

49

助成番号 0049

ポリエチレングリコール修飾によるサーモライシンへの好塩性と好熱性の
増強と食品蛋白質由来機能性ペプチドの生産

助成研究者：井上 國世 (京都大学 農学研究科)
 共同研究者：榑 利之 (京都大学 農学研究科)
 滝田 禎亮 (京都大学 農学研究科)
 久保 幹 (立命館大学 理工学部)
 森本 康一 (近畿大学 生物理工学部)

【目的】サーモライシン(TLNと略す)は *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の好熱性の中性金属プロテイナーゼである。われわれはTLNが高濃度の塩類存在下に著しい活性増大を示す好塩性酵素であることを報告してきた。TLNによる合成基質 Furlacryloyl(FA)-Gly-Leu-amide (FAGLA) や Carbobenzyloxy (Z)-Asp-Phe-OMe (ZAPM) の加水分解および合成活性は、4 M NaCl 添加により12-13倍も増大する。この顕著な好塩性は TLN の静電的環境変化に起因する可能性が示された。本研究は、TLN の好塩性を解明する目的で、分子表面のアミノ基にポリエチレングリコール(PEG)を付加し、その活性と熱安定性に対する効果を検討した。

【方法】TLN の分子表面のアミノ基を 2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-*s*-triazine (mPEG₂; 10kDa) を用いて修飾した。活性部位に Lys 残基は存在しないことから、この修飾による活性部位への直接的影響はないと考えられた。

【結果と考察】TLN に mPEG₂ を結合させると、その修飾個数の増大に比例して FAGLA 加水分解活性は増大した。アミノ基 12 個のうち 5.2 個が修飾された TLN (5.2PEG-TLN) では 5.7 倍に活性化された。PEG 化 TLN に NaCl を添加すると、ネイティブ TLN と同様に、塩濃度の増大につれて指数関数的に活性が増大した。活性化度はネイティブ TLN に比べて小さく、4 M NaCl 添加のとき 5.6 倍の活性化が認められた。ネイティブ TLN と同様に 5.2PEG-TLN の活性はベル型 pH 依存性を示し、pKa は 5.2 と 8.0 と求められた。このことから、PEG 修飾による活性増大は活性基の pKa 変化に基づくものではないと考えられた。FAGLA 加水分解活性の PEG 修飾による増大は、ミカエリス定数 K_m の減少と分子活性 k_{cat} の増大の両者によりもたらされた。一方、ZAPM の加水分解活性は PEG 修飾により阻害された。この阻害は非拮抗的であり、NaCl の添加により阻害度は増強された。TLN の T_{50} (60 分間の加熱により活性が 50% になる温度) は 75.9°C であるが、5.2PEG-TLN では 79.6°C となった。アレニウス・プロットにより失活の活性化エネルギーは PEG 化により 32 kcal/mol から 66 kcal/mol に増大することが示された。TLN の PEG 修飾により本酵素の熱安定性は大きく増大した。PEG 修飾 TLN は蛋白質に対する作用性が低減していたため、本研究において企図した食品蛋白質からの有用ペプチド生産については達成できなかった。

1.4

助成番号 0049

ポリエチレングリコール修飾によるサーモライシンへの好塩性と好熱性の増強と食品蛋白質由来機能性ペプチドの生産

助成研究者：井上 國世 (京都大学 農学研究科)
 共同研究者：榊 利之 (京都大学 農学研究科)
 滝田 禎亮 (京都大学 農学研究科)
 久保 幹 (立命館大学 理工学部)
 森本 康一 (近畿大学 生物理工学部)

1. 研究目的

サーモライシン[EC 3.4.24.27](以下、TLN と略称する)は中等度好熱菌 *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko の菌体外に産生される中性金属プロテイナーゼである¹⁾。316個のアミノ酸残基より構成される分子量 34,600 のタンパク質であり、活性発現に必須の亜鉛を1原子、構造の安定化に必要なカルシウムを4原子含む。サーモライシンはもっとも詳細な酵素化学的およびタンパク質化学的な知見が蓄積されている酵素といってよく、一次構造や三次構造の解析を含めて広範な研究がなされてきた²⁾。しかし、その酵素活性を直接支配するアミノ酸残基としていくつかの候補が挙げられて来たが、矛盾無く受け入れられているものはない。そのことと関連して、サーモライシンの詳細な反応機構が未だ解明されていない。

