

構造解析に基づいたコラゲナーゼとキシラナーゼへの耐塩性の付与

保川 清, 滝田 禎亮

京都大学大学院農学研究科

概要

【研究目的】我々はコラゲナーゼとキシラナーゼの産業応用の拡大には、酵素の活性と安定性だけでなく、高い耐塩性が求められると考えた。本研究の目的は、*Grimontia hollisae* 由来コラゲナーゼ(Ghcol)と *Bacillus* 由来 GH10 キシラナーゼである XynR の立体構造を決定し、その知見に基づき、Ghcol と XynR に好塩性を付与することである。

【方法】Ghcol を *Brevibacillus* で発現させ、培養上清から精製した。XynR は大腸菌で発現させ、菌体から精製した。結晶化はともにシッティングドロップ法により行った。SPring-8(兵庫県播磨市)のビームライン BL26B1 でシンクロトン放射光を用いて回折データを取得した。分子置換を行った後、COOT でモデルを構築した後、PHENIX の phenix refine で立体構造を精密化した。Ghcol の活性測定には基質として FITC-コラーゲン、ゼラチン、合成ペプチド 2 種(MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR, FALGPA)を用いた。XynR の活性測定にはブナ材キシランを用いた。

【結果】Ghcol と Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp(GPOGPO)の複合体の構造を決定した。水分子が活性部位の亜鉛イオンの近傍に存在した。この水分子は、Ghcol と GPO の複合体には存在しなかったことから、Ghcol と GPO の複合体の構造はミカエリス複合体を反映していると考えられた。活性部位の構造と部位特異的変異導入の結果から、Glu493 と Tyr564 が活性に重要な残基であることが示された。我々はさらに、Ghcol のブレビバチルスと大腸菌のシャトル発現ベクターを構築した。

XynR の 315 位の 19 種の変異体の活性の pH プロフィールはいずれも野生型(WT)と同じくベル型曲線であった。T315H, T315N, T315Q, T315S は pH 9.0 と 10.0 で WT よりも活性が高かった。T315Q の結晶構造では、WT で 315 位近傍に見られた Ca^{2+} が存在しなかった。T315H, T315N, T315Q, T315S の耐アルカリ性と耐熱性は WT よりも低かった。

【考察】Glu493 は酸および塩基触媒としてはたらく、Tyr564 は遷移状態の正四面体構造を安定化させていると考えられた。T315Q の好アルカリ性は、 Ca^{2+} を欠くことによる柔軟性が増加することによる活性の向上と安定性の低下と考えられた。現在、Ghcol と XynR の全アミノ酸スクランニングライブラリーから、好塩性、高活性、耐熱性に優れた変異体の取得を進めている。

1. 研究目的

コラーゲンは哺乳類で最も量が多いタンパク質である。コラゲナーゼはコラーゲンの 3 重らせんを生理的条件下で分解する酵素である。今日、最もよく研究がなされている *Clostridium histolyticum* 由来コラゲナーゼ(Chcol)が膝島細胞分散剤として糖尿病治療に用いられている。*Grimontia hollisae* 由来コラゲナーゼは Chcol よりも活性

が高く、上記用途はもとより、廃コラーゲンの有効活用につながることを期待されている¹⁾。我々はこれまでに、Ghcol の活性の pH 依存性の熱力学的解析を行い、触媒機構を推察した²⁾。また、各種変異体を作製し、塩基性側活性解離基を推定した³⁾。さらに、Ghcol の結晶構造解析を行った⁴⁾。Ghcol は活性化ドメイン(Ala88-Tyr355)、リンカー(Ala356-Gly365)、ペプチダーゼドメイン

(Phe366–Gly622)から成り(図 1A), 全体としては鞍型構造をとった(図 1B)。ペプチダーゼドメインに 1 個の Zn^{2+} を、活性化ドメインに 1 個、ペプチダーゼドメインに 3 個の Ca^{2+} を有した(図 1B)。全体構造はクロストリジウム属コラゲナーゼ^{5, 6}、ビプリオ属コラゲナーゼ VhaC⁷と高い類似性を示した。トポロジー図から、活性化ドメインは立体構造が似た 2 個のサブドメイン(Act1, Act2 と命名)を有することが見出された(図 1C)。複合体では Gly-Pro-Hyp が活性部位, Act1, Act2 に 2 分子ずつ結合していた。また、ラマチャンドラプロットから、全 6 分子がモデルコラーゲンと同じ構造をとっていることが見出された。

キシランは 5 炭糖のキシロースの重合体であり木質に大量に存在する。キシラーゼはキシランを分解する酵素で、食品産業では果汁の清澄剤として、製紙産業では漂白剤として用いられている。本酵素はバイオエタノールの製造や醤油粕等の食品廃棄物の分解への応用につながる事が期待されている⁸。我々は、*Bacillus* 由来糖質加水分解酵素ファミリー 10 (GH10) キシラーゼである

XynR の耐熱型変異体 S92E⁹と好アルカリ型変異体 T315N¹⁰を取得した。また、GH11 キシラーゼである XynJ の耐熱型変異体 T82A を取得した¹¹。XynR の野生型(WT)と S92E の立体構造の比較から、活性部位近傍の基質ポケットに存在する残基 Trp90 と周辺残基との好ましくない C-C 相互作用(炭素原子間の距離が 3.7 Å 以下)の数は、WT では 3 個であったが、S92E では 1 個に減少していた(図 2)¹²。これらの結果から、Ser92→E の変異が、Ser92 と同一ループ上に存在する Trp90 とその周辺構造を変化させ、耐熱化につながったことが示唆された。

我々は変異型キシラーゼの醤油粕分解効果を検討したが、十分な活性がみられなかった(未発表)。その原因を、好塩性・耐塩性が低いことであると考えた。そして、コラゲナーゼとキシラーゼの産業応用の拡大には、酵素の活性と安定性だけでなく、高い耐塩性が求められると考えた。本研究の目的は、Ghcol と XynR の立体構造を決定し、その知見に基づき、耐塩性を付与することである。

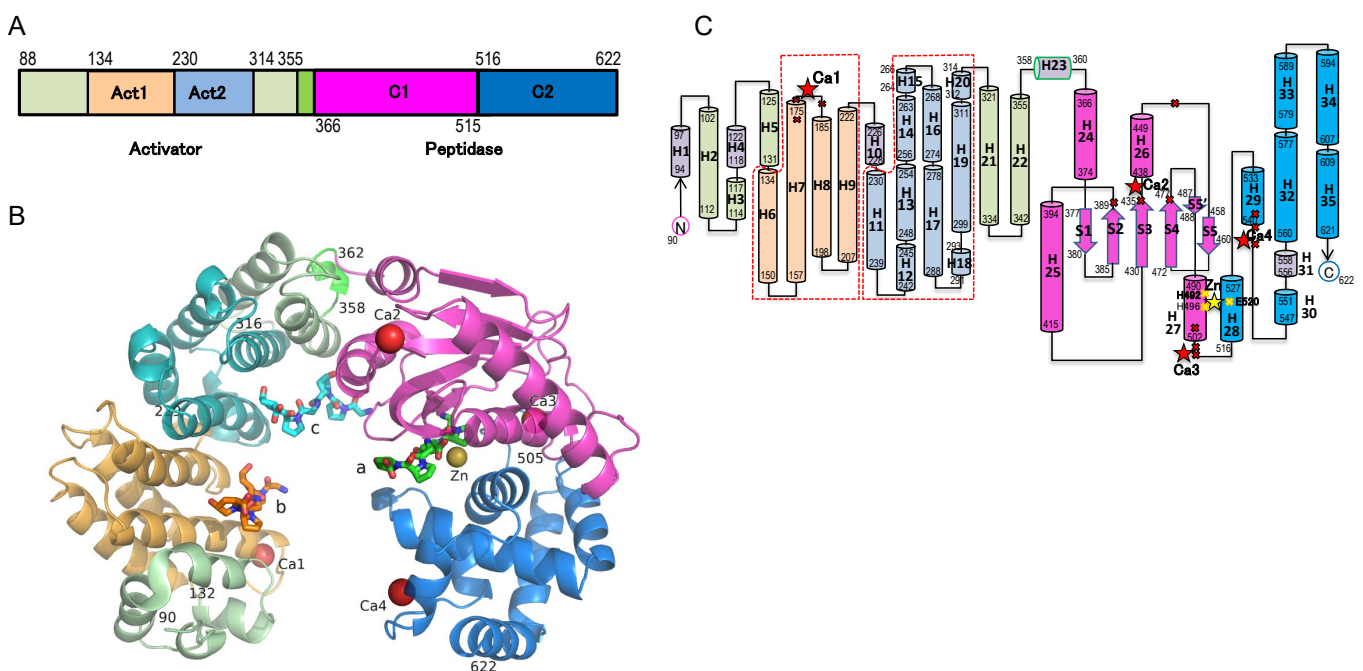


図 1 アポ型の Ghcol.

