

## 9 6 5 2 好塩性酵素サーモライシンの構築原理と機能発現の分子論的説明

助成研究者：井上 國世(京都大学 農学部)

サーモライシンは *Bacillus thermoproteolyticus* の産生する中性金属プロテイナーゼであり、三次元的な立体構造解析を含め詳細な酵素化学的知見が蓄積されている。われわれは本酵素の活性が数 mole/L におよぶ高濃度の塩類存在下に数十倍にも活性化を受けることを見出し、本酵素が典型的な好塩性酵素であること報告してきた。本研究では、この活性化を付与する構造上の特徴と機能発現の原理について分子論的なアプローチを試みた。

塩によるサーモライシンの活性化をpHや温度および媒質に添加したアルコール濃度を変化させて検討した。活性はベル型のpH依存性を示し、至適pHは7.0であった。NaClを0から4Mへ添加すると酸性側解離基のpKaは5.4から6.7へ増大したが、アルカリ側解離基のpKa(=7.8)は変化しなかった。一方、4M NaCl存在下の活性と0M NaCl存在下の活性との比(活性化度)は中性で最大(16倍)となるベル型を示し、pH 6と9ではほぼ2倍となった。活性化度は酵素の解離基の状態に著しく依存し、全電荷数は少ないが、正負電荷が混在する中性で高い活性化度を与え、いずれかの電荷のみが多数を占める酸性やアルカリ性では活性化度は小さい。中性において、温度を5から35℃まで上昇させると、酵素活性は上昇するが活性化度は逆に20倍から4倍に減少した。アルコールを添加すると、アルコール濃度と炭素数の増大につれ活性化度は減少した。温度の上昇、アルコールの濃度と炭素数の増加に伴い溶媒の誘電率は低下し、酵素表面における静電的相互作用(反発と引力)を強化させる。高濃度の塩の存在下において溶媒のイオン強度や誘電率に支配される酵素とイオンとの相互作用がサーモライシンの塩による活性化に影響を及ぼすと考えられる。

サーモライシンに存在する28残基のチロシン残基(Tyr)の存在状態をpHジャンプ法とpH依存的な滴定により決定した。Tyrをニトロ化およびアミノ化してイオン化の割合を変化させ、塩による活性化度を調べた。ニトロ化により負電荷を導入すると活性化度は低下したが、ニトロTyrが非解離のpH域では活性化度に変化は見られなかった。これを還元的にアミノ化すると活性化度は未修飾酵素のレベルに回復した。すなわち、塩による顕著なサーモライシンの活性化は分子表面に負電荷を導入するほど低下することが示され、酵素表面の静電的相互作用が活性に深く関連することが示唆された。



## 9652 好塩性酵素サーモライシンの構築原理と機能発現の分子論的解明

助成研究者：井上 國世(京都大学 農学部)

## 1. 研究目的

サーモライシンは中等度好熱性細菌 *Bacillus thermoproteolyticus* の生産する好熱性の中性金属プロテイナーゼであり、三次元構造をはじめ詳細な酵素化学的研究が蓄積されている。本研究者はサーモライシンを用いるペプチド合成研究に従事する中で、本酵素活性が溶媒中に添加した中性塩の濃度と種類に依存して数十倍にも増大することを見出した。すなわち、合成基質である Carbobenzoxy (Z)-Asp-Phe methyl ester (ZAPM) および Purylacryloyl (FA)-Gly-Leu amide (FAGLA) の加水分解活性は「数 M」レベルの中性塩(例: NaCl)の添加に対して指数関数的に増大し、飽和濃度(5 M)では約 50 倍の活性増大が認められた(1, 2)。サーモライシンはこれらの塩の存在下に安定であり、本酵素は高度の「好塩性酵素」とであると判断した。本研究者は、酵素の新しい機能分類として「好塩性酵素」を提唱した(3)。すなわち、サーモライシンは「好熱性」と同時に「好塩性」を合わせ持つ興味深い酵素である。サーモライシンの塩による活性化は「酵素活性発現の分子機構」を理解する上で重要な指標になるものと考えられる。