本酵素は構造と機能において、いくつかの極めてユニークな性質を持っている。それらを以下に列挙する。本酵素は好熱性酵素であり、30分間の処理により活性が50%に低下する温度は、89℃である。本酵素の溶解度は微生物の菌体外に分泌される可溶性酵素としては極めて低く、中性、25℃付近では約1mg/mL である。われわれは、飽和濃度に近い高濃度 (1-5 M) の中性塩(NaCl, KCl, NaBr など)の存在下においてサーモライシン活性が数十倍にも増大し、この塩による活性化挙動は塩濃度の増加に対して指数関数的な増加を示すことを報告した³⁾。本酵素はほぼ同程度のサイズからなる2つのドメイン構造をとっており、N末端ドメインとC末端ドメインとの間に形成されるクレフトが基質結合部位を構成している。N末端ドメインはほぼ α 構造のみから構成されており、他方、C末端ドメインは β 構造のみから構成されている。酵素活性発現に必要と考えられるアミノ酸残基の大半はC末端ドメインに存在している。本酵素は、ペプチド性人工甘味剤アスパルテーム前駆体の酵素合成において有用性が指摘され⁴⁾、工業生産にも利用されている。われわれはサーモライシンの構造と機能の解析を進める過程で、上に述べた塩による顕著な活性化を見出し、この現象を糸口

にして、活性発現の分子機構を理解しようとしてきた。本研究は、このような研究の一端をしめるものである。

サーモライシンに対する塩の効果に関する研究は、1990年以来、主としてソルト・サイエンス研究財団の研究助成(#9330、#9652、#9856)を受けて、本研究者らにより遂行されてきたものである。以下に、今日までに得られている塩の効果について概説する。

(1) 塩の種類の効果:サーモライシンのペプチド基質(たとえば、*N*-Furylacryloyl (FA)-Gly-Leu amide, FAGLA; *N*-Carbobenzyloxy (Z)-Asp-Phe-OMe, ZAPM)に対する加水分解活性あるいはペプチド合成活性は、中性塩たとえば NaCl の添加により増大する。このとき増大の程度は塩を構成するイオンの種類により異なるが、陽イオンでは、 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ の順であり、陰イオンでは、 $\text{Cl}^- > \text{Br}^-$ である。 Na^+ の効果を100%とすると、 K^+ の効果は75%である。 Li^+ の効果は20-30%である。一方、 Cl^- の効果を100%とすると、 Br^- の効果は85%程度である。このイオンの効果は、離液系列とは異なっており、イオンの媒質である水の構造を変化させる効果とは別のイオンとタンパク質間の特異的な相互作用が関与している可能性がある。二価イオンについてはカルシウム、マグネシウムが活性化を示すが、1 M 程度で飽和に達し、活性化の程度も最大でも5倍程度であり、中性塩の効果とは異なる。亜鉛イオンはサーモライシンの活性発現に必須であるが、mM レベル以上では強い阻害を示す。中性pH、25°Cにおける、 x M NaCl 存在下の活性はNaCl を含まない場合の活性に比べて、1.9の x 乗となる。すなわち、4 M NaCl 存在下では約15倍の活性化が認められる⁵⁾。

(2) 基質依存性:FA-X-Y-amide あるいは Z-X-Y-OMe を基本形とするジペプチド基質のP1アミノ酸 X と P1'アミノ酸 Y を種々変換した基質を合成した。X あるいは Y の種類により酵素活性に差があるが、塩を添加したときに観測される活性化度は大差がなかった。すなわち、塩によるサーモライシンの活性化度は基質の種類によらず一定である。また、加水分解反応とその逆反応(ペプチド合成反応)の活性化の度合いも同程度であることが、Z-Asp + Phe-OMe = ZAPM の反応で確認されている^{4, 5)}。

(3) 分子活性に対する効果:塩による酵素活性の増大は分子活性(k_{cat})あるいはミカエリス定数(K_m)のいずれか、あるいは両者への効果として表現されるはずである。サーモライシンの基質の溶解度の制約から、 k_{cat} と K_m が明瞭に分離される例は少ないが、ZAPM、FA-Ala-Phe-OMe や FA-Ala-Leu-OMe の加水分解では両者が分離できる。

