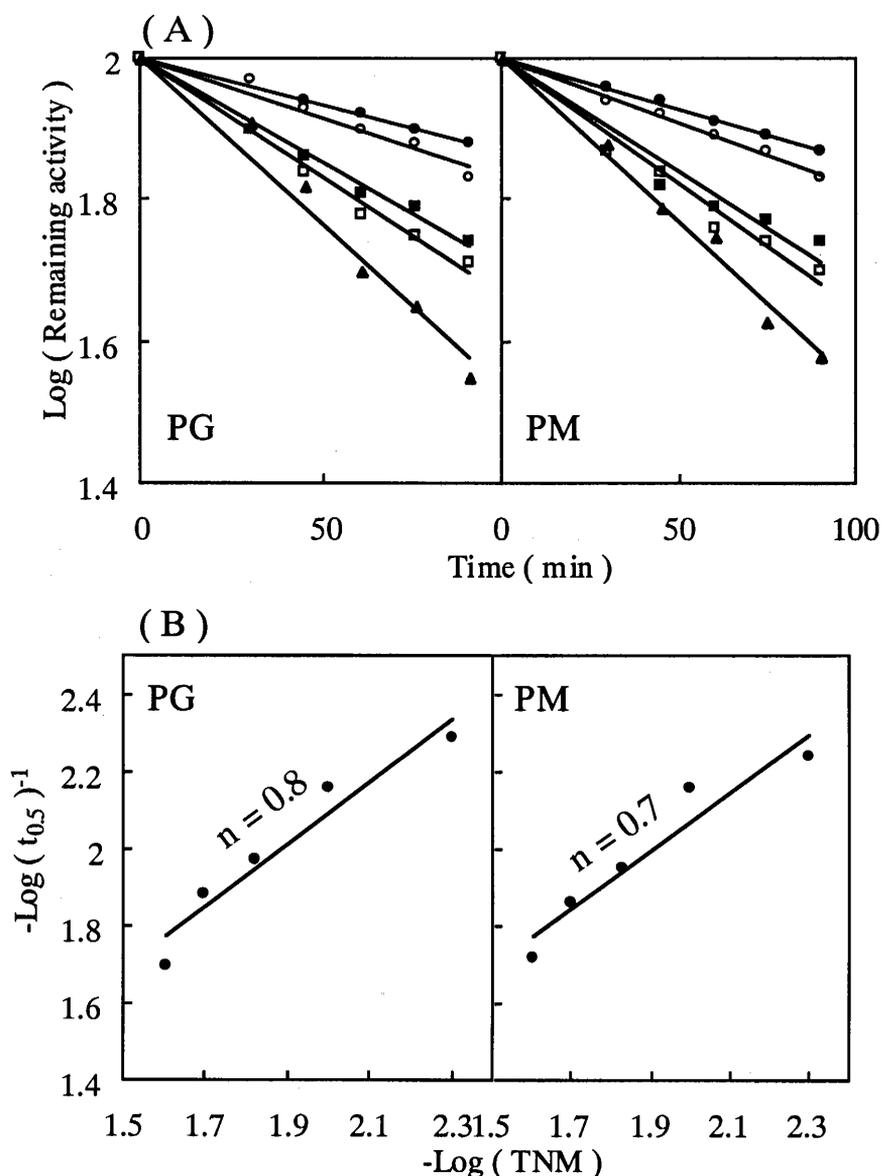
### 3. チロシン残基の TNM による修飾

TNM は、pH 8 という穏和な条件でタンパク質中のチロシン残基に作用し、チロシン水酸基のオルト位にニトロ化が起こり、3-ニトロチロシンを生成する。



2. リジン残基の TNBS による修飾と同様に、TNM と本酵素を pH 8.0 の条件下で反応させ、いろいろな反応時間で測定した残存活性を反応時間の関数としてプロットし、擬一次反応速度定数を導き出し、半減期 ( $t_{0.5}$ ) の対数と TNBS の濃度の対数の関係をプロットした結果をそれぞれ Fig. 24 (A)、(B) に示す。

グラフより、傾きはそれぞれ、PG が 0.8、PM が 0.7 であった。よって先程のリジン残基と同様、両基質に対して本酵素中の 1 個のチロシン残基が活性に関与していることが示唆された。第 3 章第 5 節の結晶構造解析からも、先程のリジン残基同様、Tyr 180 がクレフトの内側を向いていることが推測された。この位置のチロシン残基が活性に深く関与していることが、以上の結果からも考えられる。

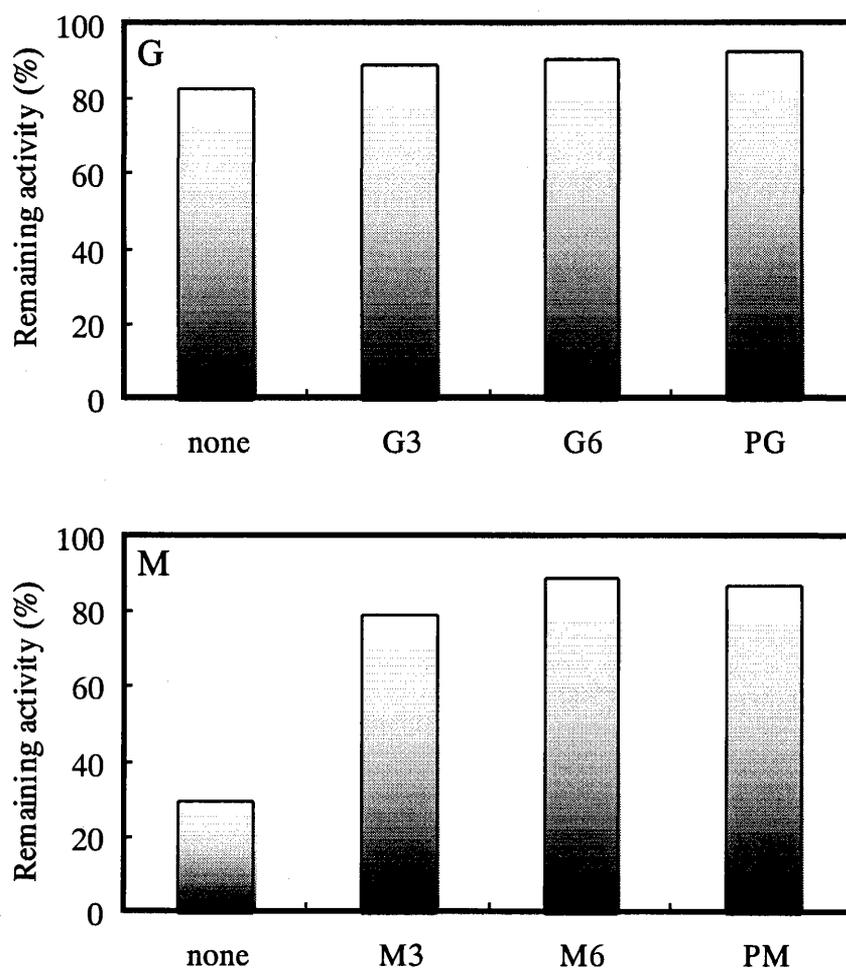


**Fig. 24.** Rate of Inactivation of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 with Various Concentrations of TNM (A) and Determination of the Order of Enzyme Inactivation with Respect to TNM (B).

The enzyme was incubated with TNM of 5 (●), 10 (○), 15 (■), 20 (□), and 25 (▲) mM in final concentrations in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 28°C for time intervals shown in figure before assay. The remaining activity was assayed as described in Methods, using PG and PM as substrates.  $t_{0.5}$  represents the half-time of inactivation and is obtained from (A) and plotted according to equation (3) in the text.

#### 4. NBS、TNBS、CMC、TNM、BD 不活性化に対する基質の保護効果

化学修飾試薬で修飾されたアミノ酸残基が活性発現に関与していれば、酵素と基質の共存下で、酵素基質複合体を予め形成させておくと、後に修飾試薬がアミノ酸残基と反応する場合反応を起こし難い (基質の保護効果)。Fig. 22 で示したように、本酵素活性が低下した試薬についてのみ各修飾試薬の不活性化に対する基質の保護効果を調べた。本酵素を PG 若しくは PM 存在下または非存在下で NBS (終濃度 2 mM)、TNBS (終濃度 1 mM)、CMC (終濃度 25 mM)、TNM (終濃度 60 mM)、BD (終濃度 50 mM) で処理した。しかし、PG、PM 存在下で保護効果が認められたのは、TNM のみであり、他の修飾試薬については認められなかった。このことは、単純に解釈すればトリプトファン残基、リジン残基、アスパラギン酸 (グルタミン酸) 残基、アルギニン残基が基質結合部位には直接関係していないことを示すものであるが、基質の分解に伴ってその保護効果が十分に得られなかったことも考えられる。TNM については 60 mM で処理した場合、PG よりも PM に対しての方が化学修飾試薬による活性の低下が大きかった。また、その際の基質の保護効果が PM の方が強かった (Fig. 25)。この点に関して詳細は分からないが、PG と PM では、活性に係わるチロシン残基が酵素分子中で異なるのかもしれない。若しくは、PG と PM は、立体構造が違う。つまり、PG はジグザグ構造、PM は直鎖構造をしており、同じ分子量、重合度でも分子の立体的な長さが違う。PM の方が立体的に見たとき酵素分子に巻きつきやすい構造をしていることより、見かけ上保護効果が大きいかもしれない。そこで、さらに低分子であるオリゴマーを用いて本酵素の基質の保護効果を調べた。トリマーとヘキサマーを用いた。G、M 共にポリマーと変わらない程度の結果が得られた (Fig.25)。よって、チロシン残基は、本酵素の活性中心またはそのごく近傍に存在して、酵素活性発現に深く寄与していると示唆された。一方、基質の保護効果が認められなかったものについては、本酵素の立体構造の維持に深く係わるものがあるのかもしれない。更なる解析を X 線結晶構造解析の基質アナログで明らかにしたい。



**Fig. 25.** Protection by Substrates against TNM-Inactivation of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The enzyme in 6.5  $\mu$ l of 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 and 29.25  $\mu$ l of substrate solution in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 were separately preincubated at 30°C for 10 min. After mixing the two solutions, 29.25  $\mu$ l of 60 mM TNM freshly prepared was added. The remaining activity was determined after incubation at 30°C for 5 min.

## 第 2 節 反応動力学的研究

### 緒言

酵素反応の大きな特徴は、基質特有の立体構造を認識し、特定の基質にしか作用しないという基質特異性である。さらに同じ基質特異性を有する酵素においても基質との相互作用がそれぞれ異なる。このことを定量的に求めるのが反応速度論的解析である。酵素反応は、酸などの非酵素的な触媒と比べると、基質の重合度 ( $n$ ) によって速度が大きく変化する。酸の場合は  $n$  が 2 から 100 程度に変わってもせいぜい 3 倍程度の違いしかないのに対して例えば、セルラーゼでは  $n$  が大きいほど速度が大きく、速度の比は約 70 倍にも達する。酸では、水解速度は基質の濃度と触媒 (酸) の濃度に関して、ともに一次であるので、一定の触媒濃度では一次反応の速度定数  $k$  だけで比較できる。

$$-\frac{d(A)}{dt} = k(A)$$

ここで  $t$  は反応時間、 $A$  は基質である。

これに対して酵素の場合、反応速度  $v$  は通常基質濃度  $S$  と全酵素濃度  $E_0$  に関して

$$v = V_{\max} / (K_m + S) = k_{\text{cat}} E_0 S / (K_m + S)$$

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} E_0$$

の形をとる。すなわち、一定の触媒濃度 ( $E_0$ ) における速度は、ミカエリス定数  $[K_m]$  と分子活性 ( $k_{\text{cat}} = V_{\max} / E_0$ ) と呼ばれる 2 つのパラメーターによって、また  $[S] < K_m$  が成り立つ低い基質濃度では  $(V_{\max} / K_m) S$  によって速度が決まる。

Nitta *et al.* の報告<sup>95)</sup>によると、エンド型酵素の場合、種々の重合度のオリゴマーを基質として用いて導き出した反応速度のパラメーターより酵素分子中のサブサイト数を求めることができる。さらに、分解産物のパターンを知ることでサブサイト中の触媒部位 (active site または cleavage site) を推定することも可能である。

アルギン酸リアーゼの反応動力学的研究は他の多糖質分解酵素に比べ、少ないのが現状である。これまでに報告されているのは、Elyakova, L.A. and Favorov V. V. の

軟体動物タマキビ肝臓由来 PM Lyase (1974 年)<sup>96)</sup>、Davidson I. W. *et al.* の *Pseudomonas* sp. PG Lyase (1976 年)<sup>97)</sup>、Min K. H. *et al.* の *Pseudomonas* sp. PG Lyase (1977 年)<sup>98)</sup>、*Klebsiella aerogenes* PG Lyase とアワビ肝臓由来 PM Lyase (1990 年)<sup>99)</sup>、Sawabe *et al.* の *Alteromonas* sp. 由来 MG Lyase (1997 年)<sup>18)</sup> である。これらはいずれも長鎖の基質 (アルギン酸もしくはポリウロン酸) を用いての解析であり、% を基にしたミカエリス定数、Vmax を求めているにすぎない。1993 年、Muramatsu *et al.* はアルギン酸から PM ブロックを調製し、硫酸加水分解で重合度の異なるオリゴマーを得た。アルギン酸分解酵素としては初めて、サザエ中腸腺由来 PM Lyase の各オリゴマーに対する反応速度定数を求めた<sup>40)</sup>。基質として DP 4 ~6、22 について Km、Vmax のみならず、kcat、kint、Kint を求め、タカアミラーゼ A によるサブサイト理論<sup>95)</sup>を適用し、SP1、SP2 のサブサイト数が 5 であると推定した。さらに触媒部位は非還元末端側から 2 番目と 3 番目に存在すると仮定している。これに次いで 1994 年、Takeshita *et al.* は *Vibrio* sp. PG Lyase のサブサイト数が 6 であり、触媒部位は非還元末端側から 2 番目と 3 番目の間に存在すると推定している<sup>49,50)</sup>。その後、Heyraud *et al.* のアワビ肝臓由来 PM Lyase (1996 年)<sup>45)</sup>、Shimokawa *et al.* の *Enterobacter cloacae* PG Lyase (1997 年)<sup>58)</sup>、Matsubara *et al.* の *Corynebacterium* sp. PG Lyase (1998 年)<sup>53)</sup> でサブサイト構造に関する検討がなされている。