- (A) ドメイン構造. 活性化ドメイン(Ala88–Tyr355), リンカー(Ala356–Gly365) (緑色), ペプチダーゼドメインの前半(C1: Phe366–Val515), 後半(C2: Val516–Gly622)を示す。
- (B) 立体構造.
- (C) トポロジー図. α ヘリックスをカラムで、 β ストランドを矢印で、活性部位の Zn^{2+} を黄色の星で、 Ca^{2+} が結合しているアミノ酸残基を赤色の星でそれぞれ示す。

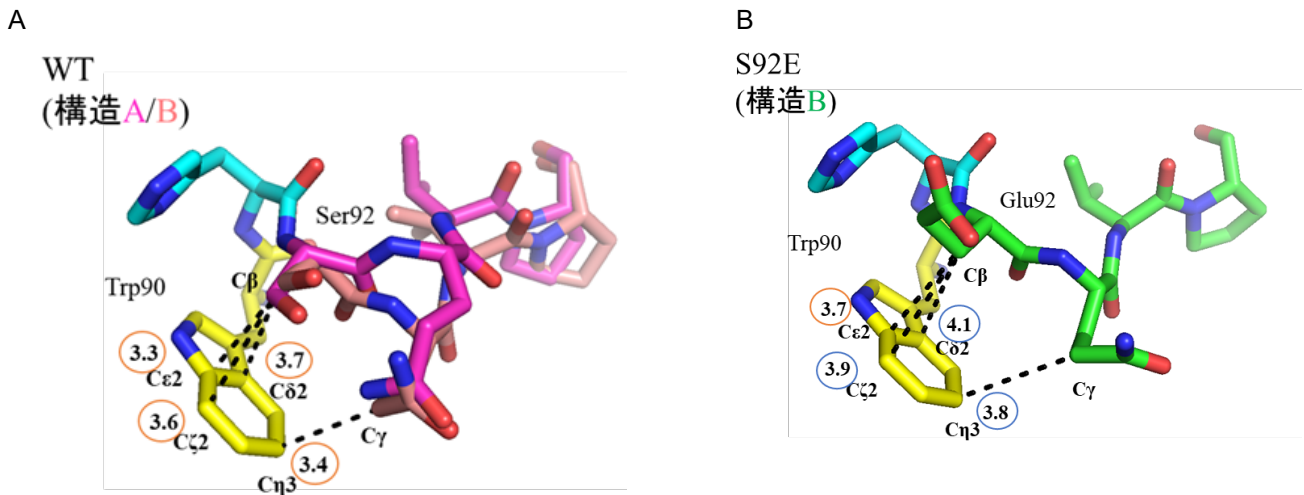


図 2 XynR の S92E 変異導入部位の周辺構造。

WT および S92E の変異部位近傍の構造。WT の 92–95 位のアミノ酸残基の 2 つの構造 A と B はそれぞれマゼンタとピンクで示す。また、WT と S92E の基質ポケット残基 Trp90 とループを構成する残基 (92–95 位) との炭素原子間距離 (Å) を示す。3.7 Å 以下の炭素原子間距離はオレンジ色で、3.8–4.4 Å の炭素原子間距離は青色で囲っている。

2. 研究方法

2. 1 Ghcol の生産

Brevibacillus での Ghcol 発現プラスミドは、結晶作製のための発現には図 3A を、変異体の活性評価のための発現には図 3B に示すものを用いた。Ghcol 変異体の発現プラスミドは、pNY326-Ghcol を鋳型に、QuikChange 法により作製した。発現プラスミドを導入した *Brevibacillus* を MTNm プレートに塗布し、37°C で一晩培養した。5 mL の 2SY 液体培地に形質転換菌を植菌し、30°C で一晩振とう培養し、前培養液とした。500 mL 三角フラスコに、2SY 液体培地を 300 mL 分注し、これに前培養液を添加した後、30°C で 48 時間振とう培養した。その後、遠心により培養上清を回収した。

培養上清に硫酸アンモニウムを 50% 飽和となるように加え、4°C で一晩攪拌した。その後、遠心により沈殿を回収した。沈殿を 10 mL の 20 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5)、2 mM CaCl₂ に溶解させ、20 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5)、2 mM CaCl₂ に対して透析を 3 回行った。透析内液を回収し、20 mM HEPES-NaOH 緩衝液 ((pH 7.5)、2.0 mM CaCl₂ で平衡化された HiTrap™ DEAE FF 5 mL (内径 1.6 cm × 長さ 2.5 cm) にかき、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着した Ghcol を 0 ~ 0.5 M NaCl のグラディエントで溶出させた。活性画分を集め、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters-30K (MWCO-30, ミリポア) を用いて、遠心濃縮し、精製酵素とした。

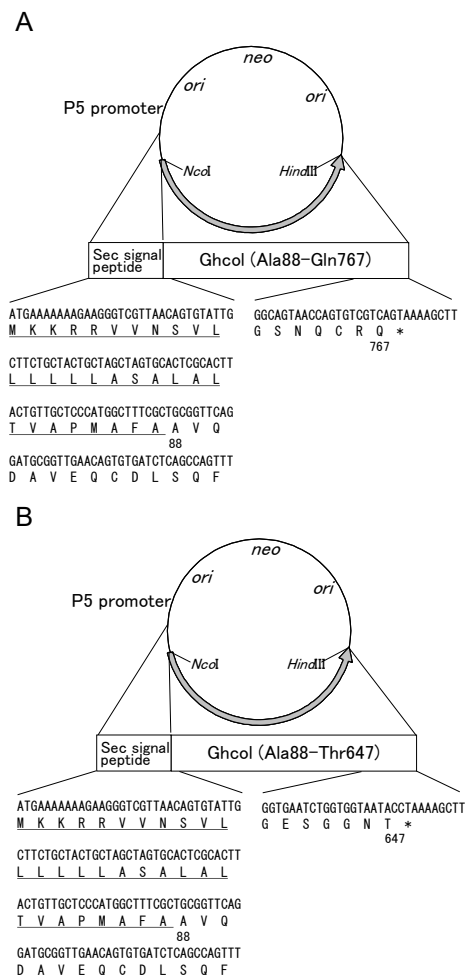


図 3 Ghcol 発現プラスミド。

(A) pNY326-Ghcol (A88-Q767)。

(B) pNY326-Ghcol (A88-T647)。

下線は Sec シグナルペプチドを示す。*は終止コドンを示す。

2. 2 Ghcol の結晶構造解析

シッティングドロップ法により結晶化を行った。96 穴プレート(Intelli-Plate, Art Robbins Instrument)上に、1 μ L のタンパク質溶液(8~12 mg/mL Ghcol, 20 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5))と 1 μ L の沈殿剤(0.1 M MES, 0.2 M $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 20~24% w/v PEG 8000)を入れ、100 μ L の沈殿剤に対して 20°Cで平衡化した。一定期間後、顕微鏡で観察し、得られた結晶を 100 K の窒素ガスで凍結した。京都大学宇治キャンパスにて、MAC Science M18XHF 回転陽極発生器で生成された Cu K α 線と Bruker HI-STAR マルチワイヤーエア検出器にて結晶の回折データをチェックした。その後、SPring-8(兵庫県播磨市)のビームライン BL26B1 でシンクロトロン放射光を用いて回折データを取得し、XDS で処理した。次に、処理したデータを CCP4 の MOLREP を用いて分子置換を行った。分子置換のサーチモデルには、我々が以前に決定した Ghcol の立体構造(PDB, 7WSS)を使用した。COOT でモデルを構築した後、PHENIX の phenix refine で立体構造を精密化した。得られたタンパク質の立体構造の図の作成には PyMOL を使用した。

2. 3 Ghcol の活性測定

FITC-collagen 分解活性の測定では、10 mM 酢酸に溶解した 0.1% FITC-collagen と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5), 10 mM CaCl_2 , 0.4 M NaCl を氷冷しながら混合し、基質液とした。反応は 37°Cで 30 分間反応させた後、遠心して上清を回収し、520 nm における蛍光(励起波長: 485 nm)を測定した。

ゼラチン分解活性の測定では、ゼラチンザイモグラフィを行った。サンプルをゼラチン入り 12.5%ポリアクリルアミドゲルにアプライし、40 mA の定電流で 40 分間泳動した。泳動後、ゲルを洗浄液に浸して SDS を除去した。次にゲルを反応液に浸して 37°Cで反応させた後、染色液で染色と脱染色を行った。

(7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-[N³-(2,4-dinitrophen-yl)-L-2,3-diaminopropiyl]-Ala-Arg-NH₂(MOCac-KPLGL(Dpa)-AR) 分解活性では DMSO に溶解した MOCac-KPLGL(Dpa)-AR, 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 酵素溶液を石英セル内で混合した。反応液の 393 nm の蛍光(励起波長: 328 nm)を 25°Cで 5 秒ごとに 2 分間測定した。

FALGPA 分解活性の測定では、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した FALGPA, 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液(pH 7.5), 200 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 10 μ M ZnCl_2 , 酵素溶液を石英セル内で混合した。反応液の 324 nm の吸光度を 25°Cで 10 秒ごとに 5 分間測定した。測定開始時と終了時の吸光度の値の差を酵素活性とした。

2. 4 XynR の生産

XynR の発現には大腸菌での発現プラスミド pET-22b(+)-XynR(図 4)を用いた。変異体の発現プラスミドは、pET-22b(+)-XynR を鋳型に、QuikChange 法により作製した。発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21(DE3)を LB プレートに塗布し、37°Cで一晩培養した。50 mL の LB 液体培地に形質転換菌を植菌し、37°Cで一晩振とう培養し、前培養液とした。2 L 三角フラスコに、LB 液体培地を 1 L 分注し、これに前培養液を添加し、OD600 が 0.4~0.8 になるまで振とう培養した。0.5 M の IPTG を 1 mL 加え、30°Cで 24 時間振とう培養した後、遠心により菌体を回収した。