異常環境に生きる微生物、特に好熱性微生物に関心がもたれ、多くの好熱性細菌が単離され広く利用されているが、好塩性酵素という概念は未だ十分定着しているとは言えない。サーモライシンは好塩性微生物に由来する酵素ではないが、好塩性酵素の構造と機能を研究する上で、好個の研究材料になると考えられる。好塩性をもたらす構造原理を解明すると共に、酵素の構造形成と機能発現の機構を理解する上で興味深い。また、酵素の工業的利用において、安価な塩類の添加により酵素のコストを低減できることはきわめて大きい魅力である。

異常環境下の酵素反応に関心が持たれているが、高濃度塩類存在下の酵素化学的研究はほとんどなされていない。また、物理化学は従来、希薄溶液における現象を取り扱っており、本研究で対象とするような数 M レベルの塩濃度における物理化学は十分確立されているとは言えない。現在までに、報告されている文献から、ヌクレアーゼH、ペプシン、HI V ウイルス・プロテアーゼが、サーモライシンよりは弱いものの好塩性酵素であると判断できる。これらはいずれも高濃度の塩類存在下で本来の生理的活性を示すものとは考えられず、サーモライシンと同様その好塩性の意義は不明である。「好塩性微生物」という概

念は古くから定着している。その性質を植物に移入して、塩環境下で生育可能な植物を創製しようとする考え方もある。一般に、好塩性微生物の細胞内はグリセロールやベタインなどの物質により高張に保たれており、細胞内酵素は好塩性である必要がない。しかし、細胞表層や菌体外酵素は好塩性であると考えられており、これらの酵素に関してより詳細な検討を加えたいと考えている。

## 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  $A(1 \text{ mg/ml}, 277 \text{ nm})=1.83$  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。それ以外の基質は合成した。FA-ペプチド基質の濃度は345 nmにおける分子吸光係数  $766 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  により決定した。

### 2. 2. FA-ペプチド基質の加水分解

サーモライシンによるFA-ペプチド基質の加水分解は10 mM  $\text{CaCl}_2$ 含有トリス塩酸緩衝液、pH 7.5(標準緩衝液)、25℃において345 nmの吸光度の減少より追跡した。加水分解したFAGLA量は分子差吸光係数  $-310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いて算出した。

### 2. 3. チロシン残基のニトロ化およびアミノ化

サーモライシンのチロシン残基をテトラニトロメタン(TNM)を用いて、定法に従い修飾した。また、ニトロチロシンを亜ジチオン酸ナトリウムを用いて還元し、アミノチロシンに変換した。ニトロチロシンおよびアミノチロシン残基数は分光学的に決定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1. 塩類によるサーモライシンの活性化の基質特異性 (4)

FA-X-Y-amide を基本型とした基質において、XおよびYのアミノ酸残基がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンの順に変化した基質を有機化学的に合成した。「良い基質」と「悪い基質」では、活性に1万倍程度の差が生じる。しかし、塩類による活性化の程度は検討したすべての基質で同じであり、活性化は切断部位ペプチド結合のアミノ酸残基には依存しないことが示された。切断部位のアミノ酸残基の疎水性が大きいほど活性は大きく、これはハンシュ・フジタの線形関係で現された。塩類添加において、この線形関係の傾きは変化せず、塩は基質と酵素活性中心との相互作用に直接関与しないことが示唆された。

本研究者は、塩による活性化が分子活性  $k_{cat}$  にのみ依存し、ミカエリス定数  $K_m$  には依存しないことを、基質 ZAPM を用いて示した。今回、FA-X-Y-amide 基質において FA-Leu-Ala-amide および FA-Phe-Ala-amide で同様の結果が得られたことから、基質に依存せず、塩によるサーモライシンの活性化は分子活性の増大のみに起因することが示唆された。

FA-Gly-Leu-amide (FAGLA) を代表的な基質とする FA-X-Y-amide の場合、基質の小さい溶解度のゆえに酵素活性を分子活性とミカエリス定数に分離することが困難であり、特異性定数 ( $k_{cat}/K_m$ ) で評価した。本定数はフリーの酵素 (E) とフリーの基質 (S) が生成物を作るときの見かけの2次反応速度定数、すなわち、基底状態 (E+S) と遷移状態 (ES\*) の間の平衡定数である。(E+S) と (ES\*) の間のギブス自由エネルギーの差  $\Delta G^*$  は特異性定数と関係付けられる。NaCl 1 M 増大することに  $\Delta G^*$  は 0.37 kcal/mol 減少し、NaCl 4 M 添加すると 1.5 kcal/mol 減少する。

