

9330 高濃度の塩類存在下におけるサーモライシンの顕著な活性化と安定化の分子機構

助成研究者:井上 國世(京都大学 農学部)

サーモライシン (TLN) は好熱性の中性金属プロテイナーゼである。我々はTLNが高濃度の中性塩の存在下に活性と安定性の著しい増大を受けることを見出し、本酵素が「好熱性酵素」としての性質を持つことを報告した。例えば、反応液中のNaCl濃度を上昇させるにつれて活性は指数関数的に増大し、4.5 M NaCl存在下ではNaCl非存在下の場合に比べ15倍になる。また、TLNの熱失活の活性化エネルギーは1~2 M NaClの存在下において2倍増大する。我々は中性塩によるTLNの活性と安定性の増大の分子論的説明を目的に研究を進めている。本研究では塩により引き起こされるTLNの吸収差スペクトルを測定し、本酵素の好塩性との関係を探ろうとした。

TLNと1~5 M NaClを混合すると270~300 nmに芳香族アミノ酸の赤色移動に基づく吸収差スペクトルが観察され、とくに293 nm付近にトリプトファン残基 (W) の荷電効果に特徴的なピークが現れた。TLNの活性部位に結合する拮抗阻害剤ホスホラミドンとジンコフで完全に阻害されたTLNにNaClを加えて差スペクトルを観測したところ、293 nmのピークは消失した。このことから、NaClが荷電効果を及ぼすトリプトファン残基はTLNの活性部位にあり、阻害剤によりNaClから保護されることが示唆された。TLNには3個のトリプトファン残基があり活性部位にはトリプトファン残基115 (W115) が存在する。すなわち、NaClの添加により観察された293 nmの差吸収変化はW115に対するNaClの相互作用により生じたものと考えられる。NaClと同程度の活性増大効果を及ぼすNaBrについて同様に吸収差スペクトルを測定した。芳香族アミノ酸の環境変化を示す赤色移動の差スペクトルが観察されたが、293 nmのピークは現れなかったことから、NaBrはW115と相互作用ができないことが示唆された。KClやLiBrでも293 nmピークが現れたのに対してKBrやLiBrでは観測されなかった。すなわち、293 nmピークの出現は塩素イオンと臭素イオンのちがいに依存することが明らかとなった。

塩素イオンと臭素イオンの水和半径はそれぞれ2.24 Åおよび2.33 Åと算出され、この微小の差により、塩素イオンはW115と相互作用しうるが、臭素イオンは相互作用できないと考えられる。TLNのX線構造解析によると、W115は活性部位のサブサイトS2に位置し、水素結合を介して基質を保持することが示されている。W115の水分子 (半径 1.4 Å) との接触率は15%であり、このW115存在状態は塩素イオンと臭素イオンの微小の差により明確に識別されることが示された。NaClとNaBrはTLNを同程度活性化させることから、両イオンとW115との相互作用が活性化に直接関係することは考えられないが、TLNの基質保持に必須のW115の存在状態を明かにすることができた。

9330 高濃度の塩類存在下におけるサーモライシンの顕著な活性化と安定化の分子機構

助成研究者:井上 國世(京都大学 農学部)

1. 研究目的

中等度好熱菌バチルス・サーモプロテオリティカスの産生する中性金属プロテイナーゼであるサーモライシン (thermolysin) は好熱性酵素であり、広範な研究がなされてきた (1)。近年、本酵素はペプチド合成における有用性が注目され、とりわけ人工甘味料アスパルテームの合成を目的として集中的な研究がなされてきた (2)。