菌体を 20 mM KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液(pH 8.0) (以下 buffer A)で懸濁し、超音波破碎を行った。その後、遠心により上清を回収した。これに硫酸アンモニウムを加えることで 50%飽和とした。その後、遠心により沈殿を回収した。これを buffer A に溶解し、buffer A に対して透析した。透析内液を回収し、buffer A で平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650M(直径 2.8 cm \times 10.5 cm, 東ソー)にかけた。吸着した XynR を 0.25 M NaCl を含む buffer A で溶出させた。活性画分を集め、0.5 M NaCl を含む buffer A (以下 buffer B)で平衡化した HisTrap HP (5 mL, Cytiva)にかけ、アフィニティークロマトグラフィを行った。吸着した XynR を 0~100 mM イミダゾールを含む buffer B でグラデーション溶出させた。活性画分を集め、遠心濃縮し、精製酵素とした。

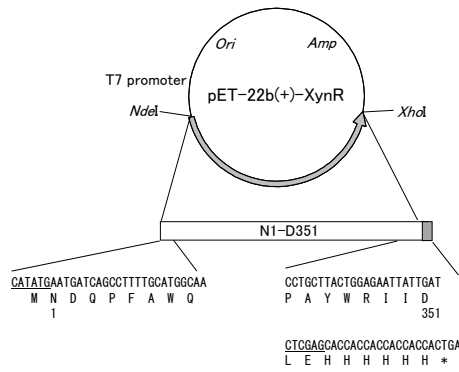


図 4 XynR 発現プラスミド pET-22b(+)-XynR.
*は終止コドンを示す。

2. 5 XynR の結晶構造解析

シッティングドロップ法により行った。96 穴プレート上に、1 μL のタンパク質溶液 (12.7 mg/mL XynR, 20 mM リン酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.0)) と 1 μL の沈殿剤 (0.2 M ヨウ化アンモニウム, 26% PEG 4000, pH 5.9) を入れ、100 μL の沈殿剤に対して 20°C で平衡化した。その後の操作は上記 2. 2 と同様に行った。ただし、T315Q の分子置換のサーチモデルには野生型 XynR (PDB: 7CPK) を用いた。

2. 6 XynR の活性測定

緩衝液に溶解した beechwood Xylan (Megazyme), 緩衝液, 酵素溶液を混合した。同容量のジニトロサリチル酸 (DNS) 溶液 (0.5% (w/v) DNS, 1.6% (w/v) NaOH, 30% (w/v) 酒石酸ナトリウムカリウム) を加えて 100°C で 15 分間の熱処理することで反応を停止させ、4°C で 15 分間の冷却処理を行った。上清 80 μL とイオン交換水 120 μL を混合し、324 nm の吸光度を測定した。

3. 研究結果

3. 1 Ghcol・GPOGPO 複合体の結晶構造

Ghcol (A88-T646) のアポ型の結晶に GPOGPO をソーキングして複合体の結晶を作製した。SPring-8 で回折データ (2.0 Å) を収集し、構造を精密化したところ、活性部位の Zn^{2+} の近傍に水分子が確認された (図 5)。この水分子は生成物型の GPO 複合体では見えなかったことから、GPOGPO 複合体はミカエリス複合体に相当し、水分子が求核剤として機能すると考えられた¹³⁾。以上の結果から、図 6 に示す触媒機構が考えられた。

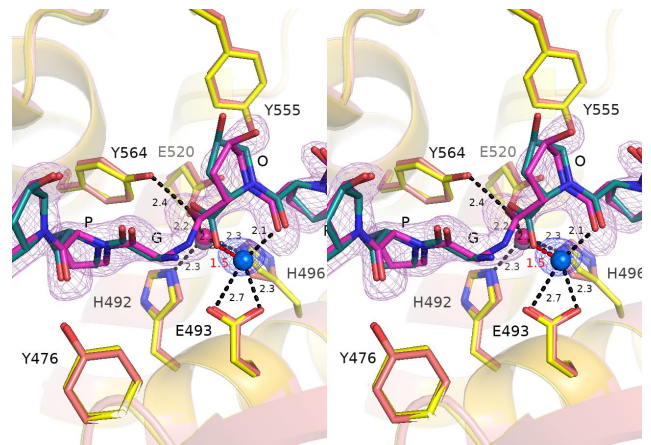


Fig. 5 Ghcol・GPOGPO 複合体の活性部位の構造。

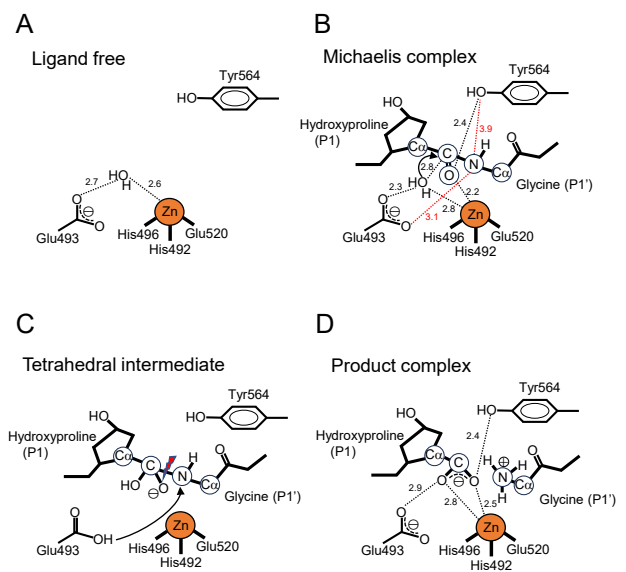
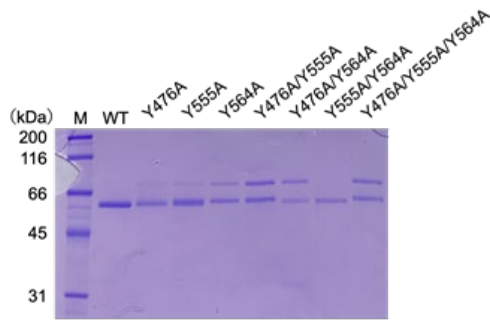


Fig. 6 Ghcol の触媒機構。

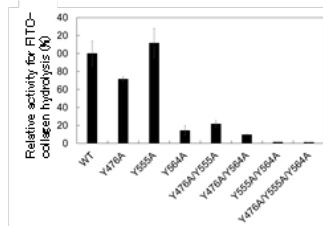
3. 2 Ghcol 変異体の活性

FITC コラーゲン, ゼラチン, Furylacryloyl-LGPA あるいは MOCac-KPLGL(Dpa)-AR 基質としたときの結果を図 7 に示す。変異体の活性は野生型酵素 (WT) よりも低かった。さらに、Y564A の活性は Y476A と Y555A よりも低く、Y564A を含む二重変異体の活性は、Y476A/Y555A よりも低かった。MOCac-KPLGL(Dpa)-AR 分解において、Y564A の k_{cat} は WT の 3% に減少し、 K_m は WT と同程度 (WT の 83%) であった (図 8)。一方、Y555A の K_m は WT の 2.5 倍に増加したことから、変異 Y555→A は基質との結合力を弱めたと考えられた。

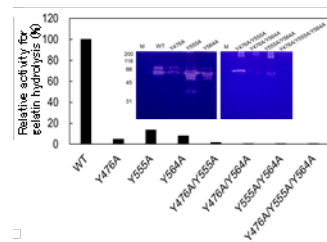
A



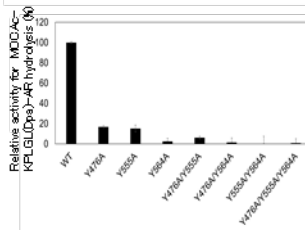
B



C



D



E

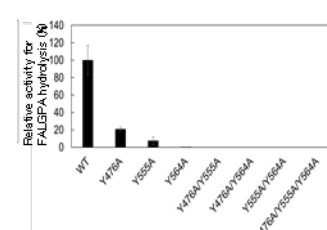
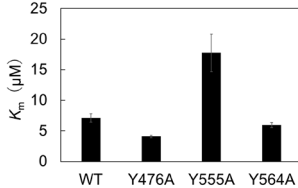


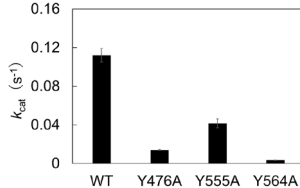
図7 Ghcol 変異体の活性.

- (A) SDS-PAGE.
 (B) FITC コラーゲン分解活性.
 (C) ゼラチン分解活性.
 (D) MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR 分解活性.
 (E) FALGPA 分解活性.

A



B



C

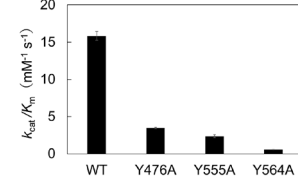


図8 Ghcol 変異体の活性(MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR 分解活性).

- (A) K_m (μM). (B) K_{cat} (s^{-1}). (C) K_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$).