(4) 酵素活性のpH依存性:サーモライシンの活性はベル型のpH依存性を示す。塩の添加による顕著な活性増大は、ベル型のpH依存性を示す。そのpKaは5.4と7.8である。X線結晶解析のデータから、前者はGlu-143に、後者はHis-231に起因するpKaであると考えられている。前者は求核剤として作用し、後者はTyr-157とともに遷移状態の安定化に関与すると考えられている。一方、種々の阻害剤を用いた研究から、前

者は活性に必須の亜鉛に配位した水分子(ルイス酸)に起因するとの考えも提出されている。われわれは、4 M NaClの添加により酸性側pKaが5.4から6.7へシフトすることを見出した⁶⁾。GluのpKaとして6.7は例外的に大きい値であり、酸性側pKaを与える残基は亜鉛に配位した水である可能性を支持する結果と考えられる。

(5) 塩による活性化のpH依存性: 塩の添加によりもたらされるサーモライシンの活性化度も、典型的なベル型のpH依存性を示す。たとえば、25°Cにおける4 M NaClの添加により、pH 7.0では15倍の活性化が認められるが、その両側で活性化度は低下し、pH 5.5では2倍、pH 9.5では3-4倍である。このpH依存性は活性自体のpH依存性に類似している⁶⁾。塩による活性化のpH依存性は、サーモライシン分子表面の静電的狀態を反映している可能性がある。

(6) サーモライシン分子表面の改変: 酵素分子表面にある電荷を持つアミノ酸残基の化学修飾を施し、電荷を変化させた。リジンのアミノ基をTNBSでブロックした。アスパラギン酸とグルタミン酸のカルボキシル基にカルボジイミドを介してグリシンメチルエステルを結合させた。チロシン残基をニトロ化し、中性付近で負電荷を付与した。また、ニトロ化チロシンのニトロ基をアミノ基に変換し、負電荷を消失させた。一連の化学修飾実験から、酵素表面に電荷を持ち込むことにより好塩性が増大する傾向が観測された。現在、このことを実証すべく部位特異的変異導入法によるタンパク質工学を用いて、表面電荷の改変を検討している⁷⁾。

サーモライシンは好熱性であると同時に好塩性でもある。今日までに知られている好塩性酵素の多くは好塩性微生物由来であるが、サーモライシンは好塩性微生物由来ではない。しかし、その好塩性は報告されているものの中ではもっとも顕著なものである⁸⁾。塩によるサーモライシンの活性化の原因として、水和イオンと酵素分子表面との相互作用を考慮したい。一般的な解釈によると、たとえばNa⁺イオンとCl⁻イオンにはそれぞれ5分子の水分子が水和すると考えられている。すなわち、1 M NaCl添加により10 Mの水分子が水和され、イオンの周りに固定されることになる。いま、4-5 M NaClを添加した場合、40-50 Mの水が固定され、自由水としての性質を喪失する。水の濃度は55.5 Mであるから、本研究で用いる高濃度の塩類存在下には自由水の濃度はせいぜい数Mであることになる。塩の添加効果は、(自由)水の活量を数Mまで低減させることにある。このことは、水の構造を破壊し、水溶液の疎水性を低下させることにもなっている。一方、水和イオンはサーモライシン表面の荷電性残基と相互作用し、実効的な分子サイズを増大させていると思われる。このことは、サーモライシン分子の分子運動やフラクチュエーションを抑制する方向に作用すると思われる。酵素分子のフラクチュエーションが抑制されることにより、高活性型に滞留する時間が増え、活性増大をもたらすものと考えられる。

以上の状況的知見をもとにして、本研究ではサーモライシン分子表面の加工

の一環として、リジン残基を親水性ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)で修飾することを検討した。従来、PEG によるタンパク質の修飾は、ヒト以外のタンパク質を医療目的でヒト体内に投与する場合に、免疫原性を抑制する目的で試みられてきた。PEG は界面活性剤に類似の作用をもち、溶液の疎水性を低減させ、細胞膜の融合を引き起こす。すなわち、PEG を酵素分子表面に付加することにより、分子表面の疎水性を低減させ、同時に、サーモライシンの分子サイズを増大させることが期待される。このことにより、高濃度の塩の添加によりサーモライシンにもたらされる効果に類似の効果をPEG 修飾で代替することができるものと想定した。