我々はサーモライシンを酵素化学的に研究する中で、活性、安定性、溶解度などの基本的な性質が種々の塩類の存在下において大きく変動することを見出し報告してきた (2、3)。例えば、N-フリルアクリロイル-グリシル-L-ロイシニアミド (FAGLA) やN-カルボベンゾキシ-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル (ZAPM) の加水分解活性に関して言うと、反応溶液中に中性塩 (NaCl、NaBrなど) を添加すると酵素活性は添加した塩濃度に依存して指数関数的に増大することが見い出された (3)。この活性効果は添加した塩の種類に依存するが、陰イオンについては $\text{Cl}^- = \text{Br}^- > \text{I}^-$ 、陽イオンについては $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ の順になる。NaClとNaBrは最も著しい活性増大を引き起こし、4.5 Mの塩の添加時には約15倍の活性増大が認められる。一方、これらの中性塩の存在下にサーモライシンの熱安定性が大きく増大することを見出した。例えば、FAGLAの加水分解活性を指標として熱安定性を求めると熱失活の活性化エネルギーは、1~2 M NaClの存在下では塩を含まない場合に比べて約2倍に増大し、4.5 M NaCl存在下でも塩を含まない場合とほぼ同程度の活性化エネルギーを与える (4)。

我々は高濃度の塩類により引き起こされるサーモライシンの安定化と活性化に興味を持ち、その分子機構の解明を目的に研究を進めている。本研究では、紫外吸収差スペクトル法を用いて、塩素イオンと臭素イオンがサーモライシンに対して異なる分光学的効果を及ぼすことを見出し、これが活性部位のトリプトファン残基 (W) 115との相互作用の違いに基づくことを示す。

2. 研究方法

2. 1. 研究材料

サーモライシン結晶標品は大和化成工業 (株) より購入した。サーモライシン濃度は吸光係数 A (1 mg/ml、277 nm) = 1.83 および分子量34,600から算出した。基質FAGLAはペプチド研究所より購入した。FAGLA濃度は分子吸光係数 ϵ (345 nm) = $766 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ により

決定した。サーモライシン阻害剤であるホスホラミドン (phosphoramidon) およびジンコフ (zincov) はそれぞれペプチド研究所およびカルビオケム社より購入した。N-アセチルトリプトファンアミドおよびN-アセチルチロシンアミドはシグマ社製を用いた。

2. 2. FAGLAの加水分解反応

サーモライシンによるFAGLAの加水分解は10 mM CaCl_2 含有40 mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.5 (標準緩衝液)、25°Cにおいて、345 nmの吸光度の減少により追跡した。加水分解したFAGLA量は $\Delta \epsilon (345 \text{ nm}) = -310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した。

2. 3. 紫外部吸収差スペクトル

サーモライシンまたはモデル化合物 (N-アセチルトリプトファンアミドおよびN-アセチルチロシンアミド) と中性塩とを標準緩衝液中、25°Cで5分間インキュベートし、紫外部吸収差スペクトルを測定した。ダブルタンデム・セル系を用いた。個々のセルの光路長は10 mmであった。

2. 4. ホスホラミドンおよびジンコフによるサーモライシンの阻害

サーモライシンとホスホラミドンまたはジンコフと混合し、25°C、1時間、標準緩衝液中でインキュベートした。酵素-阻害剤混合液 (0.1 ml) を2.0 ml FAGLA溶液に加えて酵素活性を測定した。反応溶液中において、サーモライシンは50 nM、ホスホラミドンは0~79 nM、ジンコフは0~800 nMであった。

3. 結果

3. 1. サーモライシンと塩の混合において観測される紫外部吸収差スペクトル

サーモライシン (7.9 μM) とNaClを標準緩衝液中、25°Cにおいて混合したとき、紫外部吸収差スペクトルが観測され、273、282および293 nmにピークが現れた (図1)。それぞれのピークにおける差スペクトル強度はNaCl濃度 (0~3.2 M) の増大に伴い比例的に増大した。

サーモライシン (9.8 μM) とNaBrを標準緩衝液中、25°Cにおいて混合したとき、同様に紫外部吸収差スペクトルが観測された (図2)。このときにも、NaClで観測された274 nmと282 nmのピークが観測されたが、293 nmには明確なピークは観測されず小さな肩が生じた。274および282 nmの差吸光度はNaBr濃度 (0~3.5 M) の増大に比例して増大した。