本研究では、*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来アルギン酸リアーゼの各オリゴマーに対する反応速度定数を求め、さらにサブサイト構造の推定を行いこれまでに報告されているアルギン酸リアーゼとの比較を行った。

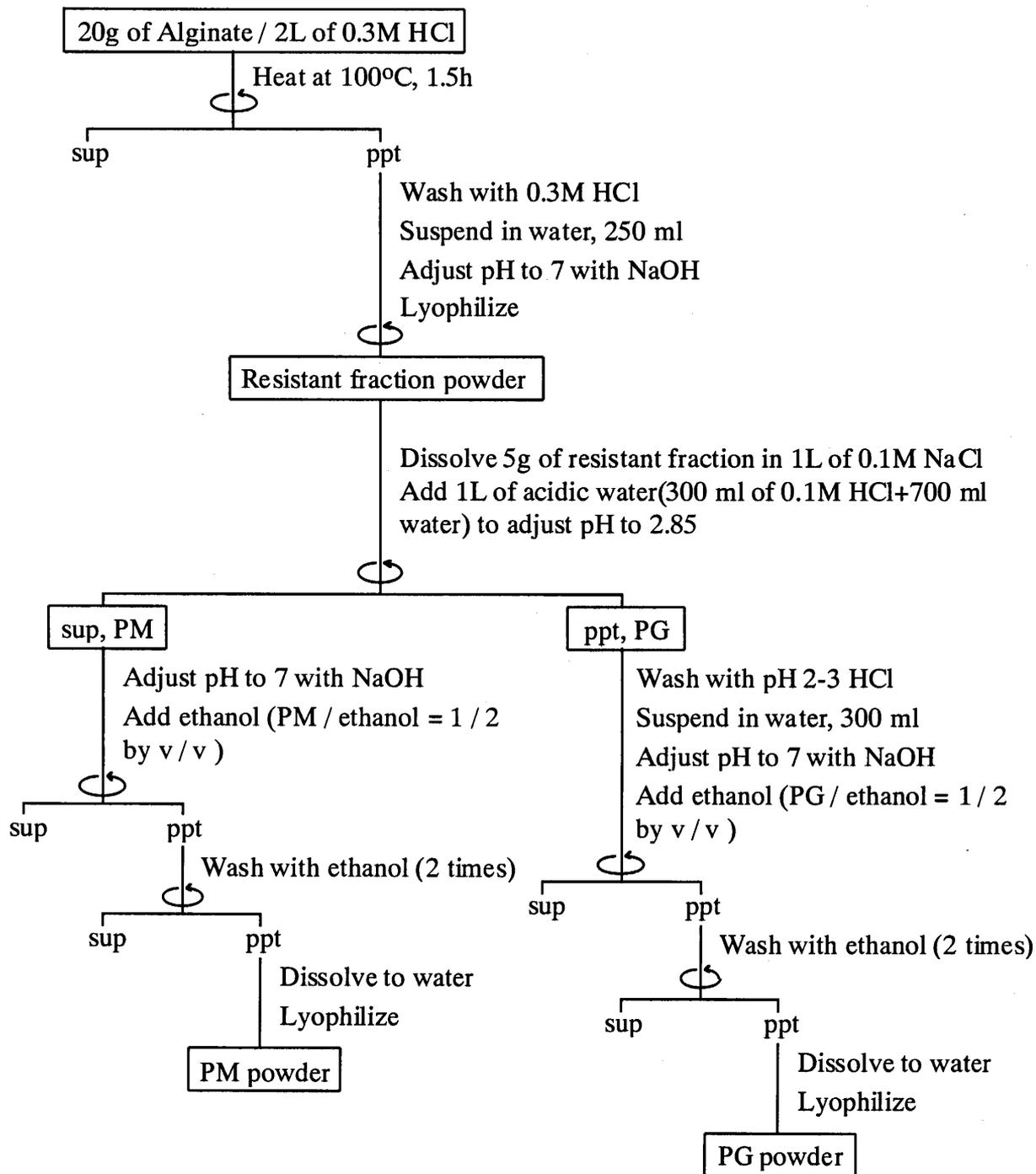
## 実験材料

アルギン酸ナトリウム (1000 cps) はナカライテスク社より購入した。Bio-Gel P-6、Bio-Gel P-2 は共に Bio-Rad 社製のファイングレード (45-90  $\mu\text{m}$ ) を用いた。ブルーデキストランは Pharmacia 社製、ガラクトuron酸はナカライテクス社製を用いた。モリブデン酸アンモニウムは片山化学工業社製、塩化スズ (II) はキシダ化学社製を用いた。

## 実験方法

### 1. PG、PM の調製法

市販のアルギン酸ナトリウムより Haug *et al.* の方法<sup>100)</sup>に若干の改良を加えて PG、PM を調製した。調製のフローチャートを Fig. 26 に示す。



**Fig. 26.** Preparation of Guluronate Homopolymer (PG fraction) and Mannuronate Homopolymer (PM fraction).

## 2. 飽和アルギン酸オリゴマーの調製法

飽和オリゴマーの調製法は G、M 両オリゴマー共、塩酸加水分解で行った。1% PG、PM 溶液 (0.1 N HCl にて pH 4.0 に調整) 200 ml をオートクレーブにて 121°C でそれぞれ、80、40 分間加水分解した。冷却後、0.1 N NaOH で中和し、凍結乾燥で 50 ml に濃縮した。各ポリマー体の純度検定は第 2 章 5. 基質特異性の方法で、CD スペクトルにて行った。

濃縮サンプルを予め 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化した Bio-Gel P-6 カラム (8.8 x 95 cm) に各サンプル 50 ml (4%) を供した。流速 1.3 ml/min であった。各重合度ごとのピークをプールし、濃縮した。重合度の決定は、ブルーデキストラン 2,000 とガラクトツロン酸を用いて Whitaker の方法<sup>10)</sup>に従って行った。

この操作で得られた各オリゴマーは多量のリン酸塩を含むため、水を溶出液としたゲル濾過カラムを用いて脱塩操作を行った。蒸留水で緩衝化した Bio-Gel P-2 カラム (2.5 x 95 cm) にリン酸塩を含む試料をかけ、流速 0.26 ml/min で水で溶出した。リン酸塩の定量は、モリブデンブルー法<sup>4)</sup>にて行った。リン酸塩を含まない部分のみをプールし、凍結乾燥にて乾燥標品として各オリゴマーを得た。

## 3. 不飽和アルギン酸オリゴマーの調製法

不飽和オリゴマーの調製法に用いた酵素は、*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株由来アルギン酸リアーゼであった。酵素の精製は、第 2 章第 1 節に従って行った。5 g の PG、PM を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、50 ml に溶解し、酵素 0.2 ml (0.05 mg/ml、737.04 units/mg) を 2 時間毎、PG については 4 回、PM については 3 回加え、30°C で反応させた。その後、0.1 N HCl にて pH を 4.0 にし、10 分間放置して反応を完全に止め、その後、0.1 N NaOH で中和した。そのオリゴマー混合溶液をメンブラン濾過し、2. と同様の方法で調製した。

## 4. 高分子の基質 (アルギン酸ナトリウム) への作用様式

本酵素の高分子基質に対する作用様式を検討するため、アルギン酸ナトリウムを基質として用いた場合の酵素反応における基質の粘度低下と不飽和ウロン酸の増加の関係を調べた。

粘度は Muramatsu *et al.* の方法<sup>24)</sup>に従って、オストワルドの粘度計で測定した。0.05% のアルギン酸ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml に本酵素溶液 (0.01 mg/ml) 0.1 ml を加え、反応開始からの粘度の減少を次式に従って 30°C で測定した。

To ; 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) の平均流下時間 (sec)

Tc ; 基質溶液と 0.1 ml の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) の混合液の平均流下時間 (sec)

ti ; 基質溶液に 0.2 ml の酵素溶液を加えてからの積算時間

Ti ; 反応混合液の流下時間 (sec) とすると、

これらの測定値から  $(ti + Ti / 2)$  を横軸に、その時間における比粘度の比  $(r_i) = [(Ti / To) - 1] / [(Tc / To) - 1]$  を縦軸にプロットした。

また、同条件での反応液中の不飽和ウロン酸の生成量を 235 nm での吸光度により求めた。

## 5. 反応速度に対する基質の重合度依存性

基質として各重合度 (DP 4~8, 22) の飽和 G 及び M オリゴマーを用いた。0.1% の各オリゴマーを含む 0.1 M Sørensen's glycine II 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 ml にアルギン酸リアーゼ (667.9 units/mg, 2.4 mg/ml) 10  $\mu$ l を加え、第 2 章第 1 節 1. 酵素活性の測定法に従って活性を測定した。また、未処理のアルギン酸についても同様にして活性を測定した。

## 6. 各オリゴマーに対する酵素反応速度

基質は、先に調製した飽和オリゴマーを本実験に用いた。0.1% 各重合度の飽和オリゴマーを含む 0.1 M Sørensen's glycine II 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 ml を 30°C で 10 分間インキュベートし、これに酵素溶液 (0.14 mg/ml) 20  $\mu$ l を加え、酵素活性を測定した。酵素活性の単位を 1 分当りの吸光度の変化量から 1 秒当りに生成する不飽和ウロン酸量に換算するため、反応の結果生じた不飽和ウロン酸の量は、活性が吸光度を用いた 1 unit の場合、 $0.271 \times 10^{-6}$  (MS<sup>-1</sup>) で表した<sup>53)</sup>。結果は、Lineweaver-Burk プロットより求めた。

## 7. 酵素分解産物の HPLC による酵素の作用様式解析

各飽和オリゴマー (DP 3~7) に酵素を作用させ、その分解産物を調べることに  
より本酵素の作用様式を解析した。0.2% 各オリゴマーを含む 50 mM リン酸緩衝  
液 (pH 7.0) 1 ml を 30°C で 10 分間インキュベートし、アルギン酸リアーゼ (0.14  
mg/ml) 10  $\mu$ l を加え、30°C で 5 分間反応させた。なお、DP 3、4 については 5. 基  
質の重合度依存性 において反応が非常に穏やかであることが予想されたので、酵  
素量を 20 倍にし、反応時間を 24 時間で行った。それぞれ反応終了後は 30% 炭  
酸ナトリウム溶液 15  $\mu$ l を加え、反応を完全に止めた。

酵素分解産物は、固定相にタンデムカラムを装着した 625LC system 高速液体ク  
ロマトグラフィー (HPLC、Waters 社製)によるゲル濾過で検出した。カラムは  
Superdex peptide HR10/30 (10 x 30 mm、2 本直列、Pharmacia 社製)を用い、50 mM リ  
ン酸緩衝液 (pH 7.0) を溶出液とし、流速 0.5 ml/min、検出波長 210 nm (飽和オリ  
ゴマー) 及び 235 nm (不飽和オリゴマー) であった。インジェクションしたサンプ  
ル量は、50  $\mu$ l であった。基質の切断頻度は、各波長により得られたピークの面積  
比から算出した。

## 結果および考察

### 1. グルロン酸、マンヌロン酸のポリマー体およびオリゴマーの調製

市販のアルギン酸ナトリウム 20 g より Resistant fraction 10 g、さらに 5 g の Resistant fraction から PG 1.5 g、PM 3 g を得た。この操作を繰り返し、実験に十分と思われる量を調製した。調製した PG、PM から酸加水分解及び酵素消化により飽和・不飽和オリゴマーを調製し、Bio-Gel P-6 によるゲル濾過から重合度の異なるオリゴマーを得た。飽和、不飽和オリゴマーのゲル濾過の結果を Fig. 27、Fig. 28 にそれぞれ示す。各オリゴマーの収率を Table 13、Table 14 にそれぞれ示す。