2. 研究方法

2. 1. サーモライシンのPEG修飾

サーモライシン(大和化成, Lot T5CB491)のアミノ基(リジン残基の ϵ -アミノ基 11個とN-末端の α -アミノ基 1個の計12個)を2, 4-bis(*O*-methoxy-polyethylene glycol)-6-chloro- ϵ -triazine (mPEG₂) (生化学工業, Lot 01389)を用いて化学修飾した。mPEG₂ は2本のポリエチレングリコール鎖を有しており、それぞれの分子サイズは5000である。13 μ M サーモライシンとなるように、サーモライシンを5mM CaCl₂ 含有40 mM Na₂B₄O₇-HCl 緩衝液(pH 9.0-10.0) (以下、この緩衝液を緩衝液Aとする)に溶解した。40 mL TLN 溶液にmPEG₂を0.1-2.1 g 加え、反応液を37°Cで90分間、攪拌した。反応液はAmicon-Diaflo PM-50限外ろ過膜にてろ過し、余分の活性化mPEG₂を除外した。40 mM緩衝液Aを10 mM緩衝液A (pH 9.0)に交換した。サーモライシン中の遊離のアミノ基数は、2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)で定量し、未修飾サーモライシンにおける遊離アミノ基数(N_0)と修飾サーモライシンにおける遊離アミノ基数(N_i)の差をもって、修飾されたアミノ基数とした。修飾サーモライシンは未修飾サーモライシンと同じ分子吸光係数を持つものと仮定して、濃度を決定した。

2. 2. ペプチダーゼ活性の測定

N-Furylacryloyl-Gly-Leu-amide (FAGLA) の加水分解活性は355 nmの吸光度の減少から求めた。標準的な加水分解条件(40 mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5、25°C、10 mM CaCl₂)において、FAGLA加水分解に伴う355 nmの吸光度の変化($\Delta \epsilon$)は $-43.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と求められた。*N*-Carbobenzyloxy-Asp-Phe-OMe (ZAPM) の加水分解は224 nmの吸光度の減少から求めた。標準的な加水分解条件において、ZAPM加水分解に伴う224 nmの吸光度変化($\Delta \epsilon$)は $-493 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と求められた。FAGLAとZAPMで求められた $\Delta \epsilon$ は、0-4 M

NaCl において変化が無いことを確認した。

2. 3. カゼイン消化法

ウシ・カゼイン(ハンマーシュタイン)とNaCl(0-2M)を40 mM Tris-HCl緩衝液(CaCl₂ 無添加)に溶解させ、pHをHClにより、pH7. 5、25°Cに調整した。基質溶液(36 mL)に酵素溶液(12mL)を加えることにより反応を開始した。反応液中での酵素濃度は260 nM、カゼイン濃度は0. 7%であった。4 mLの反応液を4 mLの反応停止液(0.11 M Trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetic acid, 0.33 M acetic acid)と混合し、室温に1時間放置後、ワットマン No. 2 ろ紙でろ過し、280 nmの吸光度を測定した。

3. 研究結果

3. 1. FAGLA加水分解活性に対するサーモライシンのPEG修飾の効果

FAGLAを基質とする加水分解においては、基質の溶解度の関係から、酵素反応速度パラメーター、分子活性(k_{cat})とミカエリス定数(K_m)、を分離できない場合が多いため、特異性定数(k_{cat}/K_m)を活性指標にして、PEG修飾の効果を検討した。

サーモライシンに存在する12個のアミノ基のうち、2. 3個ないし5. 7個を修飾することができた。未修飾サーモライシンの活性(k_{cat}/K_m)は $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であったが、修飾度合いの増大につれて、活性はほぼ直線的に増加し、5. 2個修飾されたサーモライシン(以下、5. 2PEG-サーモライシンと呼ぶ)では $12.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となった。すなわち、アミノ基のPEG化により、サーモライシンのFAGLA加水分解活性は5. 7倍増大することが示された。

サーモライシンと5. 2PEG-サーモライシンのFAGLA加水分解における K_m 値はそれぞれ16 mMおよび5. 8 mMと求められた。また、 k_{cat} 値はそれぞれ 330 s^{-1} および 620 s^{-1} と求められた。 K_m および k_{cat} の両方がPEG修飾により影響を受けることが示された。すなわち、PEG化によるサーモライシンの活性化は分子活性の上昇とミカエリス定数の減少によりもたらされることが認められた。