他の塩 (KCl、KBr、LiCl、LiBr) を用いて、サーモライシンとの混合により生じる紫外部吸収差スペクトルを観測した。NaClのときと同様、KClとLiClでは293 nmにピークが観測されたが、NaBrのときと同様、KBrとLiBrでは293 nmにピークは観測されなかった。すなわち、293 nmのピークは塩素イオンに対して共通に現れ、臭素イオンに対しては現れないことが示された。

3. 2. モデル化合物の紫外部吸収差スペクトル

N-アセチルトリプトファンアミドとN-アセチルチロシンアミドの2種のモデル化合物に

ついてNaClあるいはNaBrを添加したときに生じる紫外部吸収差スペクトルを観測した。いずれのモデル化合物についても、NaClとNaBrは極めてよく類似した差スペクトルを与えた。N-アセチルトリプトファンアミドについては283.5 nmと291 nmにピークを生じ、272 nmに肩を、また287 nmに谷をした。N-アセチルチロシンアミドでは271 nmと281 nmにピークを、286 nmに谷を示した。いずれのピークにおける差吸光度も塩濃度の3.5 Mまでの増大に伴い比例的に増大した。NaClおよびNaBrによりN-アセチルトリプトファンアミドにおいて引き起こされた291 nmの大きいピークは、サーモライシンにおいて観測された293 nmのピークに大きく寄与するはずである。NaClとNaBrはモデル化合物に対して類似の差スペクトルをもたらすことから、サーモライシンに対してNaClとNaBrによって引き起こされた293 nmの差スペクトル強度の違いは、サーモライシンの蛋白質構造に基づいているものと考えられる。すなわち、NaClとサーモライシンとの混合により観測された293 nmの差吸収は酵素のトリプトファン残基と塩素イオンとの相互作用に起因するものであり、このトリプトファン残基と臭素イオンとの相互作用は強く抑制されていることが示唆された。

3. 3. サーモライシンとNaClとの混合において観測される差スペクトルに対するサーモライシン拮抗阻害剤の効果

サーモライシンとホスホラミドンとの混合液およびサーモライシンとジンコフとの混合液にNaClを加えたとき生じる紫外部吸収差スペクトルを観測した。サーモライシンにより触媒されるFAGLA加水分解反応に対するホスホラミドンとジンコフの阻害物定数 K_i はpH 7.5、25°Cにおいて、それぞれ10 nMと180 nMと求められた。サーモライシン9 μ Mに対してホスホラミドン13 μ Mあるいはジンコフ16 μ Mを混合して調製した酵素-阻害剤混合物はFAGLA加水分解活性を示さなかった。この混合物にNaCl (0~3.5 M) を添加して生じる紫外部吸収差スペクトルを観測した。阻害剤の存在しないときに観測された293 nmのピーク（図1）はほとんど消失し、差スペクトル全体の形状はむしろサーモライシンとNaBrの混合により得られたもの（図2）に似ていた。

4. 考察

サーモライシンは3個のトリプトファン残基(W)を含んでおり、そのうちの1つW115が活性部位に存在する。基質のP2部位はW115の骨格と水素結合を形成することにより活性部位に固定されることがX線構造解析から知られている(5)。ホスホラミドンやジンコフはP2部位を有しないので完全にW115を覆うわけではないがW115との間で部分的な相互作用を引き起こすことが知られている(未発表データ)。

モデル化合物を用いる解析から293 nmのピークはトリプトファン残基の電荷効果による赤色移動によると考えられる。すなわち、問題のトリプトファン残基の負電荷からの距離が減少あるいは正電荷からの距離が増大することが考えられる。

本研究において、塩素イオンはサーモライシンと相互作用して293 nmのピークを引き起

こし、サーモライシンの拮抗阻害剤の存在下にこのピークが消失することから、塩素イオンが相互作用するのは活性部位トリプトファン残基W115であると考えられる。サーモライシンとNaBrとの混合による差スペクトルが阻害剤存在下のサーモライシンとNaClとの混合による差スペクトルによく似てることから、臭素イオンは阻害剤の存在しない場合にもW115と相互作用できないことが示された。言い換えると、W115の存在状態は塩素イオンと臭素イオンの微小の差により区別される。