3. 3 塩が Ghcol の活性に及ぼす影響

0~0.54 M NaCl 存在下での Ghcol の FITC-collagen 分解活性を測定した(図 9)。0 M NaCl での活性を 100%とすると, 0.09 M では 363%, 0.18 M では 403%, 0.27 M では 597%, 0.36 M では 609%, 0.45 M NaCl では 813%, 0.54 M では 1068%であった。相対活性は塩濃度の増大とともに増加し, 0.54 M NaCl 添加により活性は約 10 倍となった。SDS-PAGE では差が見られなかった(図 9B)

中性塩濃度 0~1.0 M での Ghcol の FALGPA 分解の反応速度を算出した(図 10)。添加した塩は LiCl, LiBr, NaCl, NaBr, KCl, KBr, KI の 7 種である。リチウム塩, ナトリウム塩, カリウム塩の全てで FALGPA 分解活性が増大した。その効果は, リチウム塩では LiCl > LiBr, ナトリウム塩では NaBr > NaCl, カリウム塩では KCl > KBr > KI となった。最も添加効果が大きかった塩は LiCl であり, 700 mM の LiCl 添加により反応速度は 2.3 倍となった。一方最も効果が小さかった塩は KI であり, 1.0 M の KI 添加により反応速度は 1.08 倍となった。

0~10 mM NaCl での Ghcol の MOCAc-KPLGL(Dpa)-AR 分解の反応速度を算出した(図 11)。反応速度は, 0 mM で 100%, 0.2 mM で 94%, 0.3 μM NaCl 添加で 92%, 0.5 mM で 88%, 1.0 mM で 68%, 2.0 mM で 79%, 3.0 mM で 57%, 4.0 mM で 53%, 5.0 mM で 40%, 6.0 mM で 31%, 7.0 mM で 24%, 8.0 mM で 22%, 9.0 mM で 17%, 10.0 mM で 14%であった。カッコ内の数値は NaCl 無添加時の反応速度を 100%とした時の各サンプルの相対活性である。相対活性は塩濃度の増大とともに減少し, 10.0 mM NaCl 存在下では活性は約 1/4 倍となった。

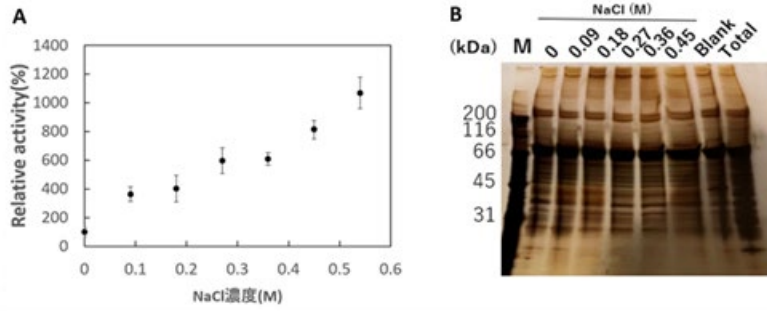


図 9 Ghcol による FITC-collagen 分解反応における NaCl の影響。

(A) 塩添加時の相対活性. 反応は 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 0~0.54 M NaCl, 2.5 mM 酢酸, 1.0 μg/mL Ghcol, 35°C で 30 分間行った。エラーバーは 3 回の測定の SD 値を示す。相対活性は、0 M NaCl での活性を 100% としたときの相対値を示す。
 (B) 銀染色. 12.5% ゲルを使用し、各サンプル 20 μL ずつアプライした。

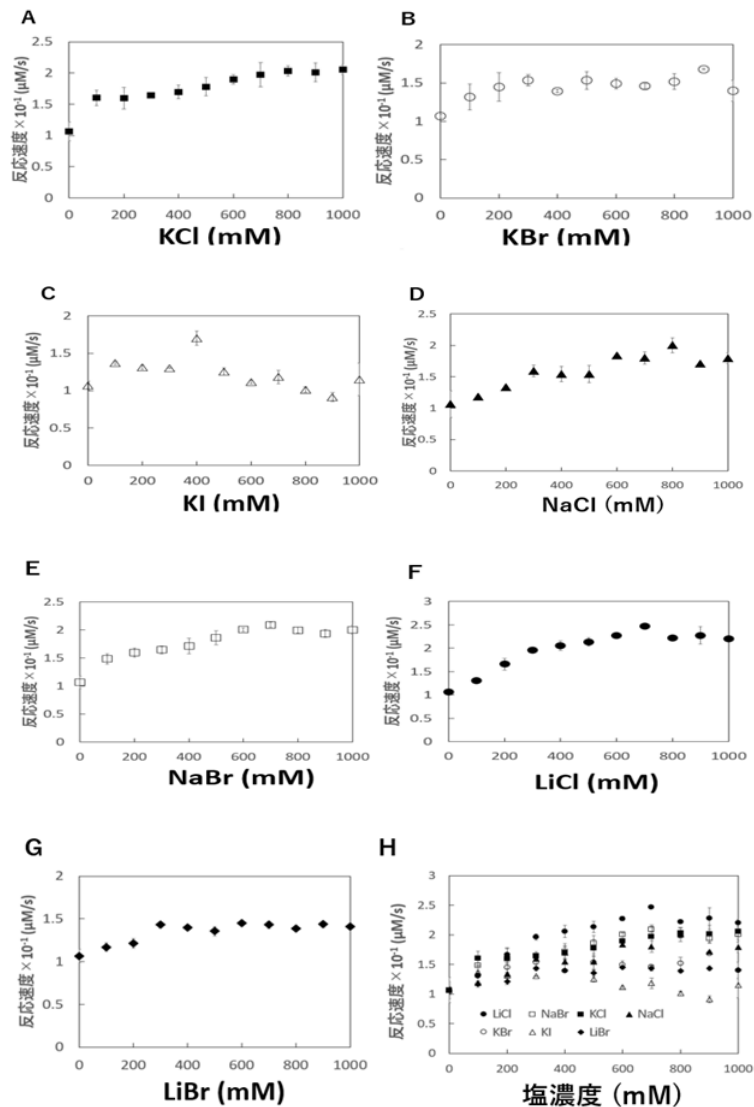


図 10 Ghcol による FALGPA 分解反応における中性塩の影響。

反応は 100 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 10 μM ZnCl₂, 0~1000 mM 中性塩, 1.0 μg/mL Ghcol, 25°C で行った。エラーバーは 3 回の測定の SD 値を示す。

(A) KCl, (B) KBr, (C) KI, (D) NaCl, (E) NaBr, (F) LiCl, (G) LiBr, (H) 7 種の中性塩。

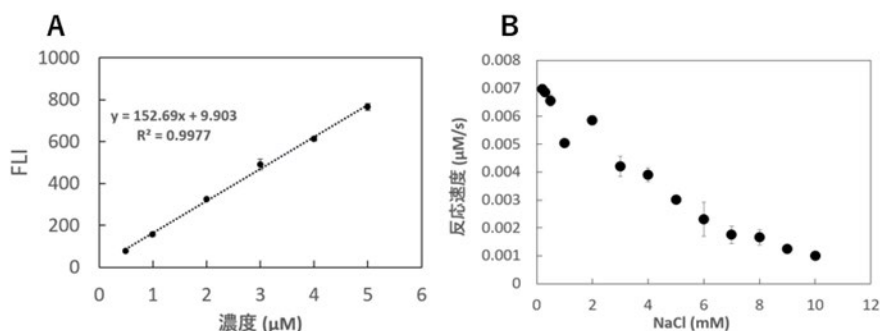


図 11 Ghcol による MOCAC-KPLGL(Dpa)-AR 分解反応における NaCl の影響.

(A) 検量線. MOCAC-PLG を使用し作成した。

(B) 各濃度における NaCl 添加時の反応速度. 反応は, 1 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.5), DMSO, 80 μM MOCAC-KPLGL(Dpa)-AR, 0~10 mM NaCl 中で行い, 1.0 μg/mL Ghcol, 25°Cで行った。エラーバーは 2 回の測定の SD 値を示す。20 μL ずつアプラインした。

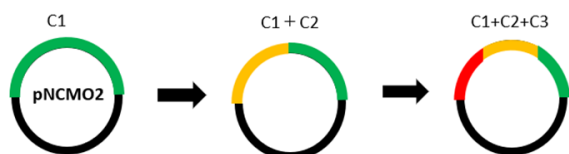


図 12 プラスミド作製のストラテジー.

黒は pNCMO2 ベクター, 緑はインサート C1, 黄はインサート C2, 赤はインサート C3 を示す。

3. 4 大腸菌-*Brevibacillus* シャトル発現ベクターの構築

高活性 Ghcol 創製に向け, 活性部位近傍及び Act と Pet を繋ぐリンカー部分の 1 残基のコードンが他の 19 種類に置換されたライブラリーを作製することを目的に, In-fusion 法により大腸菌と *Brevibacillus* のシャトル発現ベクター pNCMO2-Ghcol を作製した。ベクターとインサートの結合は, 3 回に分けて行った (図 12)。

インサート断片 1 とベクター断片 1 の結合可否を判断する為に行ったコロニー PCR では, クローン 5, 6 において 1151 bp の位置にバンドが見られ, 675 bp のインサート断片 C1 の挿入が確認された。また, クローン C とクローン E において 1160 bp の位置にバンドが見られ, 683 bp のインサート断片 N1 の挿入が確認された (図 13A)。続いて, インサート断片 2 とベクター断片 2 の結合の可否を判断する為に行ったコロニー PCR では, クローン 3 において 1832 bp の位置にバンドが見られ, 681 bp のインサート断片 C2 の挿入が確認された (図 13B)。最後に, インサート断片 3 とベクター断片 3 の結合の可否を判断する為に行ったコロニー PCR では, クローン 4, 8, 11, 12, 13 において 2516 bp の位置にバンドが見られ, 684 bp のインサート

断片 C3 の挿入が確認された (図 13C)。プラスミドのサイズを確認するため, 3 回の In-fusion により作製した pNCMO2-Ghcol を制限酵素 *Hind* III で処理し, アガロースゲル電気泳動にかけた (図 14)。pNCMO2-Ghcol の大きさに相当する 7.3 kbp の位置にバンドが見られた。このことから, pNCMO2-Ghcol は正しく作製されたと考えられた。

今回作製した pNCMO2-Ghcol と従来 Ghcol の発現に用いてきた pNY326-Ghcol をそれぞれ発現させ, Ghcol を精製した。精製表を表 1 に示す。pNCMO2-Ghcol は, pNY326-Ghcol と比較して培養上清画分並びに硫酸沈殿画分で比活性が低く, pNY326-Ghcol の各画分に対する相対活性は培養上清画分で 20%, 硫酸沈殿画分で 9.0% であった。しかし, 陰イオン交換クロマトグラフィー画分では同程度の比活性を示した。

表 1. 精製表.