3. 2. サーモライシンの塩による活性化に対するPEG修飾の効果

サーモライシンのFAGLA加水分解活性はNaClの添加により増大し、NaCl濃度の増加にしたがって指数関数的に上昇する。4 M NaCl存在下には12-13倍活性化する。5. 2PEG-サーモライシンでも、ネイティブ・サーモライシンと同様に、塩の添加により活性が指数関数的に増大する。その活性化の程度は、ネイティブ酵素に比べて小さく、4 M NaCl添加のとき、5. 6倍に過ぎない。PEG修飾により、サーモライシン

の塩に対する応答性が50%程度に低下することは興味深い。5. 2PEG-サーモライシンにおいて4 M NaCl存在下の活性は、ネイティブ・サーモライシンの塩非添加時の活性に比べて30倍以上も大きいことが示された。

3. 3. サーモライシンに対するPEG # 3000あるいはエチレングリコールの添加効果
サーモライシンにPEG # 3000(分子サイズ: 3000 Da)を0-30% (w/v) 添加すると、FAGLA加水分解活性はPEG # 3000の濃度に依存して徐々に増大した。20%のとき、活性は最大値に到達し、PEG非添加時に比べ、150%となった。一方、エチレングリコール(分子サイズ: 62 Da)を0-30% (w/v) 添加すると、エチレングリコール濃度に依存して、活性は徐々に減少した。エチレングリコール10%のとき、活性は50%にまで低下し、エチレングリコール30%存在下では活性は20%以下となった。低分子性のエチレングリコールはサーモライシン活性を阻害したのに対し、高分子性のPEG # 3000は逆に活性化した。

5. 2PEG-サーモライシンを用いて、エチレングリコールおよびPEG # 3000の添加効果を検討した。PEG # 3000もエチレングリコールもともに阻害的に作用した。エチレングリコール10%存在下のとき、活性は50%にまで低下した。エチレングリコールの阻害効果はネイティブ・サーモライシンに対しても、5. 2PEG-サーモライシンに対しても同様であることが示された。一方、PEG # 3000が25%存在するとき、活性は50%にまで低下した。PEG # 3000の添加効果は、サーモライシンに対しては活性化に作用したが、5. 2PEG-サーモライシンに対しては阻害的に作用することが示された。

3. 4. ZAPMの加水分解に対するPEG修飾の効果

NaCl非存在下におけるサーモライシンと5. 2PEG-サーモライシンによるZAPM加水分解のミカエリス定数 K_m はそれぞれ0. 35 mMおよび0. 46 mMと求められた。4 M NaCl存在下では、 K_m はそれぞれ0. 35 mMおよび0. 29 mMと求められた。一方、NaCl非存在下におけるサーモライシンと5. 2PEG-サーモライシンの分子活性 k_{cat} は3. 1 s⁻¹および1. 3 s⁻¹と求められた。4M NaCl 存在下においては、それぞれ21 s⁻¹ および1. 7 s⁻¹ と求められた。

PEG化により、NaCl非存在下のサーモライシン活性は K_m がわずかに増大し、 k_{cat} は30%に減少した。一方、PEG化により、4 M NaCl存在下の活性は、 K_m がわずかに減少するも、 k_{cat} が10%以下に低下した。PEG化は、非拮抗的に活性を阻害することが明らかとなり、NaClの存在がPEG化による阻害効果を増大することが示された。この結果はFAGLA加水分解活性に対する結果とは大きく異なっており、PEG化のサーモライシン活性に対する効果は、基質の種類に依存することが示唆された。

サーモライシンでは4 M NaCl添加により、 K_m は変化せず、 k_{cat} のみが増大するが、5. 2PEG-サーモライシンでは逆に、 k_{cat} は(1. 3から1. 7 s⁻¹へ)わずかに増大するものの、ほとんど変化せず、 K_m が減少することが示された。すなわち、NaCl添加によるネイティブ・サーモライシンの活性化は k_{cat} のみの増大によりもたらされるのに対し、5. 2PEG-サーモライシンの活性化は K_m の減少のみによりもたらされることが示された。