塩素イオンと臭素イオンの水和半径はそれぞれ $2.24 \pm 0.18 \text{ \AA}$ および $2.33 \pm 0.16 \text{ \AA}$ と算出され、このわずかな違いにより塩素イオンはW115と接触できるが、臭素イオンは接触できないことになる。サーモライシンのX線構造解析(5)によるとW115の水分子との接触面積は遊離のトリプトファンのそれに比べて15%である。すなわち、W115は大部分埋もれて存在するが、そのわずかに溶媒に対して顔を出している部分に対して塩素イオンは接触できるが臭素イオンは接触できないことを示している。W115以外のトリプトファン残基であるW55とW186の水との接触面積はそれぞれ5%と10%である。塩素イオンがこれらと接触しうるか否かに関しては、293 nmのピークが拮抗阻害剤の存在下にほぼ完全に消失したことから、接触はできないものと判断される。

本研究では、サーモライシンの活性部位のW115の存在状態が塩素イオンと臭素イオンの微小の差により明瞭に認識されることを示した。サーモライシンはNaClとNaBrにより顕著な活性の増大をうける。しかも、その活性化の度合は同程度である。このことは活性部位S2サブサイトにあるW115と陰イオンとの相互作用は活性化に直接影響を与えるものではないことを示唆している。一方、本研究は、塩類が蛋白質中の芳香族アミノ酸、とくにトリプトファン残基の存在状態の解析に優れていることを示すものである。従来、このような目的には、エチレングリコールなどのアルコール性溶媒を用いる紫外外部吸収差スペクトルに対する溶媒効果が広く用いられてきた(6)。アルコール性溶媒の分子半径は、蛋白質中の芳香族性残基の存在状態を記述するには大きすぎる欠点があり、今後、塩類による溶媒効果法(solvent perturbation)がより検討されることが望まれる。

5. 今後の課題

本研究の究極の目的はNaClやNaBrをはじめとする各種中性塩によるサーモライシンの著しい活性増大の分子機構の解明である。活性増大の原因としては、(A)サーモライシンの構造変化による高活性型への変換、および(B)溶媒の性質の変化が酵素反応の素過程に及ぼす影響の2面を考えることができる(7)。(A)については、本報告で述べたように紫外外部吸収差スペクトル法を用いて、蛋白質の芳香族アミノ酸の状態変化を検出することが可能であり、今後この方向での差スペクトル解析を進める。同時に、蛍光や円二色性、核磁気共鳴スペクトルを用いて、高濃度の中性塩によるサーモライシンの構造変化を記述し、活性増大との関連性を探る予定である。(B)に関しては、高濃度の塩類による溶媒の誘電

率と疎水性に対する影響に着目し、サーモライシンの触媒反応の素過程（基質の結合、アシル化、脱アシル化、生成物の離脱）に対するこれらの効果を検討する予定である。本研究で対象としている塩の濃度は飽和濃度に近いものであり、通常の物理化学で記述される濃度を大きく逸脱している。本研究は、従来、物理化学の言葉で記述されることのなかった濃厚塩溶液における酵素反応を定量的に表現する試みである。

6. 文献

1. Endo, S. (1962) *J. Ferment. Technol.* 40, 346-353.
2. 井上國世、橋本 勉 (1980) *生化学* 52, 730.
3. Inouye, K. (1992) *J. Biochem.* 112, 335-340.
4. 葛谷桂子、井上國世、外村辨一郎(1992) *生化学* 64, 722.
5. Hangauer, D.G., Monzingo, A.F., and Matthews, B.W., (1984) *Biochemistry* 23, 5730-5741.
6. Inouye, K., Tonomura, B., Hiromi, K., Sato, S., and Murao, S. (1977) *J. Biochem.* 82, 1207-1215.
7. 井上國世 (生化学) *生化学* 66, 446-450