液量 (mL)	酵素活性 (units/ml)	タンパク質量 (mg)	酵素量 (units)	回収率 (%)	比活性 (units/mg)	精製率 (fold)	
培養上清	64.0	2.41 × 10 ⁴	186	1.54 × 10 ⁶	100	8.28 × 10 ³	1
硫酸沈殿	10.0	4.70 × 10 ⁴	19.3	4.69 × 10 ⁵	30.4	2.44 × 10 ⁴	2.94
DEAE	1.20	1.43 × 10 ⁴	0.432	1.72 × 10 ⁴	1.11	3.97 × 10 ⁴	4.80

液量 (mL)	酵素活性 (units/ml)	タンパク質量 (mg)	酵素量 (units)	回収率 (%)	比活性 (units/mg)	精製率 (fold)	
培養上清	65.0	1.21 × 10 ³	47.9	7.89 × 10 ⁴	100	1.65 × 10 ³	1
硫酸沈殿	10.0	1.70 × 10 ³	7.79	1.70 × 10 ⁴	21.6	2.19 × 10 ³	1.33
DEAE	0.350	1.36 × 10 ⁴	0.126	4.76 × 10 ³	6.03	3.76 × 10 ⁴	22.8

pNY326-Ghcol (上) と pNCMO2-Ghcol (下) の精製表を示す。1 unit は, 35°C, 1 分間の反応でコラーゲンを 1 μg 分解する活性と定義した。回収率は粗酵素の総活性を 100% とした。

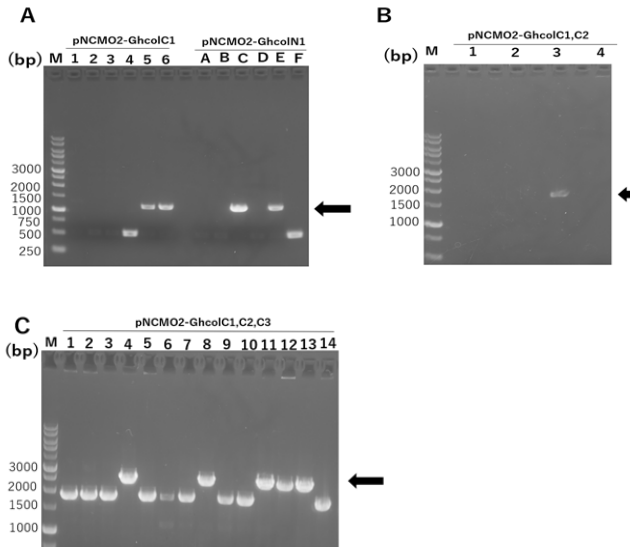


図 13 In-fusion 法によるインサート断片とベクター断片の結合の可否を判断するために行ったコロニーPCR.

- (A) インサート断片 1 のベクター断片 1 への挿入. 矢印は、1151 bp を示す。C1 が挿入された場合には 1151 bp (矢印), N1 が挿入された場合には 1160 bp, 挿入されていない場合は 476 bp となる。
- (B) インサート断片 C2 のベクター断片 2 への挿入. 矢印は、1832 bp を示す。C2 が挿入された場合には 1832 bp (矢印), 挿入されていない場合は 1151 bp となる。
- (C) インサート断片 C3 のベクター断片 2 への挿入. C3 が挿入された場合には 2516 bp (矢印), 挿入されていない場合は 1832 bp となる。

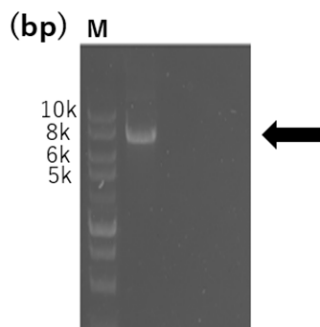


図 14 pNCMO2-Ghcol の *Hind* III 処理産物
1 μ g/mL の臭化エチジウムを含む 2% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動した。矢印は pNCMO2-Ghcol の大きさに相当する 7.3 kbp を示す。

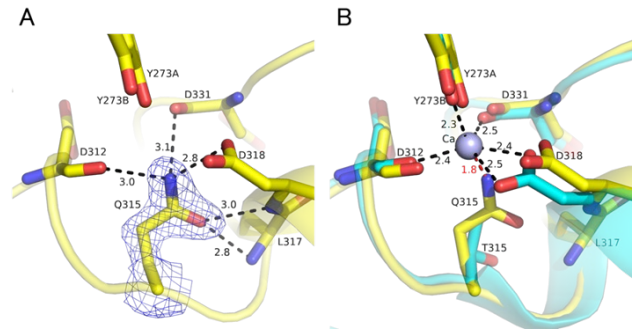


図 15 XynR の 315 位近傍の構造.

- (A) T315Q の 315 位近傍の構造. 数字は残基同士の距離 (Å) を示す。
- (B) T315Q (黄) と WT (シアン) の構造を重ね合わせ. 数字は残基と Ca^{2+} イオンとの距離 (Å) を示す。

3. 5 XynR 変異体 T315Q の結晶構造解析

T315Q (PDB: 8XY0) の全体構造は、WT (7CPK) と同じく α ヘリックスと β シートからなる TIM バレル構造を取っていた。しかし、変異導入を行った Q315 付近に着目すると WT に存在していた 315 位近傍の Ca^{2+} イオンが欠損していた (図 15)。またこの Ca^{2+} イオンの欠損により WT において、D318, D331, Y273) のうち D312, D318, D331 の O 原子と Q315 の N 原子が水素結合を形成していた (図 15)¹³⁾。

3. 6 XynR T315X の活性の pH 依存性

ブナ材由来キシランに対する 37°C での 20 種の T315X の加水分解活性の pH 依存性を調べた (図 16)。いずれもベル型曲線を示した。pH 8.0 での相対活性が WT の 90~110% であった T315S, T315H, T315N, T315Q の至適 pH は 8.0 であり、WT (6.5) よりもアルカリ側であった。また、これら 4 変異体は pH 9.0~10.0 で WT よりも高い相対活性を示した (図 16A, B)。pH 8.0 での相対活性が WT の 60~80% であった T315G, T315C, T315A, T315V も、アルカリ性で高い相対活性を示した (図 16C, D)。他の 11 変異体は、pH 10.0~11.0 において WT よりも低い活性を示し、T315D, T315E は特に顕著であった (図 16E - H)。

次に、pH 10.0, 37°C で T315S, T315H, T315N, T315Q のブナ材由来キシラン分解反応を 2 時間行った。図 17 は既知濃度のキシロースを用いて作成した検量線から求めた、反応液中の還元糖の濃度の経時変化を示す。還元糖の濃度は、T315N > T315Q > T315S > T315H = WT であり、これら 4 変異体のキシラン分解活性は WT の 110~130% であることが示された¹⁴⁾。