**Table 13.** Yield of Acid Hydolysates of Alginate

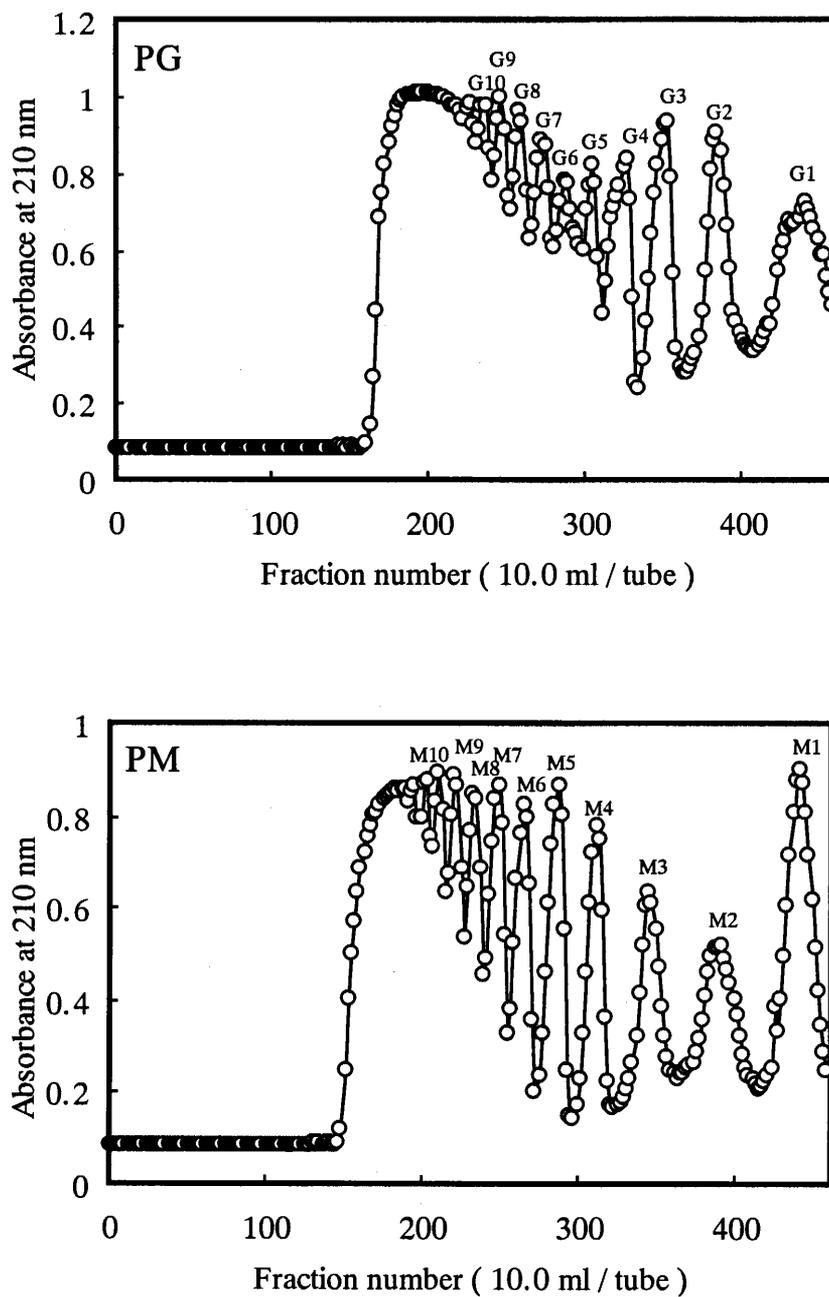
DP	Mannuronate (mg)	Guluronate (mg)
3	27	110
4	185	171
5	140	220
6	192	32
7	186	135
8	117	101
9	128	74
10	114	78

Each mannuronate and guluronate oligomer was from 6 g of polymeric-fraction

**Table 14.** Yield of Enzymatic Digestion Products of Alginate

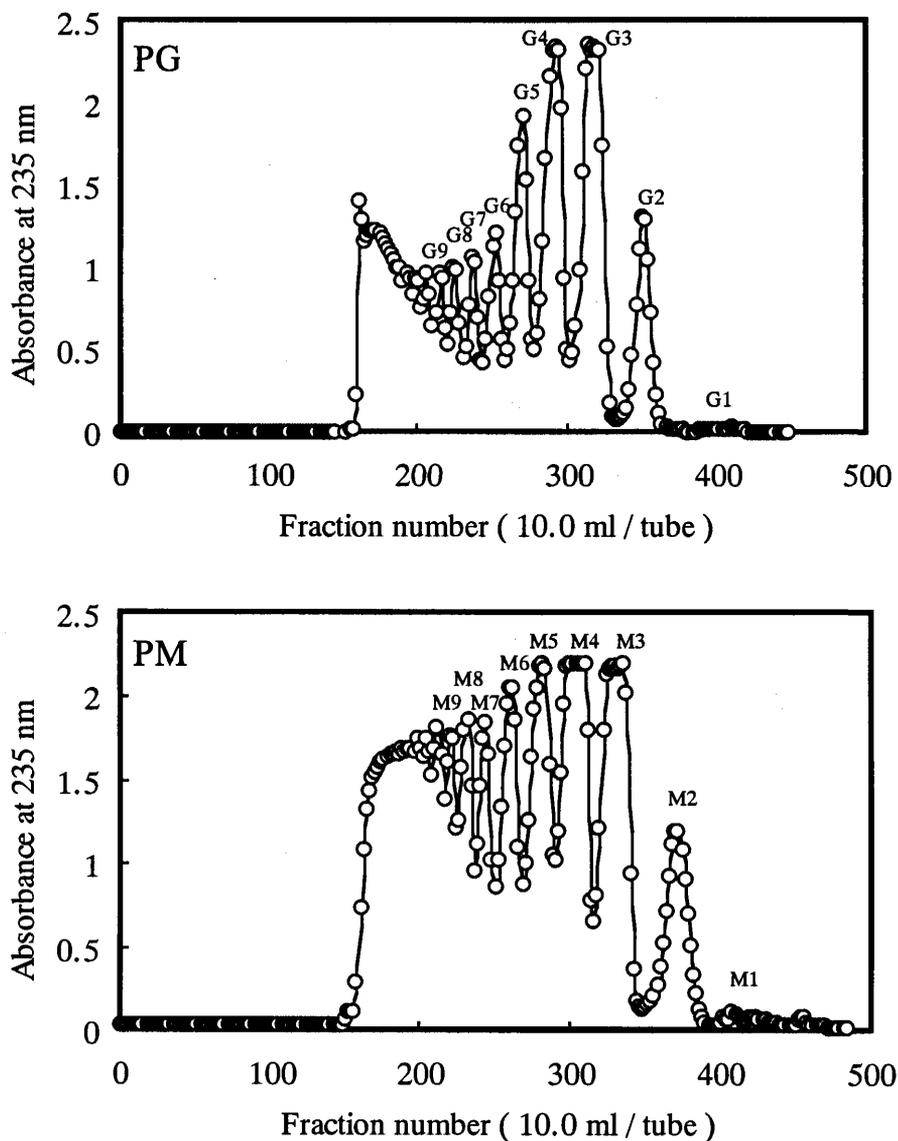
DP	Mannuronate (mg)	Guluronate (mg)
3	168	192
4	286	177
5	161	110
6	106	62
7	98	61
8	125	60
9	94	9

Each mannuronate and guluronate oligomer was from 6 g of polymeric-fraction



**Fig. 27.** Gel Chromatography of Acid Hydrolysates from PG and PM on Bio-Gel P-6 Column.

The hydrolyzed oligomers were put on Bio-Gel P-6 column (8.8 x 95 cm). The elution buffer was 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, flow rate was 1.3 ml/min.



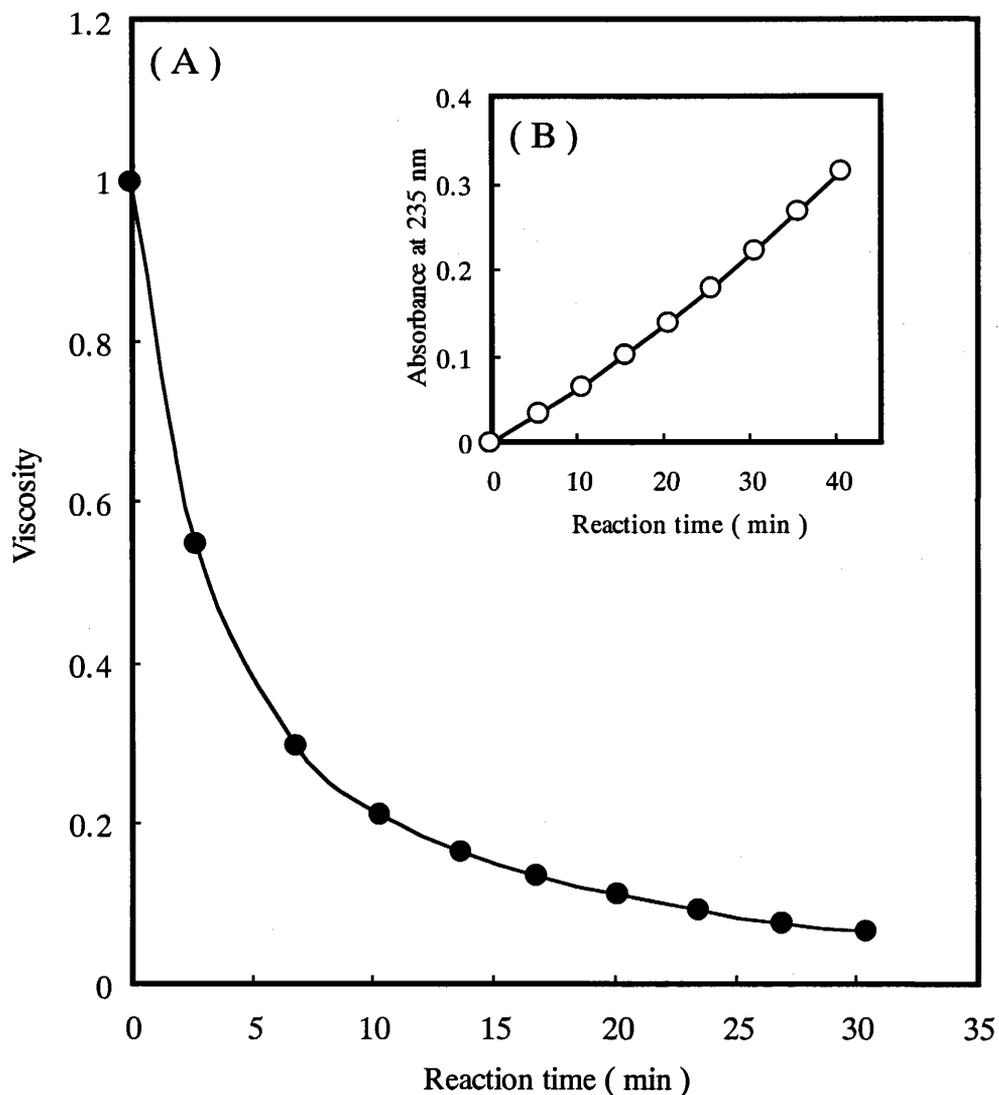
**Fig. 28.** Gel Chromatography of Enzymatic Digests of PG and PM on Bio-Gel P-6 Column.

The enzymatically digested oligomers were put on Bio-Gel P-6 column (8.8 x 95 cm). The elution buffer was 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, flow rate was 1.3 ml/min.

## 2. 高分子の基質(アルギン酸ナトリウム)への作用様式

本酵素の高分子基質に対する作用様式を検討するために、長鎖の基質であるアルギン酸ナトリウム溶液の粘度低下と不飽和還元末端の増加の関係を調べた。結果を Fig. 29 に示す。

アルギン酸ナトリウム溶液の粘度は、反応開始 2 分後で 45% まで低下し、以後粘度低下は穏やかで、20 分後には 10% 以下となった。また、不飽和アルギン酸は反応開始から反応時間と共に、直線的に増加した。これらのことから、本酵素の作用様式は、他起源由来アルギン酸リアーゼと同様、エンド型であり、長鎖の基質に対して優先的に結合し、比較的短時間のうちに短鎖の反応産物を生成すると考えられる。



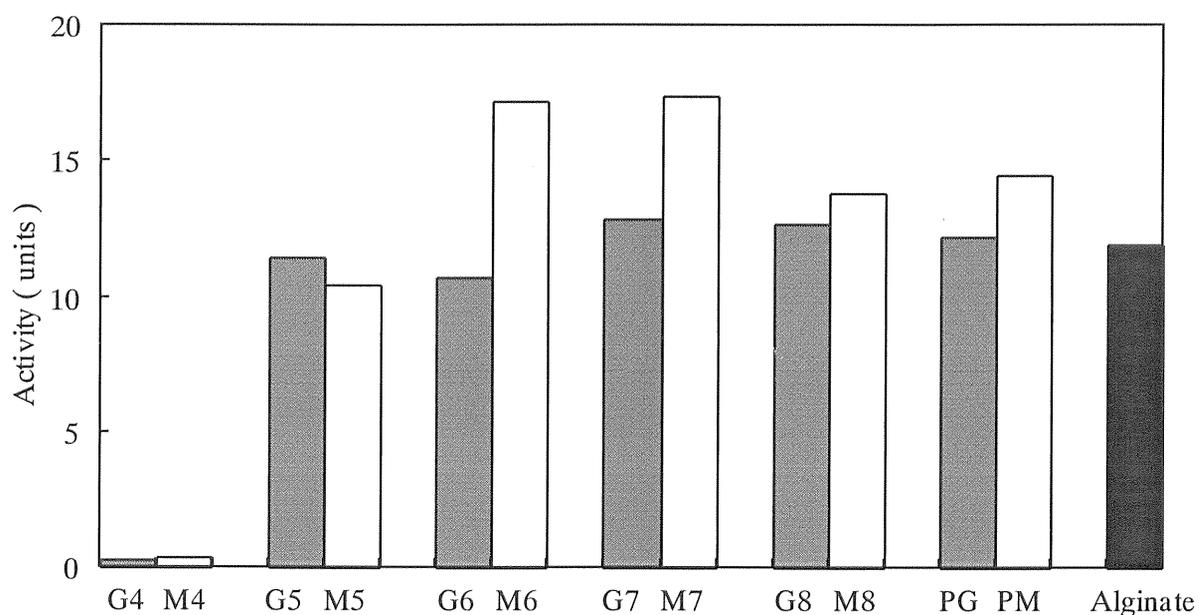
**Fig. 29.** Degradation of Alginate by the Enzyme as Reflected by Changes in Viscosity and Reducing Power.

(A) The reaction mixture contained 10 ml of 0.2% alginate in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 and 0.1 ml of the enzyme. (B) The reaction mixture (10.1 ml) had the same composition as in (A). An aliquot of 2 ml was withdrawn at each time interval and tested for reducing power.