FA-X-Y-amide において、Xは P1' 残基、Yは P1 残基と呼ばれる。直鎖の脂肪酸を側鎖にするアミノ酸の場合、P1' 残基の疎水性が1単位増大すると、 $\Delta G^*$  は 2.6 kcal/mol 減少し、P1 残基では 1.0 kcal/mol 減少することが示された。分岐のあるアミノ酸側鎖や芳香性の側鎖の場合、この減少量はそれぞれ2倍および3倍になることが明らかになった。

### 3. 2. サーモライシンの塩による活性化におけるカチオンとアニオンの効果

NaCl; NaBr; KCl; KBr; LiCl; LiBr を用いて、活性化に対するイオンの効果を比較した。カチオンでは  $Na^+ > K^+ > Li^+$  の順となり、アニオンでは  $Cl^- > Br^-$  の順となった。アニオンではイオン半径が小さい方が活性化効果が大きいことが示唆されたが、カチオンでは活性化とイオン半径 ( $Na^+ < Li^+ < K^+$ ) との間に直接的な関係が認められなかった。K<sup>+</sup> イオンは、イオン半径の大きさに基づく不利を克服するだけの要因 (たぶん、特異的結合) があるものと推定できる。

FA-Leu-Ala-amide を基質として、1 M NaCl, KCl, LiCl による活性化を比較した。塩の有無に拘わらず、ミカエリス定数は一定 (0.80 mM) であるが、分子活性は 1.20, 1.12, 0.91 (1/s) と求められた。塩濃度の増大につれ、NaCl, KCl では酵素活性は指数関数的に増大するが、LiCl では 2-3 M まで酵素活性の増大が認められるが、それ以上では活性は低下し、ベル型の塩濃度依存性を示した。LiCl とそれ以外の塩との活性化挙動の差は、塩によるサーモライシンの活性化の機構を解明する上で貴重なヒントを与えるものと考えられる。

イオンのまわりの水和分子数は Li では K, Na より多いと考えられる。このことは、イオン半径が小さいことに起因する以上に、水和イオン半径を大きいものにし、結果的に水和イオンの表面の電荷密度を小さいものに行っている可能性がある。本研究者が考えてる、塩による活性化の原因は、水和イオンが酵素分子表面の荷電性アミノ酸に結合し、酵素の

周りに厚い水和層を形成する。このことが酵素を安定化するのではないかと考えている。すなわち、サーモライシンには高活性型 (H) と低活性型 (L) の分子形があり、水和イオンの結合により、高活性型のポピュレーションが増大するのではないかと考えられる。現在、この作業仮説を証明すべく、検討を始めている。

### 3. 3. サーモライシンの溶解度と分子量に対する塩類の効果

サーモライシンは通常の緩衝液では、1 mg/mL程度の溶解度である。塩類添加により溶解度は飛躍的に増大する。水の構造を破壊すると考えられている塩で溶解度は増大したことから、サーモライシンは極度に疎水的な蛋白質であると考えられる。低角度レーザー散乱装置により、塩類存在下の分子量を測定した。塩類の有無にかかわらず、分子量は 35000 であり、解離会合は認められなかった。

サーモライシンの溶解度に対する塩の効果は、離液系列に従うものであり、水の構造破壊により、溶解度が増大することが示された。1 M の塩の添加により、最大70-100 mg/mLにも溶解度が増大する。しかし、溶解しているサーモライシンは単量体であり、可溶化状態での会合は認められない。サーモライシンの溶解度の塩による増大と活性増大は直接関連する現象ではない。しかし、塩により溶解度が増大することと活性が増大することとは、本酵素を工業的に利用しようとする場合、極めて有用な性質である。