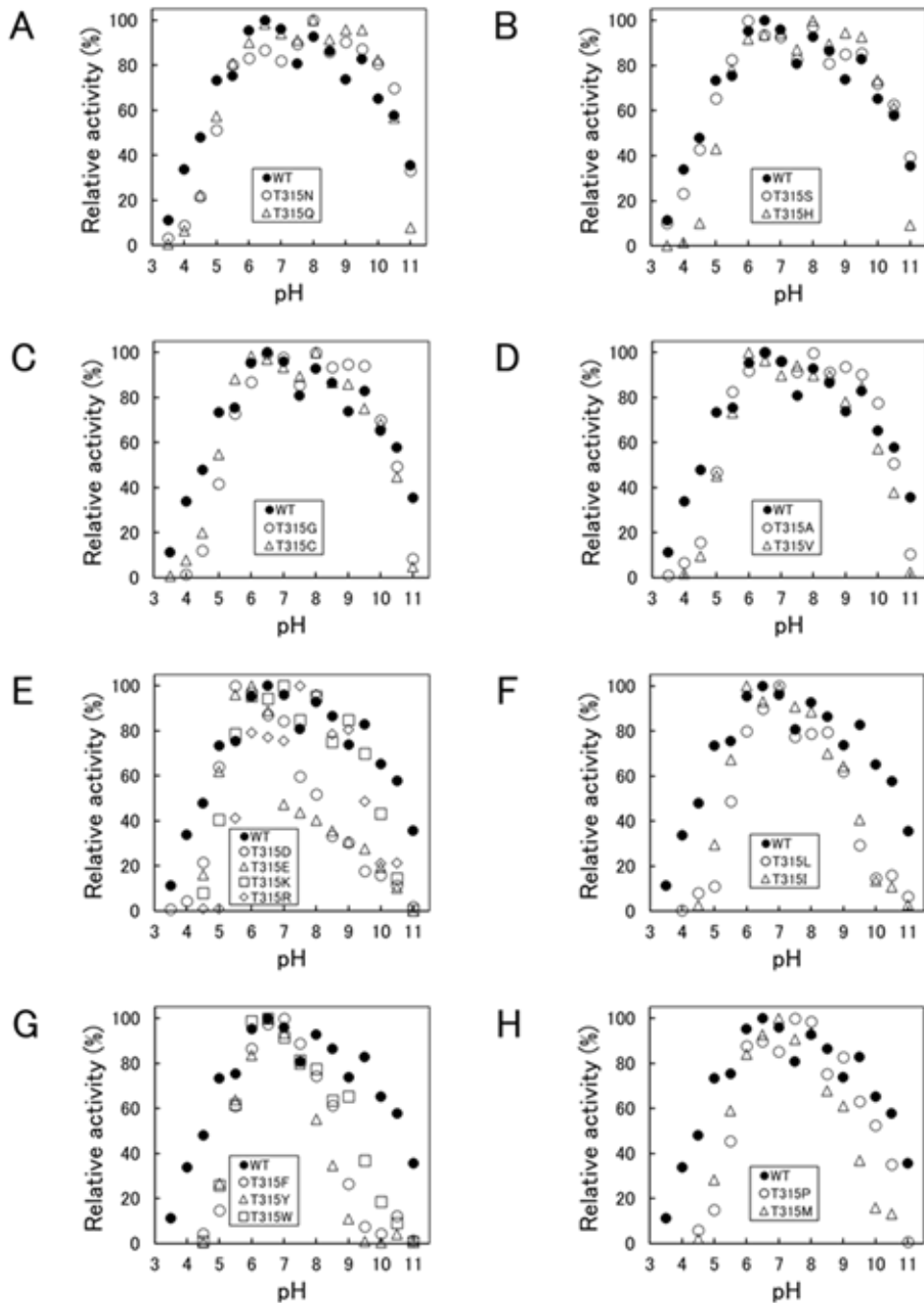


図 16 WT と 19 変異体の活性に対する pH の影響.

反応は 37°C で行った。T315X とブナ材由来キシランの初濃度はそれぞれ 0.5 μM , 9 mg/mL である。pH 3.5~5.5 は 100 mM 酢酸緩衝液, pH 6.0~8.5 は 100 mM リン酸緩衝液, pH 9.0~11.0 は炭酸緩衝液を用いた。縦軸は至適 pH における活性を 100% とした相対活性を示す。

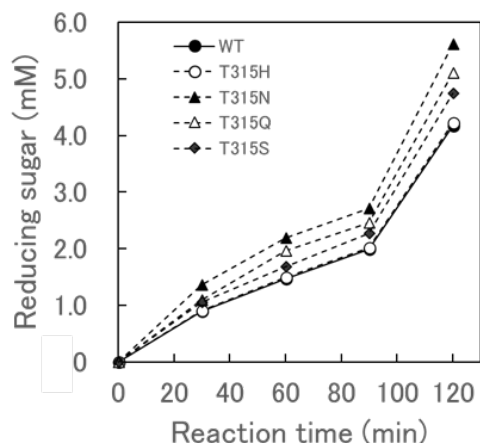


図 17 pH 10.0 での XynR WT と 4 種の変異体の活性。反応は pH 10, 37°C で行った。T315X とブナ材由来キシランの初濃度はそれぞれ 0.5 μ M, 9 mg/mL である。

3. 7 XynR T315X の耐アルカリ性

WT およびアルカリ性で相対活性が WT よりも高かった 4 種の変異体 (T315S, T315H, T315N, T315Q) の各 pH での安定性を測定した (図 18)。T315H と T315Q は、WT よりも著しく狭いベル型曲線を示した。T315N と T315S もまた、WT より狭いベル型を示した。残存活性が 50% 以上保たれる pH は WT で 5.5~11.0 であるのに対して、T315S では 5.0~10.0, T315N では 5.0~9.0, T315H と T315Q では 5.5~8.5 であった。特に 10.0~10.5 では、WT は残存活性 80% 以上を示すのに対し、T315H と T315Q では 1% 以下と大きく低下した。

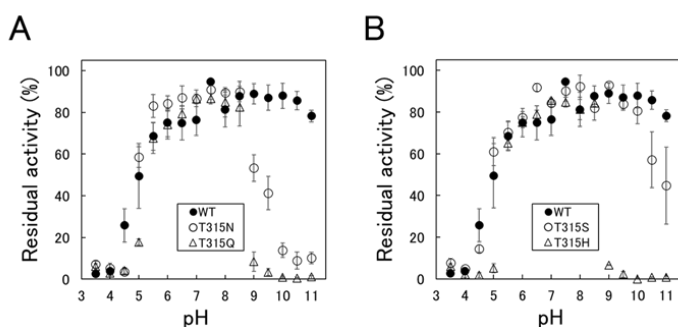


図 18 pH 10.0 での XynR WT と 4 種の変異体の活性。反応は pH 10, 37°C で行った。T315X とブナ材由来キシランの初濃度はそれぞれ 0.5 μ M, 9 mg/mL である。

3. 8 XynR T315X の耐熱性

酵素の安定性評価には Scheme 1 が用いられている。



N と D はそれぞれネイティブ酵素と変性酵素を表す。

Scheme 1 においてタンパク質の安定性は、 T_m (式 1 で F_u が 0.5 になる温度) におけるネイティブ状態と変性状態での G° の差を表す ΔG° によって評価される。

$$F_u (\text{変化率}) (\%) = [A_0 - A_N] / [A_D - A_N] \quad (\text{式 1})$$

A_0 は各温度での T315X の $[\theta]_{222}$ であり、 A_N と A_D はそれぞれネイティブ酵素と変性酵素の $[\theta]_{222}$ である。

変異による二次構造変化を調べた。WT と 4 種の変異体 (T315S, T315H, T315N, T315Q) の 200~250 nm のモル楕円率を pH 8.0, 25°C にて測定し、図 19A に CD スペクトルを示した。どの変異体も 200~250 nm において WT と同様の曲線、222 nm 付近で極小値を示したことから、315 位への変異が二次構造変化を引き起こしていないことがわかった。25~90°C の範囲の昇温過程におけるモル楕円率 $[\theta]_{222}$ を計測し、変化率を図 19B-F に示した。WT および 4 変異体の変性曲線は、明らかな 2 状態モデルを示した。WT および各変異体の 0 および 5 mM CaCl_2 における T_m 値を表 2 に示す。これらは WT > T315N \approx T315S > T315H \approx T315Q の順であり、いずれも WT よりも低いことから 315 位の変異が XynR の安定性を低下させたことを示している。また、5 mM の CaCl_2 での T_m 値は 0 mM の CaCl_2 よりも 6.4~10.6°C 高く、 Ca^{2+} イオンがタンパク質の安定化に関与していることが示された。

表 2. XynR WT と 4 種の変異体の T_m .

	T_m ($^\circ\text{C}$)		B - A ($^\circ\text{C}$)
	0 mM CaCl_2 (A)	5 mM CaCl_2 (B)	
WT	65.0	71.9	6.9
T315H	57.5 (-7.5)	68.1 (-3.8)	10.6 (+3.7)
T315N	63.2 (-1.8)	69.6 (-2.3)	6.4 (-0.5)
T315Q	58.0 (-7.0)	67.5 (-4.4)	9.5 (+2.6)
T315S	63.3 (-1.7)	70.1 (-1.8)	6.8 (-0.1)

() 内の値は WT との差を示す。

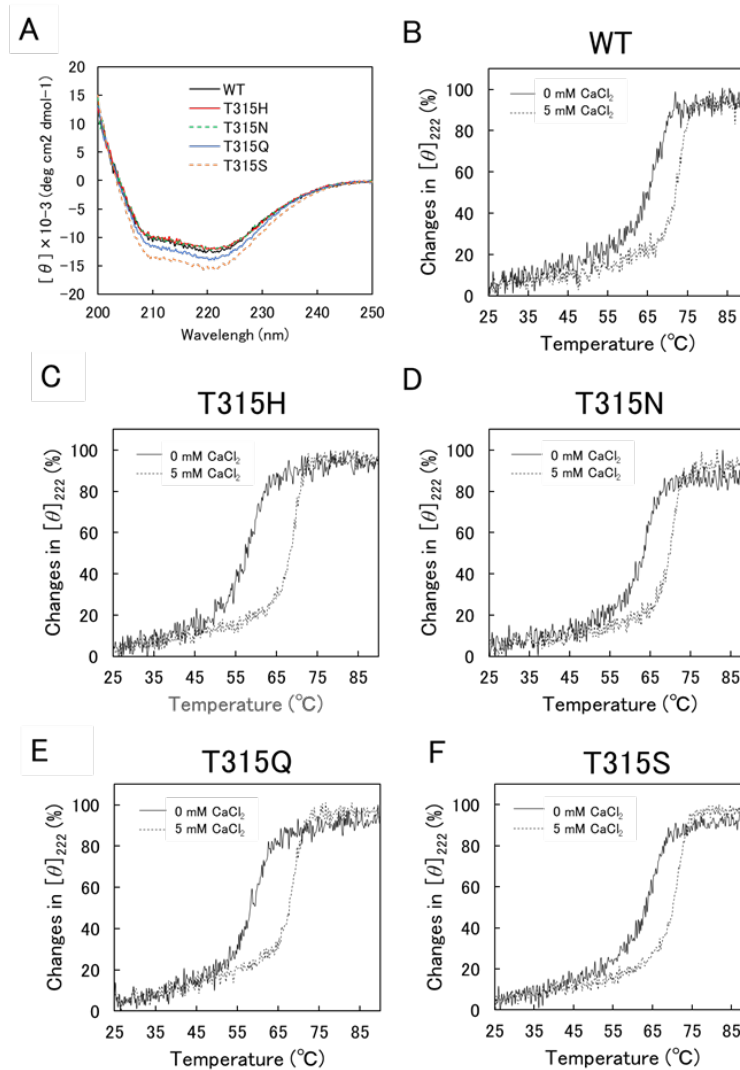
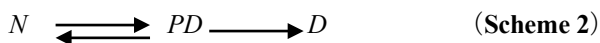


図 19 XynR WT と 4 種の変異体の CD 分析.