3. 5. サーモライシン活性のpH 依存性に対する PEG 修飾の効果

FAGLA 加水分解活性(k_{cat}/K_m)のpH 依存性を検討した。ネイティブ・サーモライシンも5. 2PEG-サーモライシンもともにベル型のpH 依存性を示した。ネイティブ・サーモライシンのpKa は5. 3と7. 9であり、5. 2PEG-サーモライシンのpKa は5. 2と8. 0と求められた。両酵素のpKa 値はほぼ同じであり、PEG 修飾により、サーモライシンの活性解離基は影響を受けないことが示された。アルカリ性側pKa はHis 231に起因すると考えられている。酸性側pKaを支配する残基はGlu 143 の γ 位カルボキシル基あるいは活性部位亜鉛に配位した水分子であると推定されている。

3. 6. サーモライシンの熱安定性に対する PEG 修飾の効果

サーモライシンを60-85℃で、種々の時間処理し、25℃に3分間もどしたのち、FAGLA 加水分解活性を測定した。1時間の処理で活性を50%失う温度を T_{50} と定義する。ネイティブ・サーモライシンの T_{50} は75. 9℃であったが、PEG 修飾により上昇し、5. 2PEG-サーモライシンでは79. 6℃となった。種々の温度における失活は見かけの一次反応速度論により記述でき、それぞれの温度における失活の速度定数のアレニウス・プロットから、失活の活性化エネルギー(E_a)を算出した。ネイティブ・サーモライシンの E_a は32 kcal/molと求められたのに対して、5. 2PEG-サーモライシンでは66 kcal/molと求められた。サーモライシン分子表面の5. 2個のアミノ基をPEG 修飾することにより、 T_{50} は約4℃上昇し、失活の活性化エネルギーは34 kcal/molも増大した。

以前、われわれはサーモライシンの熱失活の活性化エネルギーを15 kcal/molと求め、この値が4 M NaCl存在下に32 kcal/molにまで増大することを報告した⁹⁾。このときの測定は、40 mM Tris-HCl緩衝液、pH7. 5、25℃で行われた。本研究は20 mM Na₂B₄O₇-HCl緩衝液、pH8. 0、20℃で行われた。緩衝液の塩組成の違いが失活の活性化エネルギーに大きい差を与えたものと考えられる。

3. 7. PEG修飾サーモライシンによるタンパク質基質の分解

タンパク質基質としてウシ・カゼインに対する作用を検討した。5. 2PEG-サーモライ

シンの活性はネイティブ・サーモライシンの活性に比べて、10%程度に低下した。これは、サーモライシンのPEG化により、基質結合能が低下したためか、酵素の分子活性が低下したためか区別ができない。

4. 考察

4. 1. PEG修飾によるサーモライシンのFAGLA加水分解活性の増大

サーモライシンは高濃度の塩類の添加により著しく活性化される。本研究では、サーモライシンの分子表面のアミノ基をポリエチレングリコール(PEG)で修飾し、その酵素活性と熱安定性に対する効果を検討した。FAGLA加水分解活性は、PEG修飾の度合いに応じて増大した。この増大は、 k_{cat} の増大と K_m の減少を伴うものであり、塩による活性化が k_{cat} の増大のみを伴うとは異なっていた。PEG化サーモライシンにNaClを添加すると、ネイティブ・サーモライシンと同様に塩の濃度に依存して、活性が増大した。5. 2個のPEGを導入したサーモライシンではネイティブ・サーモライシンに比べて5. 7倍活性化していた。4 M NaCl存在下にネイティブ・サーモライシンは12-13倍活性化するので、PEG化と塩効果が独立であれば、70倍の活性化が期待されるはずであるが、実際は30倍であった。PEG化サーモライシンでは塩の添加効果が43%に減弱されていることが示された。ネイティブ酵素では、塩の非添加に比べて x M NaCl添加による活性化度は 1.9^x である。一方、5. 2PEG-サーモライシンでは 1.5^x となった(井上國世、松村憲吾:未発表)。

サーモライシンの活性部位の亜鉛をコバルトに置換することにより、活性が3倍増大した。コバルト化サーモライシンに塩を添加すると、ネイティブ・サーモライシンと同様に活性化し、4 M NaCl存在下には12-13倍活性化した。すなわち、亜鉛のコバルト置換と塩効果とは互いに独立であり、コバルト化酵素に4 M NaClを添加することにより、35-40倍の活性化が認められた(井上國世、葛谷桂子:未発表)