本研究では、直接検討しなかったが、われわれは予備的ながら、サーモライシンの熱安定性が高濃度の塩類存在下に上昇することを見出ししている。すなわち、熱変性の活性化エネルギーは、塩の存在しない場合に比べて、2 M NaCl 存在下では、2倍に増大し、4 M NaCl 存在下でも塩が存在しない場合よりもわずかではあるが大きかった。酵素活性、溶解度 (酵素量)、熱安定性のいずれの点においても、塩の添加は、サーモライシンの効率的な機能発現に有益であることが示された。

### 3. 4. サーモライシンの好塩性に対する静電的相互作用の関与 (5)

塩によるサーモライシンの活性化を、pH や温度および媒質に添加したアルコール濃度を変化させて検討した。サーモライシンの活性はベル型の pH 依存性を示し、至適 pH は 7.0 であり、活性解離基として Glu 143 ( $pK_{a1}=5.4$ ) と His 231 ( $pK_{a2}=7.8$ ) が関与する。NaClを0 から 4 M へ添加すると、 $pK_{a1}$  は 5.4 から 6.7へ増大したが、 $pK_{a2}$  は変化しなかった。一方、4M NaCl 存在下の活性と 0M NaCl 存在下の活性との比を塩による「活性化度」と定義した。これは中性で最大 (16倍) となるベル型であり、pH 6 と9 ではほぼ 2 倍の活性化度を示した。活性化度は酵素の解離基の状態に著しく依存し、全電荷数は少ないが、正負電荷が混在する中性で高い活性化度を与え、いずれかの電荷のみが多数を占める酸性やアルカリ性では活性化度は小さい。中性において、温度を 5 から 35°C まで上昇させると、酵素活性は上昇するが活性化度は逆に 20 倍 から

4 倍に減少した。アルコールを添加すると、アルコール濃度と炭素数の増大につれ活性化度は減少した。温度の上昇、アルコールの濃度と炭素数の増加に伴い溶媒の誘電率は低下し、酵素表面における静電的相互作用（反発と引力）を強化させる。高濃度の塩の存在下において溶媒のイオン強度や誘電率に支配される酵素とイオンとの相互作用がサーモライシンの塩による活性化に影響を及ぼすと考えられる。

サーモライシンの等電点 pI は pH 5 付近にある。すなわち、この pH 領域で酵素に含まれる電荷は最低になる。至適 pH（中性）では、相対的にマイナス電荷が増大することになる。塩による活性化度が中性付近で最大になることから、マイナス電荷の相対的な増大（マイナス電荷の増大、プラス電荷の減少）により、活性化度は上昇する可能性が考えられる。アニオンである Cl, Br による活性化に対する効果には大きい差がない。すなわち、酵素分子表面のプラス電荷は活性化にそれほど大きい効果をもたらさないことを示唆する。一方、カチオン（K, Na, Li）の種類により、活性化度に大きい差が現れることから、酵素分子表面のマイナス電荷（アスパラギン酸、グルタミン酸など）とイオンとの正の相互作用（引力）が、あるいは、プラス電荷（リジン、アルギニンなど）との負の相互作用（反発）が塩による活性化に重要であることが示唆される。

今後の課題として、分子表面へマイナス電荷やプラス電荷を導入することにより、活性化度が増大する可能性を検証する必要がある。電荷の導入法としては、部位特異的変異導入、化学修飾、変異剤で得た変異酵素の利用を考える。

溶媒の誘電率の低下により、分子表面における静電的相互作用が増大することが期待される。誘電率の低下により、活性化度が低下した。すなわち、静電的相互作用（引力、反発）が大きいほど、活性化度は小さいと考えて良い。酵素分子表面の「マイナス電荷の相対的増大（マイナス電荷の増加、プラス電荷の減少）」が活性化度を上昇させたことを考慮すると、マイナス電荷の増加がカチオンとの引力、アニオンとの反発を増大させる、あるいはプラス電荷の減少がカチオンとの反発、アニオンとの引力を減少させる可能性がある。