### 3. 反応速度に対する基質の重合度依存性

飽和アルギン酸オリゴマーの重合度と活性との関係を Fig. 30 に示す。本酵素は、重合度 5 以上の基質を速やかに分解した。重合度 4 については、見掛け上反応が起こっていないようであったが、全く起こっていないわけではなかった。

さらなる検討を行うために、低分子基質に対する反応速度論的解析を行った。

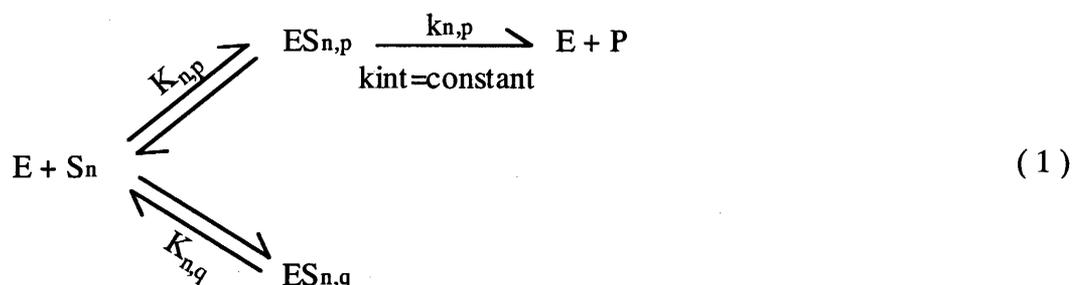


**Fig. 30.** Dependence of Alginate Lyase Activity on Degree of Polymerization of Substrate.

Substrate solution (2.0 ml of 0.1% each alginate oligomer in Sørensen's glycine II buffer, pH 8.0) was incubated at 30°C for 10 min before addition of 10 µl of the enzyme solution (667.9 units/mg, 2.4 mg/ml), and then the activity was assayed.

#### 4. 酵素反応速度論的解析

本酵素の反応に関するさらに詳細な情報を得るため、短鎖の基質を用いた反応速度論的解析を行った。各基質の基質濃度に対してその時の反応速度をプロットし、Michaelis-Menten 型曲線を得た。これに基づき Lineweaver-Burk プロットを得た。それらのグラフを Fig. 31 (G-oligomers)、Fig. 32 (M-oligomers) に示す。各オリゴマーで得られた直線の式よりミカエリス定数 ( $K_m$ ) と最大速度 ( $V_{max}$ ) を求めた。また本酵素は、均質の物質 (G もしくは M) が直鎖状に結合したものを基質とすることより Nitta *et al.*、Hirose *et al.* が導き出したタカアミラーゼ A (エンド型加水分解酵素) の理論<sup>95,102</sup>を適用してサブサイト構造を推定することができる。得られた  $V_{max}$  を全酵素濃度 ( $E_0$ ) で割ることで分子活性 ( $k_{cat}$ ) を求めた。さらに本酵素の反応効率を  $k_{cat}/K_m$  のかたちで求めた。本質的な (全てのサブサイトが基質がで完全に覆われている状態) 結合定数 ( $K_{int}$ ) と本質的な分解速度定数 ( $k_{int}$ ) を以下のようにして求めた。



ここに添字  $n$  は基質の重合度を、 $p$ 、 $q$  はそれぞれ productive (基質が活性部位をまたいで生成物を生じうる) および nonproductive な結合様式を表す。E、 $S_n$ 、 $ES_{n,p}$ 、 $ES_{n,q}$ 、P はそれぞれ酵素、さまざまな重合度の基質、productive な酵素-基質複合体、nonproductive な複合体及び生成物を表す。 $K_{n,p}$  および  $K_{n,q}$  はそれぞれの結合定数を表す。 $k_{n,p}$  は  $ES_{n,p}$  という productive な複合体から生成物が生じる速度定数を表す。(1) 式から  $K_m$  および  $k_{cat}$  は次式の様に表現できる。

$$1 / K_m = \sum K_{n,p} + \sum K_{n,q} \tag{2}$$

サブサイト数を  $m$ 、基質の重合度を  $n$  とすると

$$\begin{aligned} k_{cat} &= V_{max} / (E_0) \\ &= k_{int} \frac{\sum_p K_{n,p}}{\sum_p K_{n,p} + \sum_q K_{n,q}} \end{aligned} \quad (3)$$

$$n > m \text{ のとき } \quad \sum_p K_{n,p} \gg \sum_q K_{n,q}$$

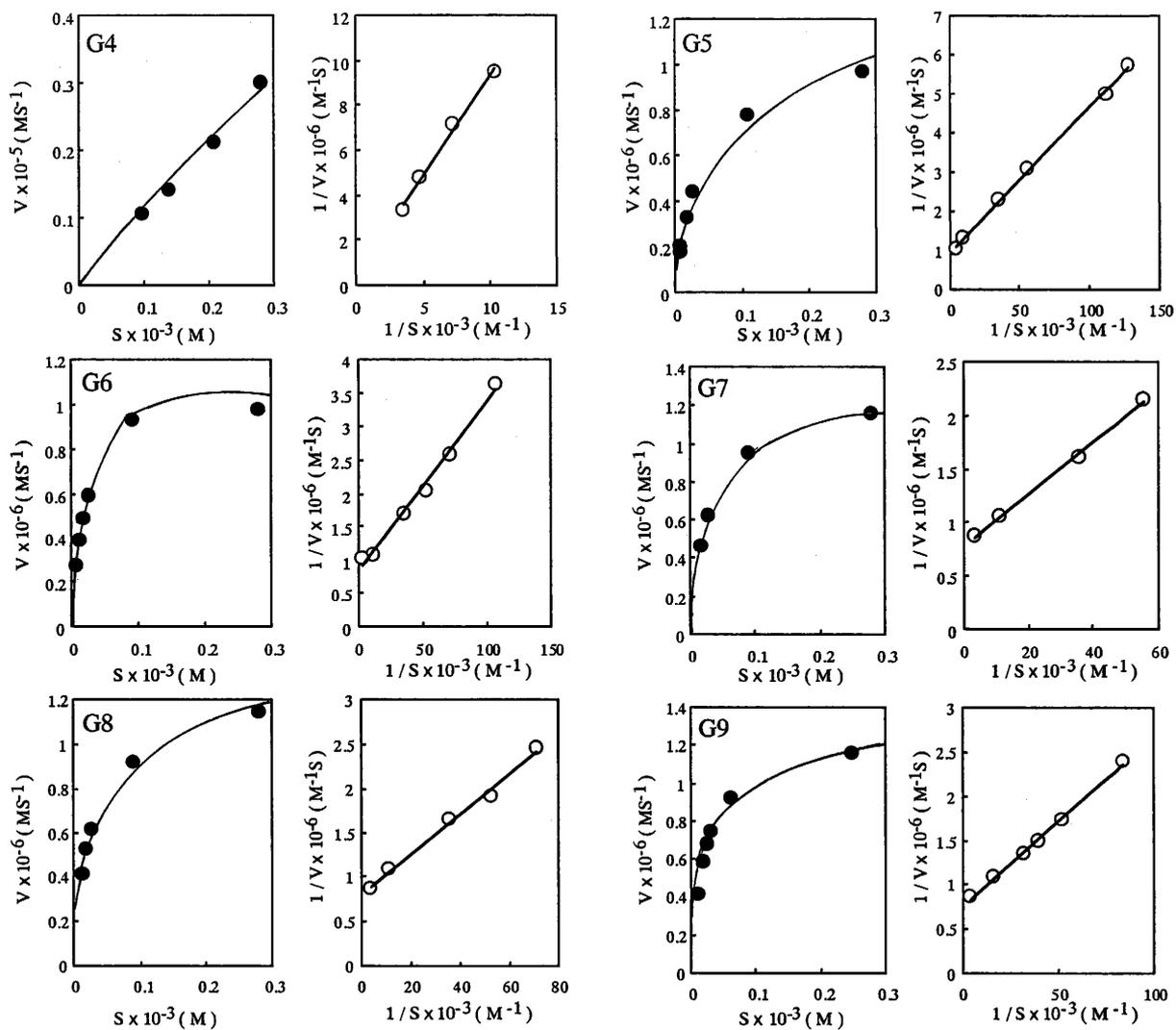
ゆえに (3) 式より

$$k_{int} = k_{cat} \quad (4)$$

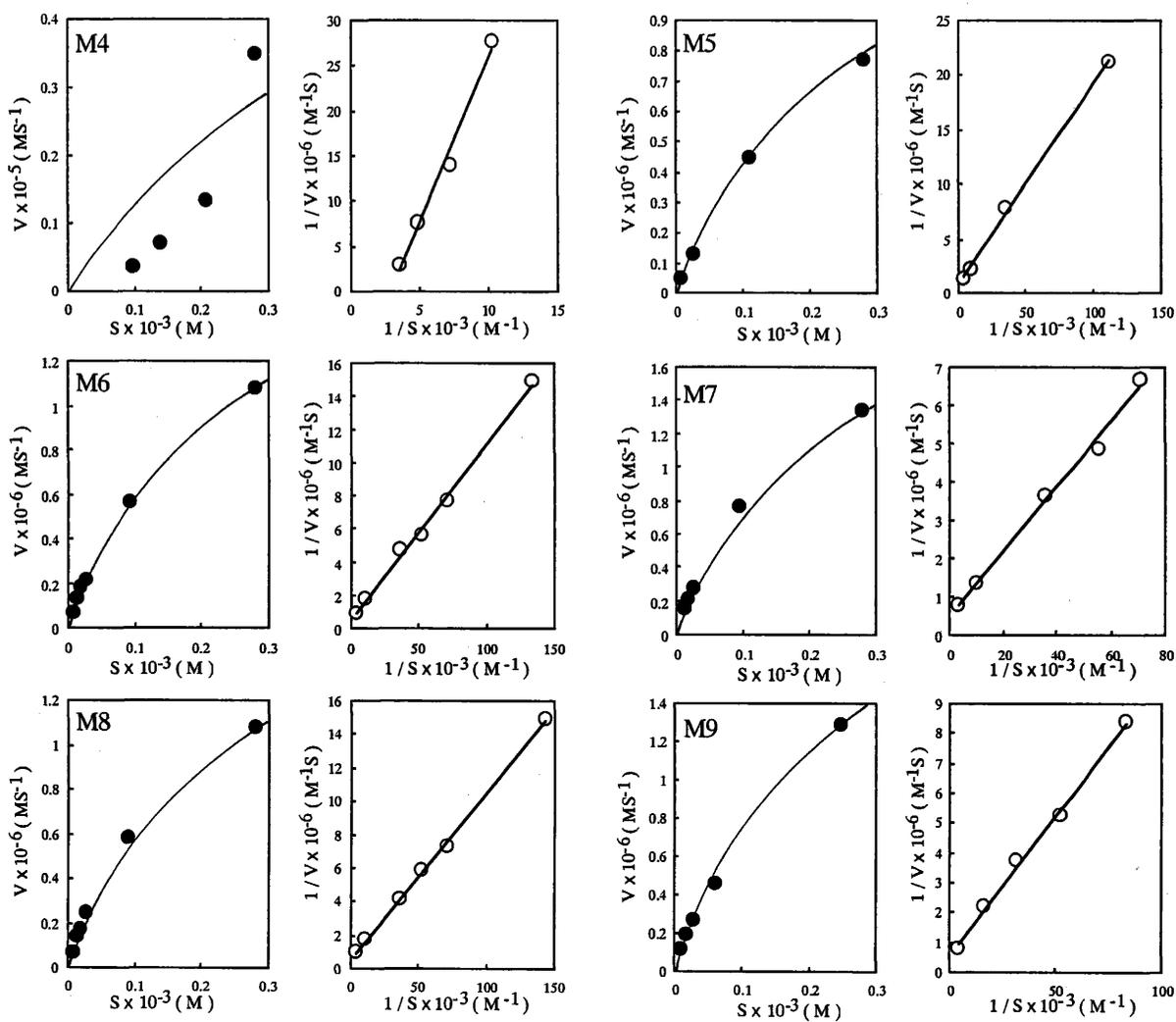
となり、つまり  $k_{cat}$  が一定の値を示した最小の重合度がサブサイト数であり、その時の  $k_{cat}$  の平均値が  $k_{int}$  となる。また、 $n > m$  のとき productive な結合は  $(n-m+1)$  通り生じるので、これらの結合定数は次式から求められる。

$$1 / K_{int} = (n - m + 1) K_m \quad (n \geq m) \quad (5)$$

これらの理論より求められた各反応動力学パラメーターを Table 15 に示す。さらにこの結果をもとに、サブサイト数の決定を行うための本酵素の反応動力学パラメーターの対数をプロットした結果を Fig. 33 に示す。



**Fig. 31.** Michaelis-Menten Plots (left) and Lineweaver-Burk Plots (right) of Action of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 on G4, G5, G6, G7, G8, and G9 as Substrate.

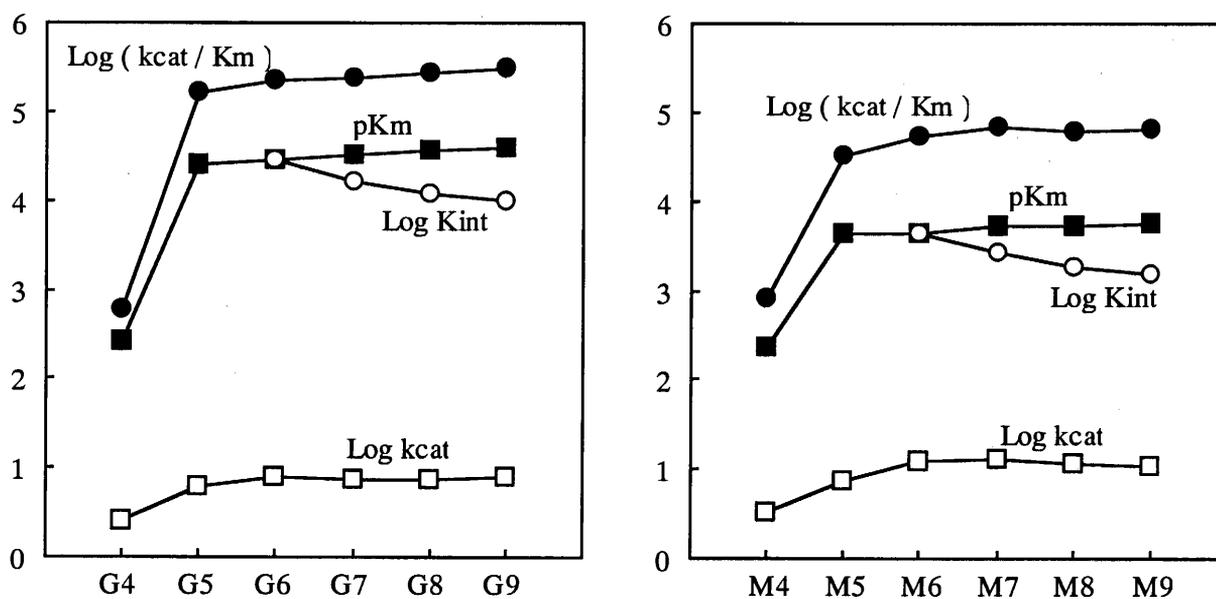


**Fig. 32.** Michaelis-Menten Plots (left) and Lineweaver-Burk Plots (right) of Action of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 on M4, M5, M6, M7, M8, and M9 as Substrate.