4. 2. PEG修飾によるサーモライシンのZAPM加水分解活性の阻害

PEG修飾によるFAGLA加水分解活性の活性化とは異なり、ZAPM加水分解活性は非拮抗型の阻害を受けた。NaCl非存在下におけるサーモライシンと5. 2PEG-サーモライシンの分子活性 k_{cat} は 3.1 s^{-1} および 1.3 s^{-1} と求められた。酵素濃度を100nMとして、阻害剤濃度はその5. 2倍と仮定する(520 nM)。これから、阻害物定数 K_i は370 nMと求められた。一方、4 M NaCl存在下においては、サーモライシンと5. 2PEG-サーモライシンの分子活性 k_{cat} はそれぞれ 21 s^{-1} および 1.7 s^{-1} と求められた。これから、 K_i は46 nMと求められた。PEGの示す阻害性はNaCl存在下に8倍増強されたことから、サーモライシンによるZAPM加水分解に対するPE

Gによる阻害において、NaClはアロステリック・エフェクターとなっている可能性がある。以上の結果はFAGLA加水分解活性に対する結果とは大きく異なり、PEG化のサーモライシン活性に対する効果は、基質の種類に依存することが示唆された。現在のところ、サーモライシンのPEG化がFAGLA加水分解に対して活性化、ZAPM加水分解に対して阻害を示す理由は不明である。PEG化による速度パラメーターの変化から、前者においては、PEG化により酵素・基質複合体の安定化と遷移状態の安定化が引き起こされることが、一方、後者では遷移状態の不安定化が引き起こされることが推定される。塩によるサーモライシンの活性化では、基質の種類によらず、同程度の活性化が観測されている。しかし、PEG化の効果は基質により活性化と阻害があることが示された。サーモライシンの応用を考える上では、ペプチド性人工甘味料アスパルテーム(Asp-Phe-OMe)前駆体であるZAPMの合成が重要な課題である。本研究の結果、PEG化はFAGLA加水分解活性と合成活性の増大には有用であることが示されたが、ZAPMの加水分解活性および合成活性の増大には適当ではないことが示された。

カゼイン加水分解活性はPEG化により大きく低下した。これはサーモライシン表面に導入されたPEG基(分子サイズが5kDaの鎖が10本)により、立体障害によりタンパク質基質が酵素の活性部位に結合できなくなったことに起因する可能性がある。

4. 3. PEG修飾によるサーモライシンの熱安定化

サーモライシンを5.2個のPEGで修飾することにより、熱安定性が顕著に増大した。ネイティブ・サーモライシンの分子サイズ(35 kDa)に比べて、5.2PEG-サーモライシンの分子サイズはかなり大きく80-90 kDaである。このような大きい分子を分子表面に結合させることにより分子の安定化が達成されたことは驚くべきことである。一般にジスルフィド結合や分子内架橋の導入により、安定性が増大することが知られている。また、ポリオール(糖質や多価アルコール類など)の添加による安定化が知られている。しかし、安定化した酵素は、逆に活性を低下させていることが多い。これは分子のフレキシビリティが低減したためと考えられる。本研究では、5.2PEG-サーモライシンにおいて、熱安定性を達成しつつも、FAGLA加水分解活性が5.7倍にも増大したことは特筆に値する。サーモライシンにおいて、NaClの添加が活性増大とともに熱安定性をも増大させたことと対応している。ただし、上述したとおり、サーモライシンのPEG化はZAPMに対する活性に対して阻害的に作用したため、PEG化による熱安定性増大と活性化との関係を考察することは困難に見える。

5. 今後の課題

サーモライシンのPEG修飾により、FAGLA加水分解に対しては良好な結果を得ることができた。期待に反して、ZAPMに対しては、拮抗阻害的に作用した。PEG修飾のサーモライシンに対する効果が基質特異的であることが示唆されたため、今後は基質のどのような要因が、サーモライシンを活性化したり、あるいは阻害したりするのかについて、種々の合成基質を用いて検討する。また、PEG修飾が酵素の高次構造にどのような効果をもたらしたかについて、円偏光二色性(CD)や蛍光スペクトルによる分光学的解析を行う予定である。FAGLA加水分解活性は、NaCl添加とPEG化により相乗的に活性化されることが示された。未発表ではあるが、コバルト・サーモライシンでは、3倍活性化している。NaCl添加、コバルト化、PEG修飾の3者を組み合わせることにより、サーモライシンのFAGLA加水分解活性は200-250倍も増大することが予測される。現在、サーモライシン表面への電荷の導入および荷電状態の改変を化学修飾法や部位特異的変異導入により進めており、サーモライシンの構造と機能に対する効果を検討しているところである¹⁰⁾。サーモライシンの応用面では、アスパルテームや有用ペプチドの合成に応用できるような高活性化を個々の対象に対して選択することが必要である。とくに、本研究の申請において企図したPEG修飾サーモライシンを用いる食品蛋白質由来機能性ペプチドの生産は、食品由来蛋白質を有効に切断できなかったため達成できなかった。今後はペプチドに対する作用性を向上することにより有用ペプチドの開発と生産を検討したい。