いずれがより可能性が高いかを考察する。アニオンに比べカチオンが活性化度に大きい効果を示すことから、塩によるサーモライシンの活性化の原因として、マイナス電荷の増加によりカチオンとの引力が増加する、および、プラス電荷の減少がカチオンとの反発を減少させる効果を取り上げて良いように思える。一方、誘電率の効果に対する考察から、静電的相互作用が大きいほど活性化度は小さい、すなわち、静電的相互作用（引力あるいは反発）が小さいほど活性化度は大きい。この誘電率の効果が示唆する点と、イオン種による活性化度の違い、活性化に対する pH の効果から、「プラス電荷の減少がカチオンとの反発を減少させる」ことにより、活性化が引き起こされると考えるのが最も矛盾がないように見える。ただし、高い pH で活性化度が低下することから、完全にプラス電荷が消失するような状態、すなわち、全電荷数が低下するような状態では、活性化度も低下する

のであり、マイナス電荷に対するカチオンの引力が優先になるような条件では、活性化は低下するのかも知れない。

サーモライシンは低あるいは高 pH, アルコール存在下, 高温では塩による活性化はそれほど顕著ではない。中性 pH, 低温, 有機溶媒非存在下では塩による活性化は顕著である。カチオンと酵素のプラス電荷との反発が小さいほど, 活性化は大きいように見える。酵素表面からリジンやアルギニンを除去することは活性化の増大につながる可能性がある。しかし, 酵素表面にアスパラギン酸やグルタミン酸などのマイナス電荷を付加してもそれほど活性化には寄与しないと予測される。

#### 5. サーモライシンのチロシン残基の化学修飾 (6)

サーモライシンに存在する 28 残基のチロシン残基の存在状態を pH ジャンプ法と pH 依存的な滴定により決定した。チロシン残基をニトロ化およびアミノ化してイオン化の割合を変化させ, 塩による活性化度を調べた。ニトロ化によりマイナス電荷を導入すると活性化度は低下したが, ニトロチロシンが非解離の pH 域では活性化度に変化はない。これをアミノ化すると活性化度は未修飾酵素のレベルに回復した。すなわち, 塩による活性化は分子表面のチロシンにマイナス電荷を導入するほど低下する。逆に言えば, マイナス電荷を除去するほど, 活性化が起こることになる。

サーモライシンの分子表面のチロシン残基をニトロ化し, 中性付近でマイナス電荷を導入したところ, 活性化は逆に減少した。このニトロチロシンをアミノ化して, 再びマイナス電荷を消去すると, 活性化は増大し, もとのレベルにまで回復した。一方, リジン残基をトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) で修飾し, プラス電荷を除去すると活性化度は減少した。しかし, 無水マレイン酸によりプラス電荷をマイナス電荷に変換したところ, 活性化度には大きい変化は見られなかった。水溶性カルボジイミドでカルボキシル基のマイナス電荷を消去すると, 活性化度は一旦減少したが, 修飾度合いをあげると逆に増大した。これらの結果は, 電荷の種類とアミノ酸残基が複雑に活性化に関与していることを示唆しているが, 現状では, 活性化の原因を一義的に結論付けることができない。

#### 6. サーモライシンの好塩性の応用 (9)

サーモライシンの好塩性を用いてペプチド合成を検討した。人工甘味料であるアスパルテームの前駆体, ZAPM を Z-Asp と Phe methyl ester (Phe-OMe) とからサーモライシンを触媒として合成した。NaCl を添加することにより合成の反応速度定数は増大し, その度合いは加水分解速度の増大とほぼ対応するものであった。すなわち, 塩の添加によりペプチド結合の加水分解活性も縮合活性も同程度に活性化を受けることが示された。このことから, サーモライシンを用いるペプチド合成反応は塩類の存在下に迅速に進行することが



示され、反応時間を短時間に終了させることができることが示された。

サーモライシンによる大豆タンパク質の分解を試みた。脱脂大豆から塩析によりタンパク質を分離し、苛性ソーダと塩酸で交互に処理し、4 M NaCl 中でのタンパク質を溶解した。これにサーモライシンを添加し、分解度合いを調べた。塩が存在しない場合の分解度に比べて、塩が存在する場合の分解度は大きく、塩の添加は顕著な効果を示した。タンパク質の切断部位の検討および生成物の生理的作用の検討は今後の課題である。食糧問題は今日の重要な国際的課題であるが、一方で未利用タンパク質資源があることを忘れるわけにはいかない。例えば皮革、絹糸、屠血中のヘモグロビン、焼酎や醤油発酵の廃棄物など、従来産業廃棄物あるいはゴミと考えられていたものの中に有用な食糧資源や生理活性物質へ変換可能なものがある。本研究者は、かつて、屠血中の赤血球に存在する酵素の精製をすすめ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を高純度に精製し、医薬用酵素としての可能性を探求した (7, 8)。廃棄された血液は凝固し固形化しているため、これから SOD などの有用酵素を精製することは通常的手法では困難であり、高濃度の酸やアルカリ溶液、あるいは塩溶液で試料を前処理したのちにサーモライシンによる加水分解を進め、固形分を可溶化すると有効であるように思える。これらの点については今後の検討課題である (10)。