**Table 15.** Kinetic Constants in the Reaction of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272\*

DP	Km		kcat		kcat/Km		Kint**		kint***	
	(M, $\times 10^3$ )		(s <sup>-1</sup> )		(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> , $\times 10^{-3}$ )		(M <sup>-1</sup> , $\times 10^{-3}$ )		(s <sup>-1</sup> )	
	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M
4	3.861	4.250	2.5	3.2	0.6	0.8				
5	0.039	0.232	6.2	7.4	159.8	31.9				
6	0.035	0.226	7.9	11.9	225.2	52.4	28.4	4.4	7.7	11.8
7	0.031	0.192	7.6	13.2	243.9	69.1	16.1	2.7		
8	0.028	0.186	7.3	11.1	263.1	59.4	12.1	1.8		
9	0.025	0.172	7.8	10.8	309.1	63.2	9.8	1.5		

\*, 30°C pH 8.0 ; \*\*, Intrinsic binding constant; \*\*\*, Intrinsic reaction rate constant



**Fig. 33.** Relationship between Kinetic Constants and Degree of Polymerization of Linear Oligomeric Substrates.

Table 15 の結果を解釈すると次のようになる。 $K_m$  が酵素・基質複合体の解離定数とみなせば、値が小さい程酵素・基質間の親和性は高くなることになる。本実験からは、オリゴマーの重合度の増加に伴い  $K_m$  は減少した。ゆえに本酵素とアルギン酸ホモオリゴマーの親和性はより基質の重合度の高い方が大きいことが分かった。これは、他起源由来のアルギン酸リアーゼと同様の結果であった。また、M よりも G の  $K_m$  値の方が 10 倍低い値を示したので、本酵素は G オリゴマーとの親和性が高いことが明らかとなった。

$k_{cat}$  は酵素・基質複合体から反応産物を生ずる酵素分子あたりの反応速度定数であり、 $k_{int}$  は productive な結合における結合様式を問わない触媒中心固有の反応速度定数である。この値が大きいほど反応性が高いと言える。本酵素においては、G よりも M の方が若干ではあるが、大きかった。しかし、重合度の依存性が見られず、G、M 共に重合度 6 以上でほぼ一定の値を示した。このこととタカアミラーゼ A の理論を適用すると、本酵素のサブサイト数はアルギン酸残基 6 個に相当すると推定された。反応効率を示す  $k_{cat}/K_m$  を G と M オリゴマーで比べてみると、いずれの重合度においても約 5 倍 G オリゴマーの方が大きいことがわかった。

Table 15 において G と M オリゴマーの  $K_{int}$  を比較したところ、G の方が 6 ~7 倍高かった。G、M 共に基質の重合度が増すにつれて  $K_{int}$  のわずかな減少が見られた。これは、サブサイトを越えた基質の部分による結合への影響であるかもしれない。一方、 $k_{int}$  は、M の方が G オリゴマーよりも 1.5 倍高い値を示した。

以上のことから、本酵素はグルロン酸、マンヌロン酸の両基質に活性を有することは明らかであるが、酵素と基質の親和性は M よりも G オリゴマーの方が約 10 倍大きかった。 $k_{cat}/K_m$  で見られる反応効率としては、グルロン酸オリゴマーの方が約 5 倍高いことが示唆された。また、サブサイトの数を 6 と仮定すると、基質の重合度 6 以上においてサブサイトが基質で全て塞がっているときの結合の強さは G の方が大きく、重合度が低い程大きな値を示した。しかし、 $k_{cat}$  は M の方が大きかった。このことは G が  ${}^1C_4$  の、M が  ${}^4C_1$  の立体構造をとることと、こ

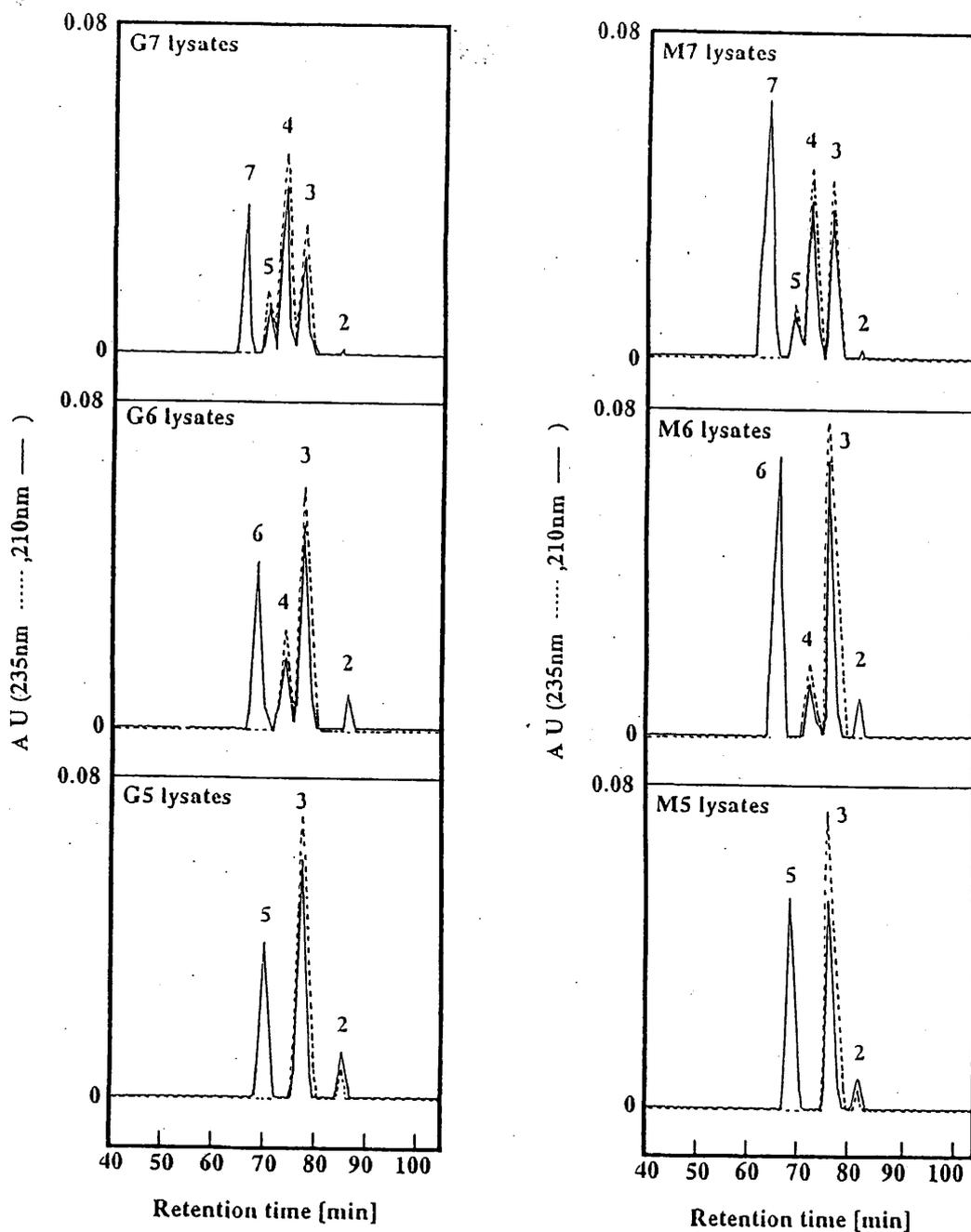
れらを認識する酵素の活性中心構造との相互作用の違いによるものと考えられる。

以上の結果より、本酵素はマンヌロン酸オリゴマーよりもグルロン酸オリゴマーの方が反応速度論的に優位であることが分かった。これまでに発見されている海洋細菌由来の菌体外アルギン酸リアーゼの殆どはグルロン酸に基質特異性を有しているが、このことと本酵素のこの解析結果の間には何か関連があるのかもしれない。

#### 5. 酵素分解産物の HPLC による酵素の作用様式解析

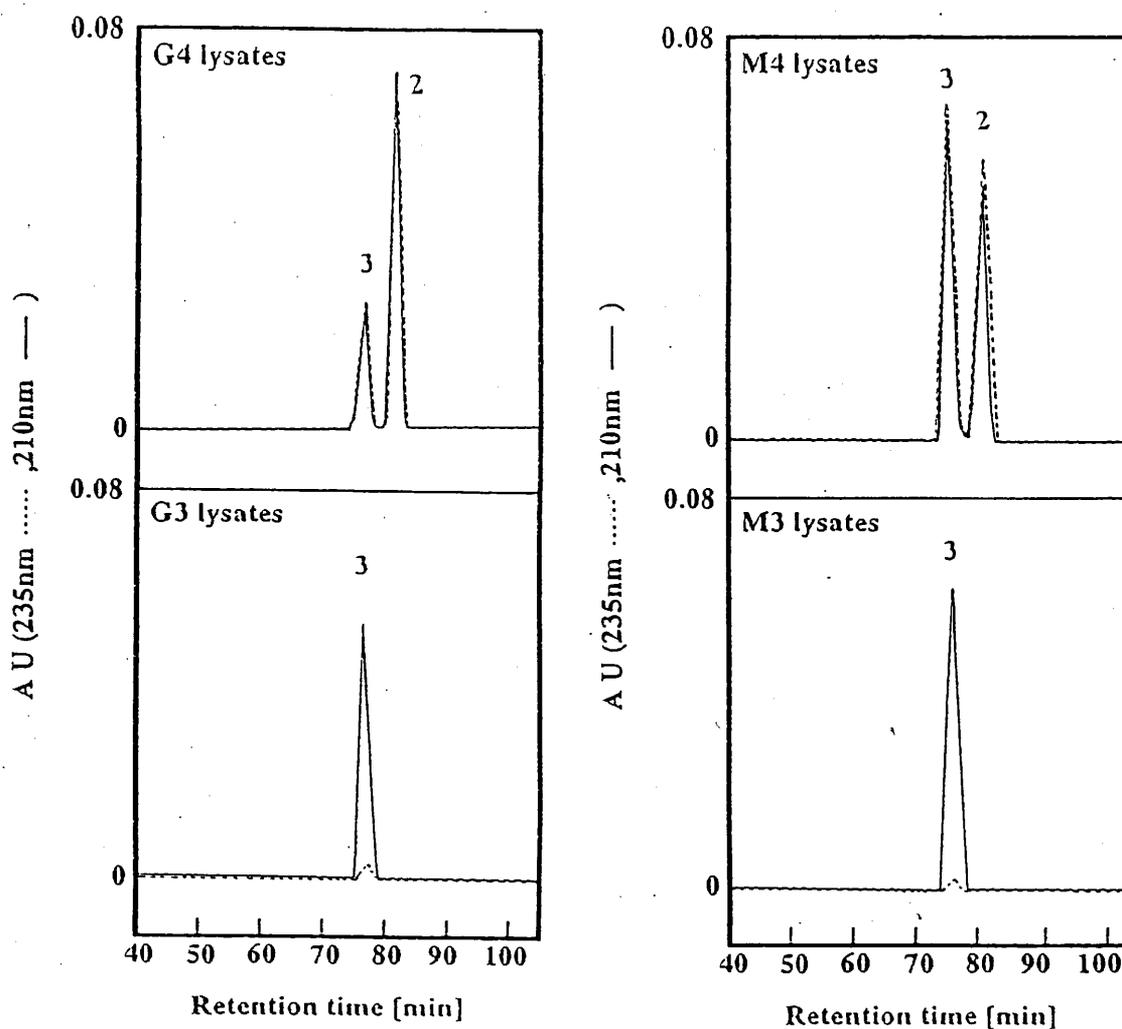
さらに詳細な低分子基質に対する切断様式を、分解産物の HPLC によるゲル濾過で調べた。特に本酵素のサブサイト数が 6 であると推定されたが、その触媒部位がサブサイト中のどの位置に存在するかを推定する為に反応初期段階での分解産物の同定を行う必要があった。重合度 5~7 についての結果を Fig. 34、重合度 3 と 4 についての結果を Fig. 35 に示す。実線は飽和オリゴマーを 210 nm で測定し、点線は不飽和オリゴマーを 235 nm で測定したものを表す。Fig. 34、35 よりグルロン酸オリゴマーとマンヌロン酸オリゴマー間で、テトラマーを除いては分解様式の相違は見られなかった。Fig. 34 より、アルギン酸ヘプタマー (DP 7) は、主に不飽和 4 糖と飽和 3 糖に分解され、僅かに不飽和 3 糖と飽和 4 糖、不飽和 5 糖と飽和 2 糖にも分解された。アルギン酸ヘキサマー (DP 6) は、主に不飽和 3 糖と飽和 3 糖に分解され、僅かに不飽和 4 糖と飽和 2 糖にも分解された。アルギン酸ペンタマー (DP 5) は、主に不飽和 3 糖と飽和 2 糖に分解され、僅かに不飽和 2 糖と飽和 3 糖にも分解された。アルギン酸テトラマー (DP 4) は、3.反応速度に対する基質の重合度依存性より反応が起こりにくいことが分かっていたので、酵素量を 10 倍、反応を 24 時間行い、その後 HPLC によるゲル濾過に供した。Fig. 30 の結果より、テトラマー (DP 4) はほぼ同程度の頻度で不飽和 2 糖と飽和 2 糖、不飽和 3 糖と飽和 1 糖に分解された。しかし、高濃度の酵素量で長時間反応を行ってもトリマー (DP 3) の分解は起こらなかった。これらの結果に基づいて、Fig. 36 に反応初期における飽和アルギン酸オリゴマーのグリコシド結合の切断頻度と基質の分解率を示す。矢印の下に表記した数字は、各基質の分解率を示す。全てのパターンで不飽和トリオリゴマーの生成が認められた。4.酵素反応速度論的解析の結果