(A) 200~250 nm における CD スペクトル. 酵素の $[\theta]_{200-250}$ は, CaCl₂ 非存在下において 20 mM リン酸緩衝液, pH 8.0 中で, 25°C で測定した。
 (B - F) $[\theta]_{222}$ の変化. 酵素の $[\theta]_{222}$ を, 0 または 5 mM CaCl₂ 存在下において 20 mM リン酸緩衝液中で, pH 8.0, 25~90°C (昇温速度は 0.5°C/分) で測定した。

Scheme 2 も同じく酵素の安定性評価に用いられている。



ここで, N, D, PD はそれぞれネイティブ酵素, 変性酵素, 部分変性酵素を表す。Scheme 2 において, タンパク質の安定性は, ネイティブ状態と遷移状態間の G^\ddagger の差を表す ΔG^\ddagger によって評価される。

pH 8.0, 58~72°C で熱処理した際の残存活性を, 開始 0 分での活性を 100% として算出した (図 20A - E)。

その結果, 図 20A - E の右の図で直線が得られ, 一次の熱失活であることが示された。各温度で得られた熱失活速度定数 (k_{obs}) を表 3 にまとめた。 k_{obs} は温度が高くなるにつれて増加した。 k_{obs} が 0.05~0.10 min⁻¹ であった温度は, WT > T315N ≈ T315S > T315H ≈ T315Q の順であったことから, 315 位の変異が XynR の熱安定性を低下させたことが示された。図 21 はアレニウスプロットを示す。 k_{obs} の対数と $1/T$ の間には直線関係が得られた。65°C にお

る WT および変異体の熱失活に関する熱力学的パラメータを式 2~5 を用いて算出し、表 4 にまとめた。

$$\ln(k_{\text{obs}}) = -(E_a/R)(1/T) + \text{Const} \quad (\text{式 2})$$

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT[\ln(k_{\text{obs}}) - \ln(RT/Nh)] \quad (\text{式 3})$$

$$\Delta H^{\ddagger} = E_a - RT \quad (\text{式 4})$$

$$\Delta S^{\ddagger} = (\Delta H^{\ddagger} - \Delta G^{\ddagger})/T \quad (\text{式 5})$$

ここで、 R 、 T 、 N 、 h は、それぞれ気体定数(= 8.314 J K⁻¹ mol⁻¹)、絶対温度(単位はケルビン)、アボガドロ数(= 6.022 × 10²³ mol⁻¹)、プランク定数(= 6.626 × 10⁻³⁴ J s)を表す。 ΔH^{\ddagger} は熱失活の活性化標準エンタルピー変化を、 ΔS^{\ddagger} は熱失活の活性化標準エントロピー変化を示す。その結果、タンパク質の安定性を示す ΔG^{\ddagger} は、WT > T315N ≈ T315S > T315H ≈ T315Q の順であった。すべての変異体において ΔH^{\ddagger} と ΔS^{\ddagger} は減少を示したことから、熱安定性の低下は ΔH^{\ddagger} の減少に起因することが示された。特に、 ΔH^{\ddagger} と ΔS^{\ddagger} の減少は T315N と T315S では顕著であったが、T315H と T315Q ではわずかであり、Thr315 の Asn または Ser への変異と His または Gln への変異で違いが見られた¹⁵⁾。

表 3. 各温度における XynR WT と 4 種の変異体の熱失活の一次速度定数 (k_{obs}) .

Temperature (°C)	$k_{\text{obs}} \times 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$														
	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
WT										24	20	50	70	120	120
T315H	19	31	47	65	120										
T315N					40	53	88	99	120		220				
T315Q	23	31	51	67	140	210									
T315S						29	34	43	110	81	120				

表 4. XynR WT と 4 種の変異体 65°Cでの熱失活における熱力学的パラメータ.

XynR	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔG^{\ddagger} (kJ mol ⁻¹)	ΔH^{\ddagger} (kJ mol ⁻¹)	ΔS^{\ddagger} (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
WT	384	92	382	857
T315H	371	82	369	849
T315N	260	86	258	510
T315Q	368	82	366	839
T315S	292	88		

E_a 、 ΔG^{\ddagger} 、 ΔH^{\ddagger} 、 ΔS^{\ddagger} はそれぞれ熱失活の、活性化エネルギー、活性化のギブスエネルギー変化、活性化のエンタルピー変化、活性化のエントロピー変化を表す。また、二重測定の前平均値を示す。

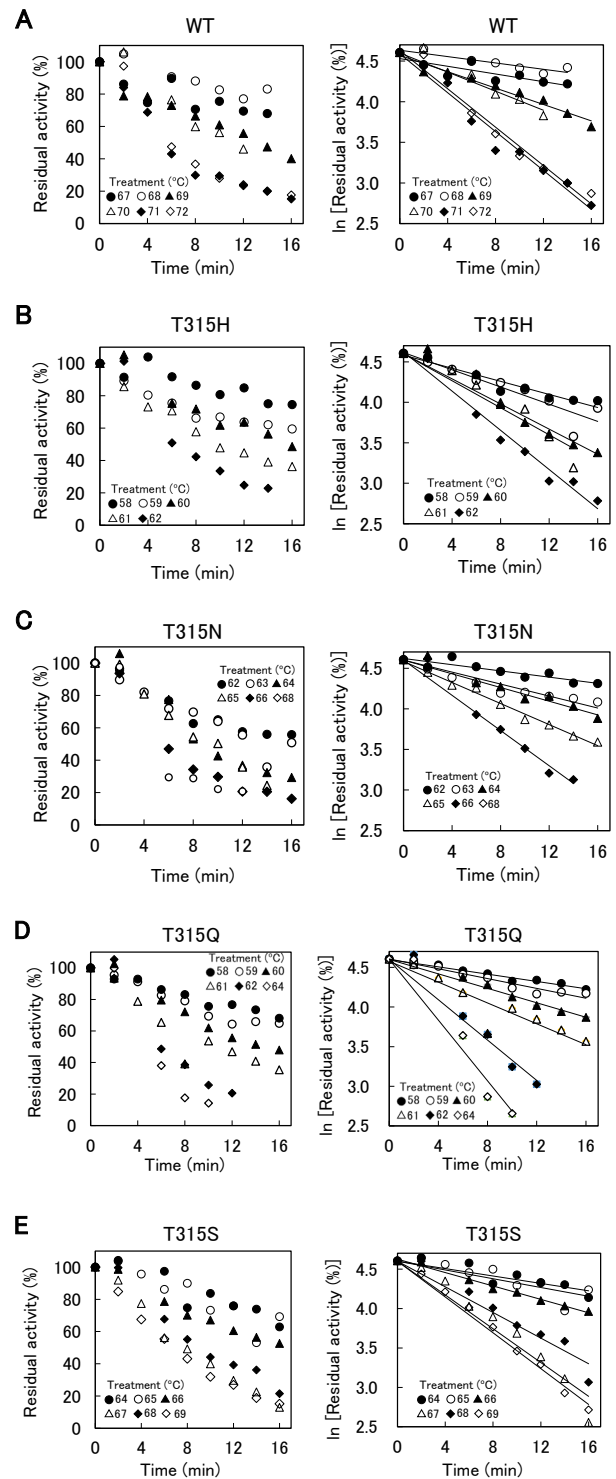


図 20 XynR WT と 4 種の変異体の熱失活.