6. 文献

- 1) 遠藤滋俊、醗工 40, 364 (1962)
- 2) M. A. Holmes and B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **160**, 623 (1982)
- 3) K. Inouye, *J. Biochem.* **112**, 335 (1992)
- 4) Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh, S. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* **28**, 2611 (1979)
- 5) K. Inouye, S.-B. Lee, and B. Tonomura, *Biochem. J.* **315**, 133 (1996)
- 6) K. Inouye, S.-B. Lee, K. Nambu, and B. Tonomura, *J. Biochem.* **122**, 358 (1997)
- 7) K. Inouye, S.-B. Lee, and B. Tonomura, *J. Biochem.* **124**, 72 (1998)
- 8) 井上國世、生化学 **66**, 446 (1994)
- 9) K. Inouye, K. Kuzuya, and B. Tonomura, *Biochim. Biophys. Acta* **1388**, 209 (1998)
- 10) K. Inouye, S.-B. Lee, and B. Tonomura, *J. Biochem.* **124**, 72 (1998)

Enhancement of Halophilicity and Thermophilicity of Thermolysin by Modification with Polyethylene Glycol and Preparation of Functional Peptides from Food Proteins

Kuniyo Inouye (Kyoto University, Graduate School of Agriculture)

Toshiyuki Sakaki (Kyoto University), Teisuke Takita (Kyoto University), Motoki Kubo (Ritsumeikan University), and Koichi Morimoto (Kinki University)

Thermolysin (TLN) is a thermophilic and neutral metalloproteinase produced from the culture medium of *Bacillus thermoproteolyticus*. We have reported that the activity of TLN is enhanced remarkably in the presence of high concentration of salts and that TLN is a typical halophilic enzyme. The TLN activity of hydrolysis and synthesis of furylacryloyl (FA)Gly-Leu-amide (FAGLA) and carbobenzyloxy (Z)Asp-Phe-OMe (ZAPM) is enhanced 12-13 times by the addition of 4 M NaCl, and the activation is considered to be due to the change in the electrostatic environments of TLN. In the present study, modification of amino groups of TLN with polyethylene glycol (PEG) is performed and the effects of PEG on the activity and thermo-stability are examined.

MATERIALS AND METHODS. Amino groups on the surface of TLN were modified by 2,4-bis(*O*-methoxypolyethylene glycol)6-chloro-*s*-triazine (mPEG₂; 10 kDa). Because no lysyl residues are located in the active site of TLN, the modification and introduction of PEG moieties to TLN might not show direct influence to the active site.

RESULTS AND DISCUSSION. The TLN activity in the FAGLA hydrolysis was enhanced depending on the number of mPEG₂ moiety introduced into TLN. The modified TLN (5.2PEG-TLN) in which 5.2 amino groups out of 12 were modified with PEG showed the activity 5.7 times higher than that of TLN. The activity of TLN and 5.2PEG-TLN increased with increasing [NaCl] in an exponential fashion, and the degree of activation of 5.2PEG-TLN was 5.6 at 4 M NaCl. The activity of both TLNs showed bell-shaped pH dependence with pK_a values of 5.2 and 8.0, suggesting that activation of TLN by PEG was not derived by pK_a shift of the ionizable residues of the active site. The activation of the FAGLA hydrolysis by PEG modification was followed by the changes in K_m and k_{cat} values. On the other hand, the activity of the ZAPM hydrolysis was inhibited noncompetitively by the PEG modification. The degree of the inhibition was enhanced by NaCl. The thermostability of TLN was also enhanced by the PEG modification, and T_{50} value (75.9°C) of TLN was changed to 79.6°C in 5.2PEG-TLN.