から本酵素のサブサイト数は 6 と推定された。このことを考慮し、DP 6 以上の基質オリゴマーの分解パターン特に ヘプタマー (DP 7) について反応産物を見ると、飽和 3 糖が主要産物であった。よって、本酵素の触媒部位は非還元末端からサブサイトの 3 番目 (中央部分) に存在すると推定された。



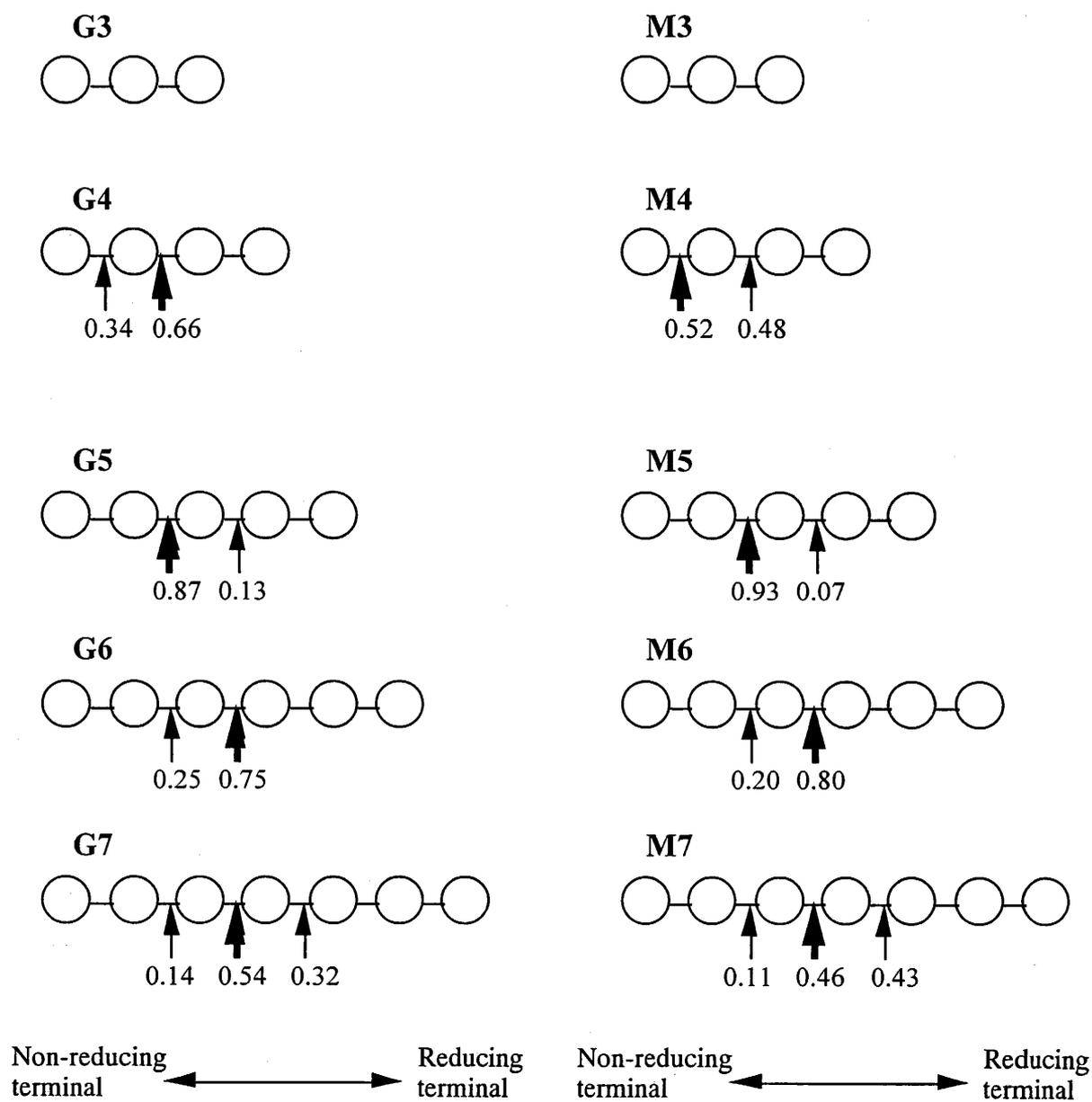
**Fig. 34.** HPLC of Reaction Products from DP 5~7 of Guluronate and Mannuronate Digested with Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The solid and dotted lines show the absorbance at 210 and 235 nm (unsaturated reaction products), respectively. The numbers on peaks indicate DP of the oligomers, of which elution position have been with the standard oligomers.



**Fig. 35.** HPLC of Reaction Products from Trimer and Tetramer of Guluronate and Mannuronate Digested with Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The solid and dotted lines show the absorbance at 210 and 235 nm (unsaturated reaction products), respectively. The numbers on peaks indicate DP of the oligomers, of which elution position have been with the standard oligomers.



**Fig. 36.** The Pattern and Fraction of Bond Cleavage of the Substrate Oligomers by Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

The position of bond cleavage by the enzyme is shown with arrows; (  $\uparrow$  ) in the main and (  $\uparrow$  ) in the minor. The numerals are fraction of bond cleavage. Symbol (  $\circ$  ) indicates G ( $\alpha$ -1,4) or M ( $\beta$ -1,4) unit and subscripts of G and M mean DP.

## 6. *Pseudoalteromonas* sp. 由来アルギン酸リアーゼと他起源由来同酵素とのサブサイト構造の比較

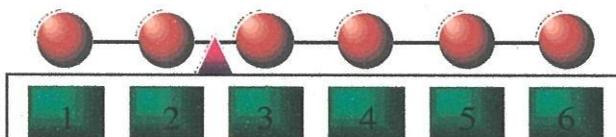
*Pseudoalteromonas elyakovii* 由来アルギン酸リアーゼは、本酵素と同様にグルロン酸とマンヌロン酸の両基質に活性を有することが分かっている。Sawabe *et al.* は、この酵素について基質に未処理のアルギン酸、PG、PM、MG ランダムを用いて、 $K_m$  と  $V_{max}$  を求めている<sup>18)</sup>。その結果、 $K_m$ 、 $V_{max}$  共に PM が最も大きく、次いで未処理のアルギン酸、MG ランダム、PG であった。PM の方が PG よりも  $K_m$  値が 20 倍近く大きかった。本酵素も M オリゴマーに対しての方が  $K_m$  値は大きかったが 10 倍程度であった。G、M の両基質に活性を有するアルギン酸リアーゼは、基質との親和性は G に対しての方が高いことが示唆される。

アルギン酸リアーゼのサブサイト構造に関する知見は多くはないが、本酵素、*Vibrio* sp. (Takeshita *et al.*)<sup>49)</sup>、*Corynebacterium* sp. ALY-1 株 (Matsubara *et al.*)<sup>53)</sup>、*Enterobacter cloacae* (shimokawa *et al.*)<sup>58)</sup> 由来グルロン酸リアーゼ、サザエ (*Turbo cornutus*) の中腸腺 (Muramatsu *et al.*)<sup>40)</sup>、アワビ (*Haliotis tuberculata*) (Heyraud *et al.*)<sup>45)</sup> 由来マンヌロン酸リアーゼのサブサイト構造を比較した。その結果を Fig. 37 に示す。サブサイト数は異なるものの、ここに表記した本酵素を除く全てのアルギン酸リアーゼは、触媒部位は非還元末端から 2 番目と 3 番目の間に存在すると推定されている。

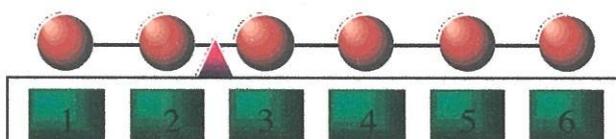
Alginate Lyase from  
*Pseudoalteromonas* sp. No.272  
(This study)



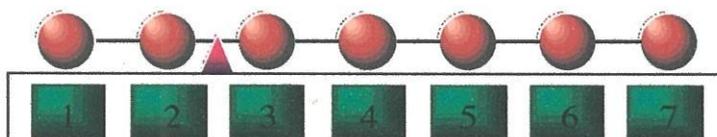
PG Lyase from  
*Vibrio* sp.  
(Takeshita *et al.*)



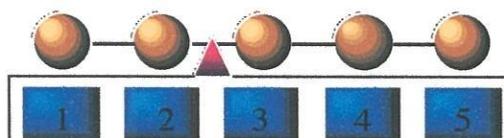
PG Lyase from  
*Corynebacterium* sp. ALY-1  
(Matsubara *et al.*)



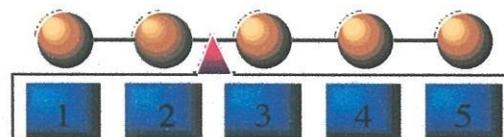
PG Lyase from  
*Enterobacter cloacae*  
(Shimokawa *et al.*)



PM Lyase from  
*Turbo cornutus* (wreath shell)  
(Muramatsu *et al.*)



PM Lyase from  
*Haliotis tuberculata* (abalone)  
(Heyraud *et al.*)



**Fig. 37.** Comparison of Subsite Structure of Alginate Lyase with Various Sources.

Symbol (  $\circ$  ) indicates G or M unit, (  $\square$  ), and arrows show enzyme subsite, and active site of each enzyme, respectively.

### 第 3 節 酵素の活性中心構造

#### 緒言

これまでの実験より *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 が産生するアルギン酸リアーゼの性状が明らかとなった。本酵素がこれまでにあまり報告のない PG、PM の両基質に活性を有する酵素であることから活性中心に関する知見を得ることは、たいへん有意義であり、興味のあることである。さらに本酵素の触媒作用に関する知見を得ることを目的として本研究を行った。

まず始めに、本酵素を作用させる前後で基質 (PG、PM) の CD スペクトルが変化することに注目し、各基質の楕円率の時間的変化を求めた。この関係から酵素分子中の活性中心が両基質に個別にそれぞれに存在する、つまり 2 つの活性中心をもつか、又は 1 つの活性中心に基質が競合的に結合するのかを調べた。

次に、Gacesa が提唱するアルギン酸リアーゼの反応機構<sup>15)</sup>に基づくと、基質のカルボキシル基に酵素分子中の塩基性アミノ酸が結合することで反応が開始する。そこで、基質のカルボキシル基をブロックすることでこの反応機構の妥当性を検証する実験を行った。

最後に、本酵素分子中にトリプトファン残基が 1 つしか存在しないこと、化学修飾で本酵素を NBS で酸化すると、活性が 100% 低下することに注目し、トリプトファン残基の存在環境と活性発現への関与をトリプトファン残基の固有蛍光を用いて調べた。

## 実験材料

アルギン酸プロピレングリコール、アクリルアミドは、和光純薬社製を用いた。しかし、アルギン酸プロピレングリコールは精製する必要があったので以下に記述する 2.a) の方法に従って調製した。N-アセチル-L-トリプトファンアミドは、Sigma 社製のものを用いた。

## 実験方法

### 1. 活性中心の数の推定

a) 濃度一定 (0.2%) の PM に PG の濃度を漸増して加え、反応開始から 4 分後までの 240 nm での CD スペクトルを測定した。PG と PM の濃度関係は以下の通りであった。

PG	0%	0.01%	0.02%	0.05%	0.08%	0.1%	0.15%	0.2%
PM	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%

これらの基質溶液 0.2 ml に酵素溶液 10  $\mu$ l を加えマイクロチューブ内において室温で反応させ酵素添加 1 分後、240 nm の CD スペクトルを 3 分間測定した。測定結果より反応初期 (酵素添加 70 秒後) のだ円率を求め、各濃度に対してプロットしグラフを作成した。ただし PG のみでの影響を除くため、各濃度についてそれぞれコントロールとして相当濃度の PG のみについても同様に測定を行い、 $[(PG + PM \text{ のだ円率}) - (PG \text{ のみのだ円率})]$  を求めプロットした。

b) 濃度一定(0、0.1%)の PG に PM の濃度を漸増して加え、a) と同様にして実験を行った。PG と PM の濃度関係は以下の通りであった。

PG	0%	0%	0%	0%	0%
PM	0.02%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%

PM	0%	0.02%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%
PG	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%

ただしこれらについては a) の様にコントロールは取らず、そのまま各だ円率をグラフにプロットした。

## 2. アルギン酸プロピレングリコールを基質として用いたときのアルギン酸リアーゼ活性について

### a) アルギン酸プロピレングリコールの調製

市販品のアルギン酸プロピレングリコール 5 g を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 200 ml に溶解した。これに本酵素溶液 0.2 ml (0.57 mg/ml) を加え、30°C で 3 時間インキュベートした。酵素消化後、凍結乾燥により約 5 ml まで濃縮した。その後、予め 0.1 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化した Bio-Gel P-10 カラム (2.5 x 95 cm) に濃縮した試料を供した。溶出パターンより高分子部分のみをプールし、これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥にて精製標品を得た。以下の実験にはこの精製アルギン酸プロピレングリコールを用いた。