(A-E) 1.5 μM の酵素 (100 mM HEPES-NaOH 緩衝液, pH 8.0) を 58~72°C で一定時間インキュベートした。その後、37°C においてブナ材由来キシランの加水分解反応を行った。T315X とブナ材由来キシランの初濃度はそれぞれ 0.5 μM, 9 mg/mL である。残存活性は熱処理前の活性を 100% とした熱処理後の活性である。

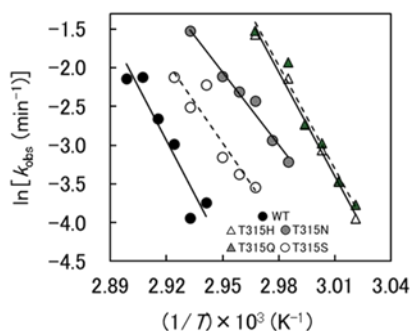


図 21 アレニウスプロット。

図 20. A - E の下段のグラフの傾きから得られた k_{obs} の自然対数を, 熱失活の絶対温度の逆数に対してプロットした。

4. 考察

安価な塩類の添加により酵素活性を増加させることは, 酵素の工業的利用において有利であると考えられる。中性塩が亜鉛プロテアーゼの活性に与える効果については, 多くの報告がなされてきた。 *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の好熱性中性亜鉛プロテアーゼであるサーモライシン[EC 3.4.24.27]の活性は, 飽和濃度の LiCl, NaCl, KCl の存在下で 20 倍以上も増大した¹⁶⁾。サーモライシンは, 人工甘味料アスパルテーム前駆体である *N*-carbobenzoxy-L-Asp-L-Phe methyl ester (ZDFM) の合成をはじめとして, 加水分解の逆反応によるペプチド合成に広く用いられている。MMP7 の活性は, 飽和濃度の NaCl の存在下で 5 倍に増大した¹⁷⁾。 *Streptomyces caespitosus* neutral protease の活性は, NaCl を添加すると増大したが, LiCl, KCl を添加すると減少した¹⁸⁾。中性塩による活性化のメカニズムとしては, 酵素の溶解度の増大や, 基質の特定の部位へのイオンの結合が考えられている^{16, 17)}。

NaCl は, Ghcol の FITC-コラーゲン分解活性(図 9)と FALGPA 分解活性(図 10)を増大させたが, MOCAC-KPLGL(Dpa)-AR 分解活性を阻害した(図 11)。基質によって中性塩の効果が異なったことについては, 基質の特定の部位へのイオンの結合が考えられる。このような基質による違いは, サーモライシンでも報告されている¹⁶⁾。また, FALGPA 分解活性ではイオン種により活性化の程度が異なった(図 10)。活性化に対するイオンの効果は, カチオンでは Li^+ , K^+ , Na^+ の順, アニオンでは Cl^- , Br^- , I^- の順であり, ともにイオン半径が小さい順であった。これらは, 水を構造化させる能力の順にイオンを配列したホフマイスタ

一系¹⁸⁾に一致することから, 中性塩による Ghcol の活性化には溶媒への影響が関与していると考えられた。

5. 今後の課題

Ghcol については, Ala352-D368, Asn454-Leu490, Val550-Leu569 に網羅的変異を導入した全アミノ酸スキャニングライブラリーからの, 好塩性, 高活性, 耐熱性に優れた変異体取得を現在実施している。XynR については今後, T315Q の活性部位近傍に網羅的変異を導入した全アミノ酸スキャニングライブラリーを作製し, 好塩性, 高活性, 耐熱性に優れた変異体取得を試みる。

6. 文献

1. Teramura, N., Tanaka, K., Iijima, K., Hayashida, O., Suzuki, K., Hattori, S., and Irie, S. Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*. *J. Bacteriol.* **193**(12), 3049-3056, 2011
2. Takita, T., Qian, J., Geng, H., He, Z., Nemoto, S., Mori, M., Tanaka, K., Hattori, S., Kojima, K., and Yasukawa, K. Comparative studies on the activities of collagenases from *Grimontia hollisae* and *Clostridium histolyticum* in the hydrolysis of synthetic substrates. *J. Biochem.* **163**(5), 425-431, 2018
3. Hayashi, K., Ikeuchi, T., Morishita, R., Qian, J., Kojima, K., Takita, T., Tanaka, K., Hattori, S., and Yasukawa, K. The roles of histidine and tyrosine residues in the active site of collagenase in *Grimontia hollisae*. *J. Biochem.* **168**(4), 385-392, 2020
4. Ikeuchi, T., Yasumoto, M., Takita, T., Tanaka, K., Kusubata, M., Hayashida, O., Hattori, S., Mizutani, K., Mikami, B., and Yasukawa, K. Crystal structure of *Grimontia hollisae* collagenase provides insights into its novel substrate specificity toward collagen. *J. Biol. Chem.* **298**(8), 102109, 2022
5. Eckhard, U., Schönauer, E., Nüss, D., and Brandstetter, H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1109-1114, 2011
6. Eckhard, U., Schönauer, E., and Brandstetter, H. Structural basis for activity regulation and substrate

- preference of clostridial collagenases G, H, and T. *J. Biol. Chem.* **288**(28), 20184–20194, 2013
7. Wang, Y., Wang, P., Cao, H. Y., Ding, H. T., Su, H. N., Liu, S. C., Liu, G., Zhang, X., Li, C. Y., Peng, M., Li, F., Li, S., Chen, Y., Chen, X. L., and Zhang, Y. Z. Structure of *Vibrio* collagenase VhaC provides insight into the mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat Commun.* **13**, 566, 2022
8. Kumar, D., Dangi, A. K., and Shukla, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. *Mol. Biotechnol.* **60**, 226–235 (2018).
9. Nakatani, K., Katano, Y., Kojima, K., Takita, T., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K. Increase in the thermostability of *Bacillus* sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**(10), 1715-1723, 2018
10. Kuwata, K., Suzuki, M., Takita, T., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K. The mutation of Thr315 to Asn of GH10 xylanase XynR increases the alkaliphily but decreases the alkaline resistance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **85**(8), 1853-1860, 2021
11. Takita, T., Nakatani, K., Katano, Y., Suzuki, M., Kojima, K., Saka, N., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K. Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using a site saturation mutagenesis library. *Enzyme Microb. Technol.* **130**, 109363, 2019
12. Suzuki, M., Takita, T., Kuwata, K., Nakatani, K., Li, T., Katano, Y., Mizutani, K., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., and Yasukawa, K. Insight into the mechanism of thermostabilization of GH10 xylanase from *Bacillus* sp. strain TAR-1 by the mutation of S92 to E. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **85**(2), 386-390, 2021
13. Ueshima, S., Yasumoto, M., Kitagawa, Y., Akazawa, K., Takita, T., Tanaka, K., Hattori, S., Mizutani, K., Mikami, B., and Yasukawa, K. Insights into the catalytic mechanism of *Grimontia hollisae* collagenase. *FEBS Lett.* **597**(19), 2473-2483, 2023
14. Nakamura, T., Kuwata, K., Takita, T., Mizutani, K., Mikami, B., Nakamura, S., and Yasukawa, K. Effects of amino acid residue at position 315 of GH10 xylanase XynR on its alkaliphily. *J. Biol. Macromol.* **24**(1) 11-16, 2024
15. Nakamura, T., Takita, T., Kuwata, K., Mizutani, K., Mikami, B., Nakamura, S., and Yasukawa, K. Activity-stability trade-off observed in variants at position 315 of the GH10 xylanase XynR. *Sci. Rep.* in press, 2024
16. Inouye, K. Effects of salts on thermolysin: activation of hydrolysis and synthesis of *N*-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, and a unique change in the absorption spectrum of thermolysin. *J. Biochem.* **112**(3), 335-340, 1992
17. Oneda, H. and Inouye, K. Effects of dimethyl sulfoxide, temperature, and sodium chloride on the activity of human matrix metalloproteinase 7 (matrilysin). *J. Biochem.* **128**(5), 785-791, 2000
18. Inouye, K., Shimada, T., and Yasukawa, K. Effects of neutral salts and alcohols on the activity of *Streptomyces caespitosus* neutral protease. *J. Biochem.* **142**(3), 317-324, 2007

Increase in Salt Resistance of Collagenase and Xylanase Based on Their Structural Analysis

Kiyoshi Yasukawa, Teisuke Takita

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

It is thought that in order to expand the industrial use of collagenase and xylanase, not only high activity and stability but also high salt resistance is necessary. In this study, we aim to determine the X-ray crystal structures of *Grimontia hollisae* collagenase (Ghcol) and *Bacillus* GH10 xylanase XynR to increase their salt resistance.

Ghcol was expressed in *Brevibacillus* and purified from the supernatant. To explore its catalytic mechanism, its substrate (Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp, GPOGPO)-complexed crystal structure was determined at 2.0 Å resolution. A water molecule was observed near the active-site zinc ion. Since this water was not observed in the product (GPO)-complexed Ghcol, it was hypothesized that the GPOGPO-complexed Ghcol structure reflects a Michaelis complex, providing a structural basis for understanding the catalytic mechanism. Analyses of the active-site geometry and site-directed mutagenesis of the active-site tyrosine residues revealed that Glu493 and Tyr564 were essential for catalysis, suggesting that Glu493 functions as an acid and base catalyst while Tyr564 stabilizes the tetrahedral complex in the transition state. These results shed light on the catalytic mechanism of bacterial collagenase.

XynR was expressed in *E. coli* and purified from the cells. In the hydrolysis of beechwood xylan, all 19 variants at position 315 exhibited bell-shaped pH-activity profiles. T315H, T315N, T315Q, and T315S exhibited a broader bell-shaped pH-dependence of activity than WT. Crystallographic analysis revealed that the Ca²⁺ ion near position 315 in WT was absent in the T315Q variant. We accordingly hypothesized that the enhancement of alkaliphily in T315Q, and probably also in the T315H, T315N, and T315S variants, could be ascribed to an activity-stability trade-off associated with a reduction in stability due to the lack of this Ca²⁺ ion. Consistent with expectations, the alkaline resistance of T315H, T315N, T315Q, and T315S was found to be lower than that of WT. In addition, the thermostabilities of these four variants, as assessed using the denaturing temperatures (T_m) at 0 mM CaCl₂ based on ellipticity at 222 nm in circular dichroism measurements, were lower than that of WT.

Screening of Ghcol and XynR with higher activity, thermostability, and/or salt resistance is currently underway.