#### 4. 考察

本研究の骨格は、サーモライシンの活性発現の分子機構を、塩類による活性化を手がかりに解明しようとする点にある。極度に解析的・物理化学的態度で臨むことが必須とおもわれる。本研究者は、「酵素活性とは何か」という問いに対し、本質的なレベルで解答見つけるべく努力をしたいと考えている。

この問題は、現在に至るまで、タンパク質の構造との関連で理解しようとされてきた。すなわち、「酵素活性は酵素の分子構造の反映である」と言う考え方である。要素還元主義と生体機械論により帰結されたものである。本研究者も、基本的にはこの考え方を踏襲するものであるが、今後は、少し視点を変えて、酵素活性に対する環境の寄与を考察していきたいと思う。タンパク質構造とその環境は不可分であり、構造が環境により維持されていることは自明と言っても良い。しかし、結晶学や核磁気共鳴法により解明された構造が余りにも誇大に受け入れられすぎるきらいがある。本研究者は、このようにして解明されてきた分子構造の恩恵に浴しながら、酵素が「作用する場」での構造に思いを馳せたいと思う。酵素活性は、微妙であり、分子結合の 0.1 オングストローム、あるいは 0.1 度の変化が数万倍の活性変化をもたらすことが予想されている (D. E. Koshland のオービタルステアリング理論)。われわれがズブチリシンとそのタンパク性インヒビター SSI の相互作用を調べたところ、ズブチリシンの活性部位のセリンをシステインに変換するだけで、すなわち活性部位残基の 0.2 オングストロームの変化だけで阻害作用は 10 万分の 1 に低

下した。構造をこのレベルの精度で理解しなければ、活性は本来論じられないと考えて良い。この程度の構造変化は、環境の変化により引き起こされるかもしれないが、通常の方法では検出が困難である。化学的あるいは分光学的手法に頼らなければならない。一方、環境の変化は酵素分子表面の電荷状態、水和状態、粘度など種々の因子を変化させる。このことが酵素活性を変化させる可能性がある。すなわち、活性は活性中心でのみ担われているのではなく、分子全体で担われているとする考えである。このような考えは従来の酵素化学では皆無である。従来の大勢的な考えは、酵素活性は活性部位の構造により発揮されるのであるから、活性部位を切り出してそのまま移植すれば、あるいはバイオミメティックに再現できればよいとするものであるとあって良い。本研究者がここで提案する考えは、酵素の構造は精妙な活性部位構造を維持するためだけではなく、構造そのものが活性に与える効果はかなり大きいのではないかとするものである。サーモライシンの構造は、塩の存在下にほとんど変化しない。しかし、表面の物理化学的性質が大きく変化したことは否定できない。例えば、酵素分子表面での静電的性質が大きく変化すれば、たとえば活性部位が分子の奥深くに埋没していたとしても、活性部位の性質も変化すると考えて良い。酵素の性質解明に pH 依存性がある。なぜ、溶媒の pH に依存して、水のほとんど出入りしない活性部位の pH が変化すると考えて良いのであろうか。たとえ水の出入りがあるとしても、疎水性強いかつ誘電率の低い活性部位環境での活性解離基が水中と同じ様な解離を示すとすることで説明してきた従来の考えは修正される必要があるように思える。

本研究者の「酵素化学」におけるキーワードは酵素活性の理解であり、構造因子に加えて環境因子を考慮する。すなわち、構造論に基づく従来の手法に加えて、「溶媒工学」の構築が必要であると考えている。