### b) 本酵素のアルギン酸プロピレングリコールに対する結合性

精製したアルギン酸プロピレングリコールと本酵素の結合性を HPLC によるゲル濾過により求めた。0.2% アルギン酸プロピレングリコールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を基質として用いた。酵素は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。濃度 0.1 mg/ml (347.9 units/mg) のものを用いた。HPLC に用いたカラムは、Shodex PROTEIN KW-802.5 (8 x 300 mm) (昭和電工社製) で、溶出溶液として 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用い、流速 0.5 ml/min で溶出した。反応は室温にて以下の組み合わせで行い、それぞれ 90  $\mu$ l を HPLC に供した。

基質のみ	基質 90 $\mu$ l	10 mM PB (pH 7.0) 10 $\mu$ l
酵素のみ	50 mM PB (pH 7.5) 90 $\mu$ l	酵素 10 $\mu$ l
基質+酵素	基質 90 $\mu$ l	酵素 10 $\mu$ l

## 3. トリプトファン残基の固有の蛍光に基づく酵素と基質の相互作用

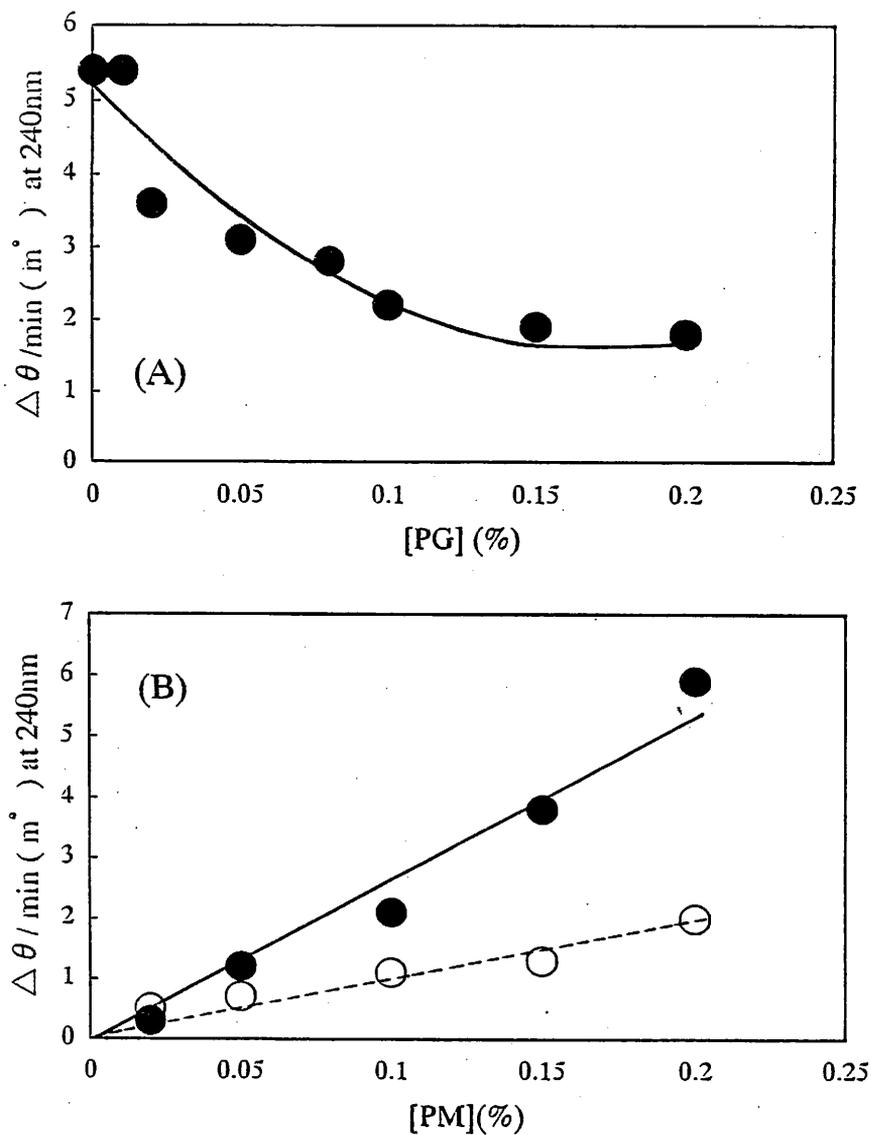
アクリルアミドは用時調製した。0.3% の各基質 (G4~G7, PG, M4~M7, PM) を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.65 ml に 0.1 mg/ml (1293 units/ml) の酵素溶液 0.1 ml を加えよく混合し、酵素-基質複合体を形成しているその溶液に濃度の異なるアクリルアミド水溶液 (終濃度 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 M になるように) 0.25 ml を加えよく混合した後、30 秒後の励起光 295 nm における蛍光強度 (波

長 330 nm) を日立分光蛍光光度計 650-60 型で測定した。この他に、酵素のみ (終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$ )、N-アセチル-L-トリプトファンアミド (終濃度 0.07  $\mu\text{g/ml}$ )、RCM 化した酵素 (終濃度 2  $\mu\text{g/ml}$ ) についても同様にして蛍光強度を測定した。

## 結果および考察

### 1. 活性中心の数の推定

第 2 章 2 節 5. 基質特異性で本酵素を PG、PM に作用させると、その前後で基質の CD スペクトルが共に変化することが分かった。そこで、この性質を利用して本酵素の活性中心に対して両基質がどのように作用するか、つまり競合的に作用するか否かを調べた。Fig. 9 に示す結果より、PM に本酵素を作用させると、240 nm での楕円率が大きく変化している。その変化量は酵素量に比例していた (データは示していない)。一方、PG の方は、240 nm での大きな変化量は認められなかった。そこで PG、PM の添加量を変え、この 240 nm での楕円率を測定し、グラフに表したのが Fig. 38 である。(A) は濃度一定の PM に PG を漸増的に加えた時の 240 nm での楕円率変化を、(B) は濃度一定の PG に PM を漸増的に加えた時の 240 nm での楕円率変化を示している。Fig. 38 (A) をみると、濃度一定の PM に PG を漸増的に加えたとき 240 nm での CD スペクトル強度の変化は明らかに減少している。このことは PG を加えることにより、本酵素による PM の分解が行われにくくなっていることを表している。一方、Fig. 38 (B) でも、PG を加えたときと加えていないときとでは、明らかに PG を加えたときの方が 240 nm での CD スペクトル強度の変化が減少しており、PM の分解が行われにくくなっている。もし、本酵素分子中に PG、PM に作用する 2 つの活性中心が存在するならば、それぞれの基質の影響を受けることなく PG、PM の分解が行われるはずである。つまり、(A) において PG の濃度 (横軸) に平行な直線が得られたはずであり、(B) において 2 つの直線の傾きは等しくなったはずである。以上の理由により、本酵素の PG、PM に対する活性中心は 1 つであると推定した。しかし、両基質にそれぞれ作用する 2 つの活性中心が非常に接近した位置に存在し、1 つの活性部位が基質を捕捉したとき、もう 1 つの活性部位の構造が歪んでしまい基質を捕らえにくくなるという可能性も考えられる。Fig. 38 (A) で曲線が得られたのに対して、(B) では直線が得られた。この原因は明らかでないが、PG、PM の立体構造の違いが何らかの影響を与えているのかもしれない。



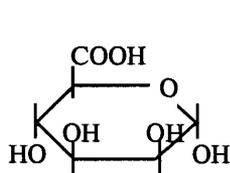
**Fig. 38.** Effects of Coexisting PG and PM as Substrate on Activity of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. No.272.

(A), The reaction mixture contained increasing amounts of PG as shown in the figure with 0.2% PM in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5 and 10  $\mu\text{g}$  of the enzyme. Ellipticity measurement at 240 nm started at 1 min after addition of the enzyme and continued 3 min.

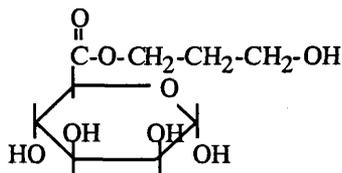
(B), The reaction mixture contained increasing amounts of PM shown in figure with 0.1% PG (  $\circ$  ) and without PG (  $\bullet$  ) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5. Ellipticity was measured as described in (A).

## 2. アルギン酸プロピレングリコールを基質として用いたときのアルギン酸リアーゼ活性について

### a) アルギン酸プロピレングリコールの調製



Alginic acid



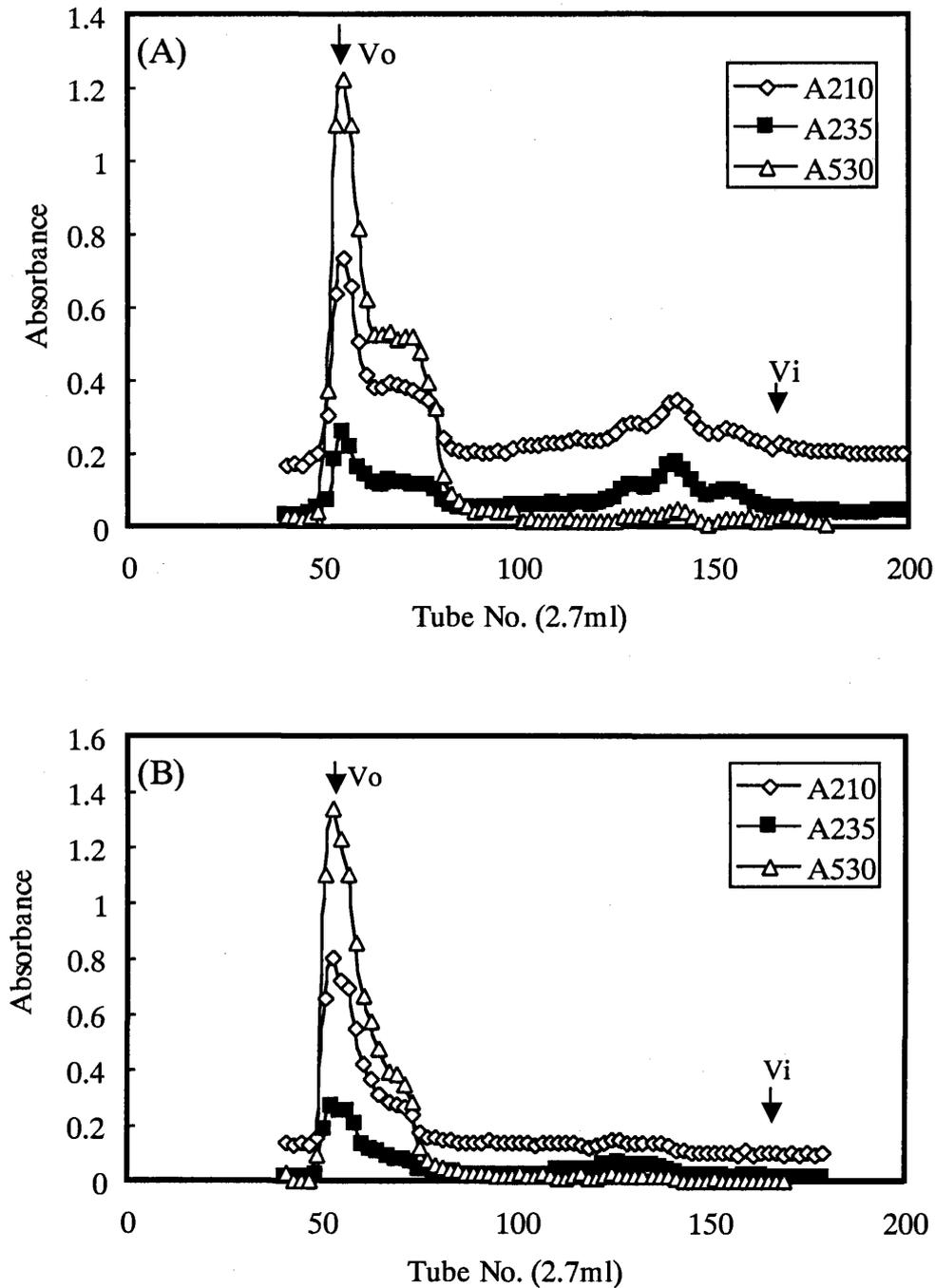
Propylene glycol alginic acid

アルギン酸 (マンヌロン酸) とそのエステル化合物である、アルギン酸プロピレングリコール (PGA) の化学式を下に示す。

PGA を和光純薬社より購入したが、この市販品には完全にエステル化されていないアルギン酸分子も存在するのでこれを取り除く必要があった。そこで、本酵素により消化し、Bio-Gel P-10 によるゲル濾過を行い、エステル化されていないウロン酸を除去した。溶出パターンを Fig. 39 (A) に示す。その後高分子部分をプールし、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥により精製標品を得た。Fig. 39 (B) に透析後の溶出パターンを示す。