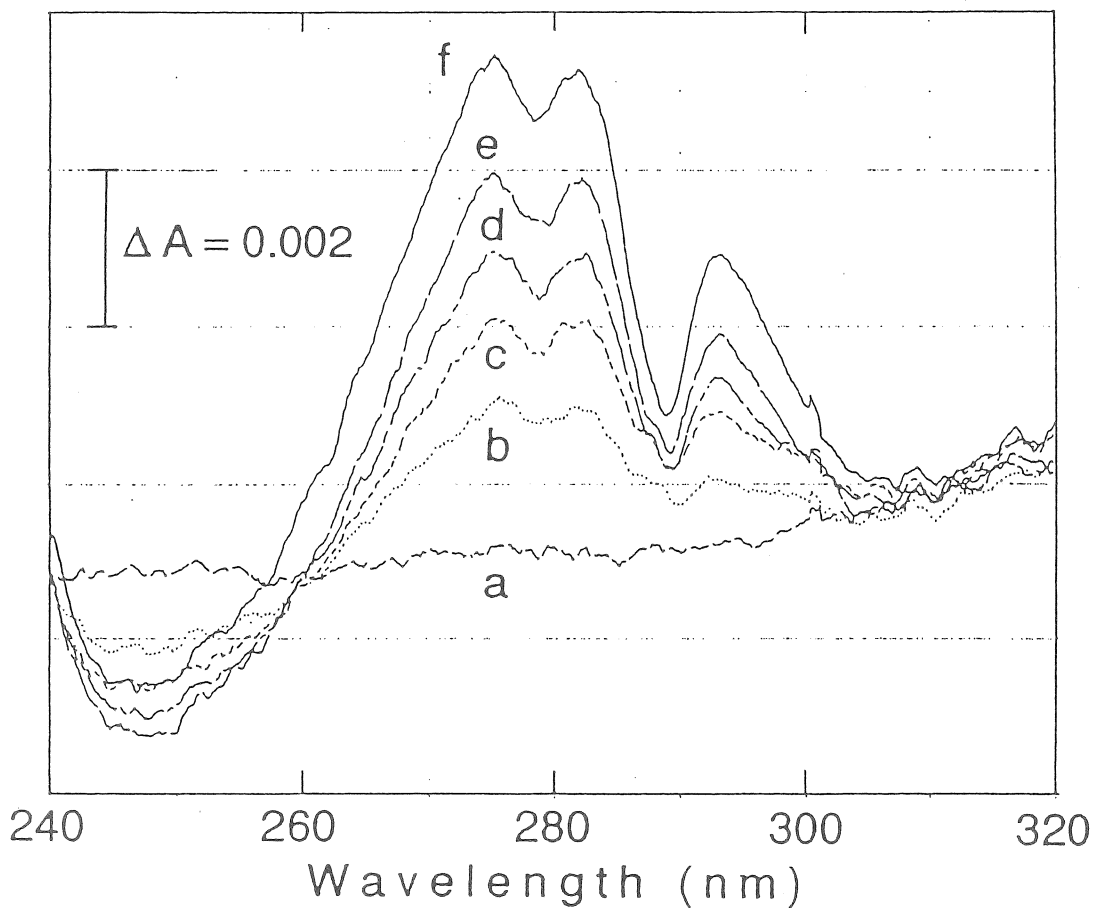


Fig.-1. UV absorption difference spectra observed on the mixing of thermolysin and NaCl.

[thermolysin] = $7.9\mu\text{M}$,

[NaCl] = a, 0; b, 0.5; c, 1.0; d, 1.5; e, 20;

and f, 2.5 M.