## 5. 今後の課題

現在、遺伝子工学による部位特異的変異導入法と化学修飾法を用いるタンパク質工学によりサーモライシンの好塩性を分子のレベルで解明しようとしている。具体的には、本報告で一部報告したが、サーモライシン分子表面の荷電性アミノ酸の荷電の除去、荷電の付加、極性の改変などを試みる。さらに、分子表面を含む環境因子をも人為的に改変する。環境因子として、誘電率、荷電状態を積極的に変化させるため、分子表面に長鎖の親水性基や疎水性基の導入も検討する。

酵素に好塩性を付与することにより、酵素活性を塩の濃度により制御できる。塩のような価格低廉な試薬を用いて酵素活性が数十倍も上昇されることは工業的見地からも興味深い。このような研究は、耐塩性の微生物や植物の開発に有用な知見をもたらすであろう。好塩性微生物由来の酵素は必ずしも好塩性ではない。現在までに、サーモライシンに匹敵する好塩性が報告されているのは、HIVなどのレトロウイルスのカルボキシプロテアーゼと好塩性微生物の分泌型プロテアーゼおよびヌクレアーゼの数種類のみである。これら

の酵素間の構造における共通性と違いを明確にする必要があり、このことにより好塩性の秘密が明らかになる可能性がある。

## 6. 謝辞

本研究に助成を賜った財団法人ソルト・サイエンス研究財団に対し厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行においてご協力いただいた、李 守馥氏および南部浩司氏に感謝申し上げます。

## 7. 文献

1. K. Inouye (1992) *J. Biochem.* 112, 335-340.
2. K. Inouye, K. Kuzuya, and B. Tonomura (1994) *J. Biochem.* 116, 530-535.
3. 井上國世 (1994) *生化学* 66, 446-450.
4. K. Inouye, S.-B. Lee, and B. Tonomura (1996) *Biochem. J.* 315, 133-138.
5. K. Inouye, S.-B. Lee, K. Nambu, and B. Tonomura (1997) *J. Biochem.* in press.
6. S.-B. Lee, K. Inouye, and B. Tonomura (1997) *J. Biochem.* 121, 231-237.
7. 井上國世 (1988) *医薬用酵素, バイオテクノロジーレビュー* 88 (軽部編), シーエムシー社。
8. K. Inouye, Y. Mitoma, K. Nakamura, M. Matsumoto, and T. Igarashi (1985) *J. Chromatography* 327, 301-311.
9. 久保 幹, 蓮見文彦, 井上國世 (1996) *Bio Industry* 13(3), 44-51.
10. K. Inouye (1996) *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry (The Korean Society for Applied Microbiology, Ed.)*, pp. 68-69.

No. 9652

Structural Principles of a Halophilic Enzyme, Thermolysin, and Molecular Aspects of the Enzymatic Function

Kuniyo INOUE

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

Summary

Thermolysin is a neutral metallo-endopeptidase produced by Bacillus thermoproteolyticus. Enzymatic aspects of this enzyme including the 3-D structure and enzyme reaction mechanism have been studied extensively. We have found that the enzyme is activated remarkably (10-50 times) by the addition of multimolar (1-5 M) salts, and have reported that thermolysin is a typical halophilic enzyme. In this study, we aimed to reveal the structural features of thermolysin, from the view point of halophilicity, and the molecular aspects of the enzyme function.

The enzyme activity shows a bell-shaped pH dependence, with optimum pH at 7.0. The acidic pKa shifts from 5.4 to 6.7 with an increase in [NaCl] from 0 to 4 M, whereas the alkaline pKa is left unaltered (pKa=7.8). The ratio of the enzyme activity at 4 M NaCl to that at 0 M NaCl is defined as the degree of activation (DOA). The pH-dependence of DOA was also shown to be bell-shaped, and the optimum pH is at 7.0, where the DOA value is 16. The value is 2 at pH 6 and 9. When temperature is shifted from 5 to 37°C, the DOA decreases from 20 to 4, and when alcohol is added to the reaction medium, the DOA also decreases significantly, suggesting that an decrease in the dielectric constant of the medium decreases DOA. When negative charges are introduced onto tyrosyl residues, the DOA is reduced. From these lines of evidence, the electrostatic interactions on the surface of thermolysin were considered to be significant in the halophilicity of the enzyme.