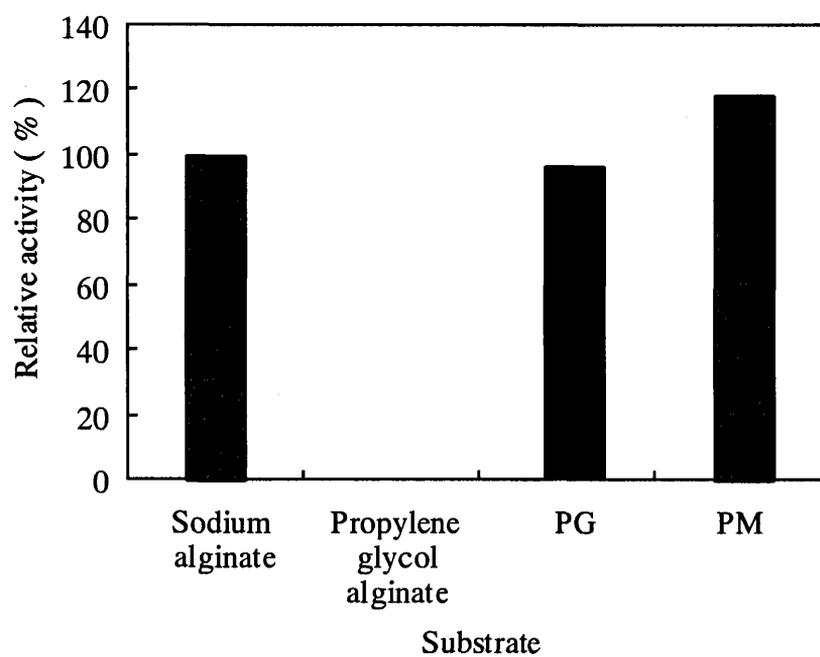
### b) 本酵素のアルギン酸プロピレングリコールに対する結合性

一般的に、アルギン酸リアーゼの反応機構は、基質であるウロン酸のカルボキシル基に酵素分子中の塩基性アミノ酸が結合し、反応が開始すると提唱されている<sup>15)</sup>。そこでこのカルボキシル基をエステル化した PGA を基質として用いて、活性の推移を調べた。その結果が Fig. 40 である。基質として、市販のアルギン酸ナトリウム、精製 PGA、PG、PM を用いた。Fig. 40 から明らかなようにエステル化アルギン酸では活性は全く認められなかった。しかし、酵素と基質の結合は起こるが、触媒反応が起こらないだけであるということも考えられたので、その結合性を酵素と基質を混合した溶液の HPLC によるゲル濾過で調べた。その結果が、Fig. 41 である。これらのグラフから明らかなように、本酵素とエステル化アルギン酸は結合そのものが起こらないことが分かった。やはり、本酵素も基質と結合する際にはカルボキシル基の存在が必須であることが示唆された。



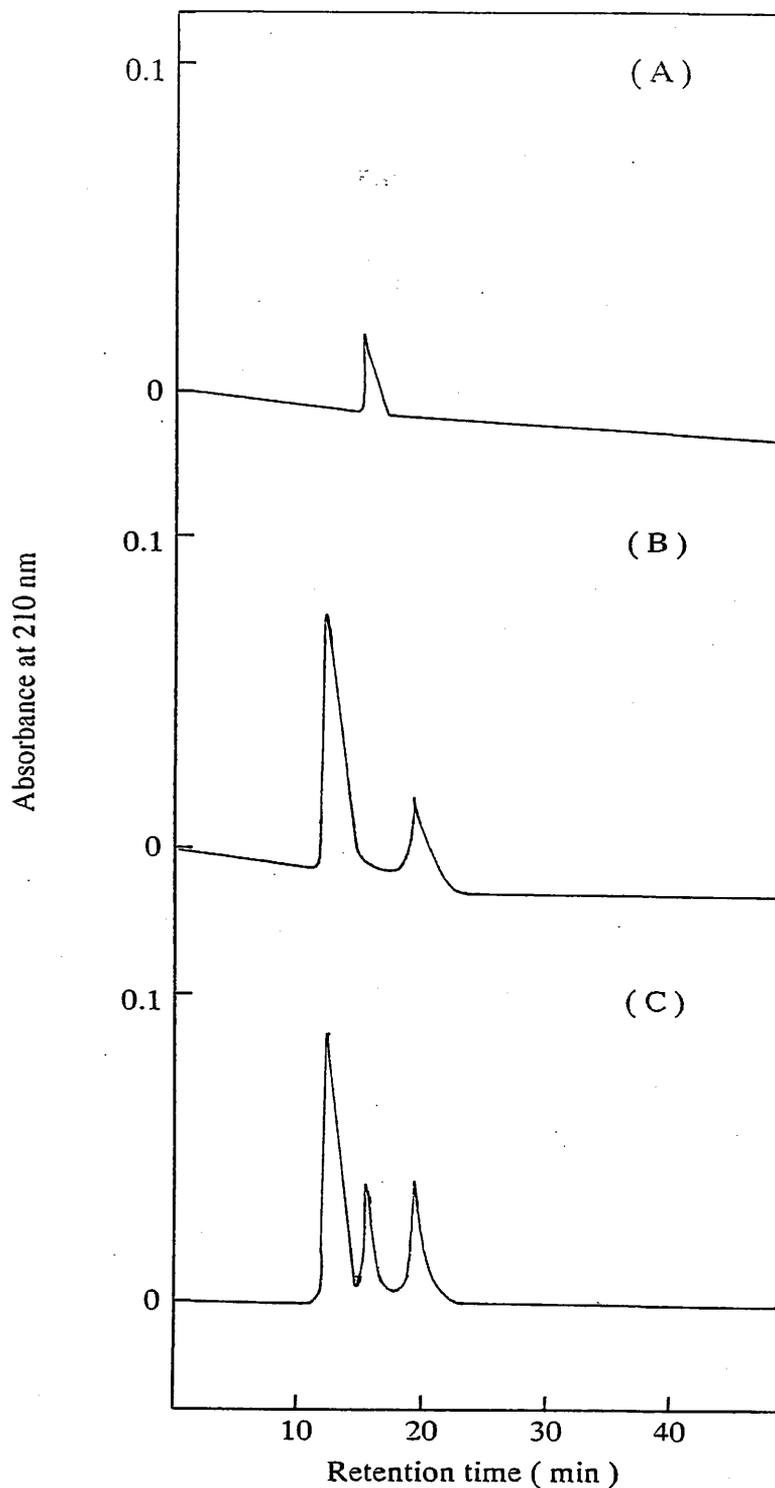
**Fig. 39.** Gel Chromatography of Enzymatic Digests of Commercial Propylene Glycol Alginate (PGA) on Bio-Gel P-10.

(A), PGA-digests with alginate lyase; (B), dialyzed PGA-digests. The enzymatic digested PGA was put on Bio-Gel P-10 column (2.5 x 95 cm). The elution buffer was 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 containing 0.1 M NaCl, and flow rate was 14.7 ml/hr. Vo shows void volume (blue dextran) and Vi shows monomer (galacturonate).



**Fig. 40.** Dependence of Alginate Lyase Activity on Different Substrates.

The reaction mixture consisted of 2.0 ml of each substrate (0.2%) in 0.1 M Sørensen's glycine II buffer, pH 8.0 was incubated at 30°C for 10 min before addition of 10 µl of the enzyme solution (19830.3 units/ml), and then the activity was assayed.



**Fig. 41.** Binding Ability of Propylene Glycol Alginate as a Substrate.

(A), Alginate lyase; (B), Propylene glycol alginate; (C), Alginate lyase and propylene glycol alginate mixture.

Column; Shodex PROTEIN KW-802.5 (8 x 300 mm)

Mobile phase; 50 mM phosphate buffer, pH 7.5

Flow rate; 0.5 ml/min

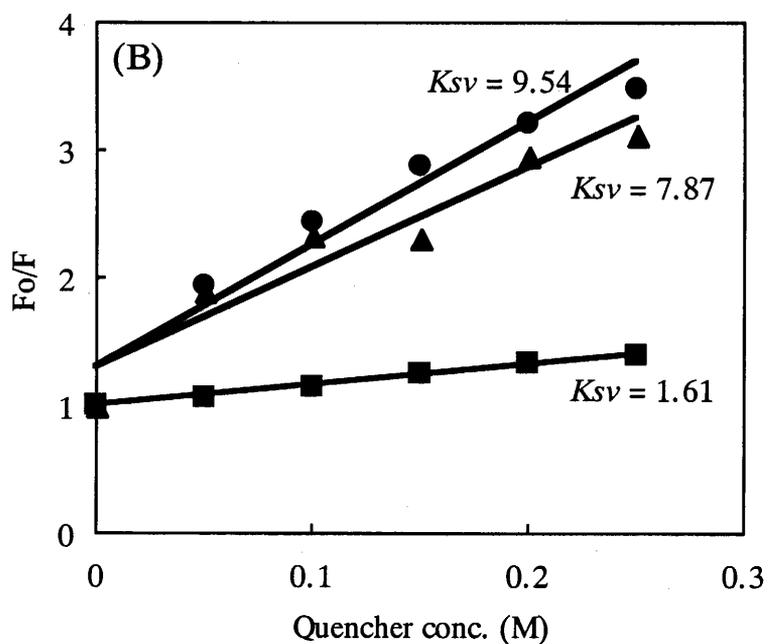
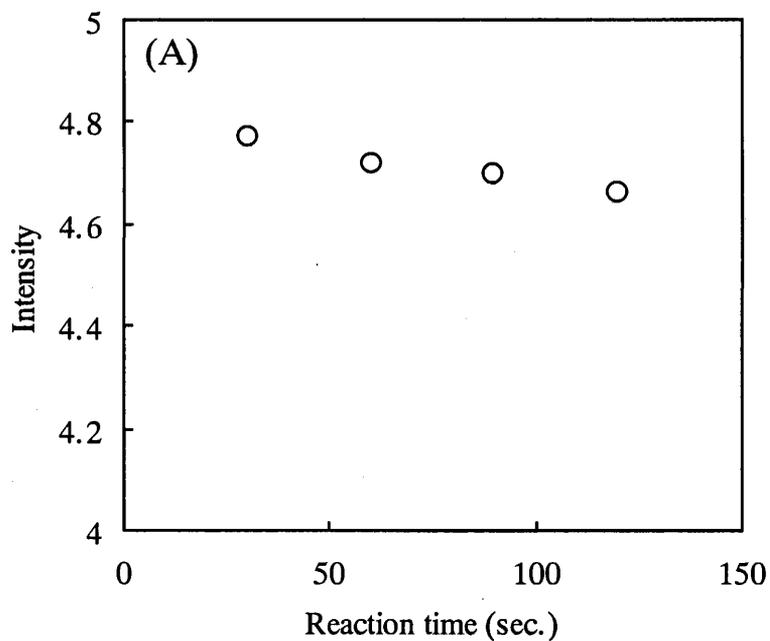
### 3. トリプトファン残基の固有の蛍光に基づく酵素と基質の相互作用

本酵素分子中に唯一存在するトリプトファン残基は、化学修飾により酵素活性の消失をもたらす。トリプトファンの固有の蛍光を利用して、トリプトファンの存在環境を調べた。特に低分子基質が共存するときのトリプトファンの存在が基質によってどのように変化するかを検討し、活性発現とその存在状態との関係を調べた。その方法として重合度の異なるオリゴマーと酵素を共存させた場合のトリプトファンの蛍光のアクリルアミドによる消光実験により求めた。もし、トリプトファン残基がタンパク質分子の表面に存在し、溶媒と自由に接触する環境にあれば、そのトリプトファンの固有の蛍光はアクリルアミドによって消光減衰する。得られた蛍光強度から Stern-Volmer の関係式 (1) を用い<sup>103)</sup>、各種の条件における蛍光の衝突消光定数を求めた。

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

ここで、 $F_0$  はアクリルアミドが存在しないときの試料の蛍光強度、 $F$  はアクリルアミド濃度が  $[Q]$  であるときの試料の蛍光強度、 $K_{sv}$  は衝突消光定数 ( $M^{-1}$ ) を示す。この  $K_{sv}$  により蛍光消光の程度を評価することが出来る。

まず、基質の存在しない条件での酵素そのものの蛍光強度を 30 秒おきに 2 分間測定しこれを基準とした。結果を Fig. 42 (A) に示す。この図から蛍光強度は時間とともに減衰しているのが分かった。そこで全ての結果は、30 秒後の蛍光強度で表すことにした。次に、溶媒と自由に接することの出来る、すなわち完全に露出したタンパク質中のトリプトファン残基のモデル化合物としての N-アセチル-L-トリプトファンアミド、RCM 化本酵素、Native-本酵素についてアクリルアミドによる蛍光消光を求め、(1) 式に当てはめて求めた直線を Fig. 42 (B) に示す。これらの直線の傾きが、それぞれの衝突蛍光定数  $K_{sv}$  を表す。その値は順に 9.54、7.87、1.61 であった。この定数が大きいほどトリプトファン残基が溶媒に接し易い環境にあることを示す。Fig. 42 (B) は、この理論に合致した結果と言える。それと同時に、本酵素分子中のトリプトファン残基の側鎖は N-アセチル-L-トリプトファンアミド、RCM 化本酵素のように溶媒に大きく露出しているのではなく、分子中に埋もれた状態にあることが分かった。



**Fig. 42.** (A) Intrinsic Tryptophan Fluorescence of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272. (B) Stern-Volmer Plots of N-acetyl-L-tryptophanamide (●), RCM-enzyme (▲), and Intact-enzyme(■) from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272.

本酵素分子中のトリプトファン残基は、基質の存在しない状態では分子の中に埋もれた状態であることが分かった。次に、基質である G、M オリゴマーの存在下で蛍光強度がどのように変化するか調べた。その場合の  $K_{sv}$  値を Table 16 にまとめた。

**Table 16.** Stern-Volmer Constants of Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 272 with Acrylamide

DP	Oligomers	
	Guluronate	Mannuronate
4	2.62	1.67
5	1.83	1.67
6	1.81	1.62
7	1.79	1.52
Polymer	1.58	1.45
Intact-enzyme	1.61	
N-acetyl-L-tryptophanamide	9.54	
RCM-enzyme	7.87	

G、M オリゴマー間には、若干の差がみられたものの、重合度が増すにつれて  $K_{sv}$  が僅かではあるが、減少する傾向がみられた。化学修飾からも活性に関与すると示唆されるトリプトファン残基の側鎖は、基質オリゴマーによって大きくマスクされることはなかった。消光剤であるアクリルアミドとの接触を許すような位置にあることが推察される。また、トリプトファン残基のインドール環のイミノ基を通じて、恐らく基質と水素結合により結合するものと考えられる。第 3 章 第 5 節の立体構造解析の結果からも、トリプトファン残基はクレフト内に位置していたが、側鎖はクレフトの外側に配向しており、部分的に溶媒との接触を許す部位にあった。