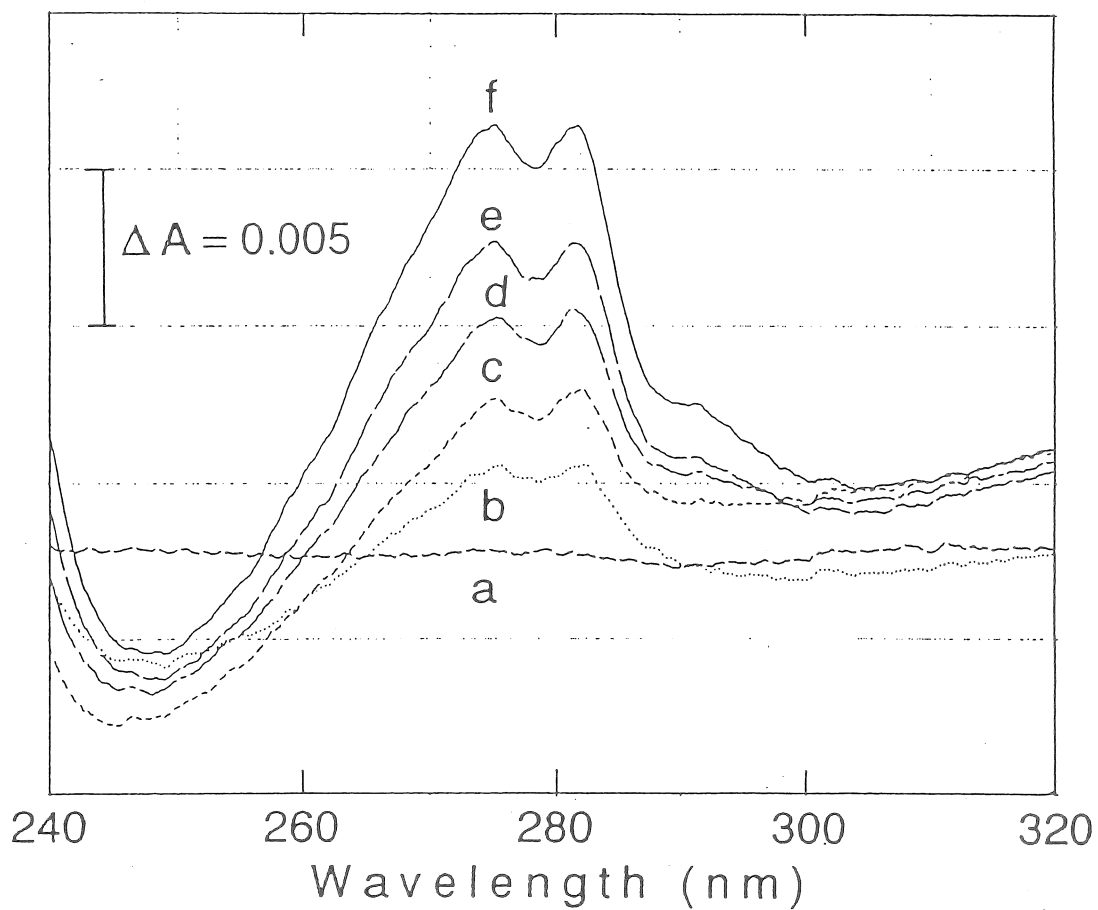


Fig.-2. UV absorption difference spectra observed on the mixing of thermolysin and NaBr.

[thermolysin] = $7.9\mu\text{M}$,

[NaBr] = a, 0; b, 0.5; c, 1.0; d, 1.5; e, 20;

and f, 2.5 M.

Molecular Mechanism on the Remarkable Activation and Stabilization of
Thermolysin in the Presence of High Concentration of Salts

Kuniyo Inouye

Department of Food Science and Technology,
Faculty of Agriculture, Kyoto University

S u m m a r y

The activity of thermolysin is greatly enhanced in the presence of high concentration of neutral salts. NaBr and NaCl are the most effective in the activation. An absorpoin difference spectrum having a peak around 293 nm was observed on mixing thermolysin with NaCl. As the peak disappeared in the presence of competitive inhibitors of the enzyme the peak was considered to be derived from a tryptophyl residue (Trp 115) located at the active site of the enzyme. This peak was not observed on the mixing of thermolysin and NaBr, suggesting that a slight difference in size between chloride and bromide ions is critical in the interaction with the tryptophyl residue.