蛋白質のアルカリ耐性

名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻
白井 剛

1. はじめに

家庭用洗剤への酵素の添加は歴史も古く、利用規模から見ても産業利用酵素の代表格である¹⁾。洗剤酵素には、アルカリ溶液中で活性の高い好アルカリ性微生物由来のものが利用されている²⁾。我々は酵素のアルカリ耐性機構の解明と、その蛋白工学的な応用を目指して、花王㈱の家庭用洗剤に添加されている2つのアルカリ耐性酵素、M-プロテアーゼとアルカリセルラーゼの結晶構造解析を行った^{3), 4)}。アルカリセルラーゼは、繊維の非晶部を分解して汚れを遊離させる働きをする。M-プロテアーゼは繊維に付着した蛋白性汚れを分解する酵素で、269 アミノ酸残基からなるズブチリシン族セリンプロテアーゼである。この酵素の活性の至適pHは12.3であるが、どのような分子構造がこれほどのアルカリ耐性を実現しているのか、1.5 オングストローム分解能での結晶構造解析と分子進化系統の解析を組み合わせて考察を加えた。

2. M-プロテアーゼの高アルカリ耐性機構

たいていの耐性酵素には、それと相同であるが耐性の劣る酵素が自然界に存在する。M-プロテアーゼの場合にも、例えば*B. amyloliquefaciens*由来のズブチリシンBPN'などの酵素活性至適pHが8~11程度の相同酵素が存在する。図1に示したズブチリシン族プロテアーゼの系統樹で、M-プロテアーゼを始めとするpH12以上のアルカリ耐性を示すグループ（高アルカリ耐性）と、それらよりも至適pHの低いグループ（アルカリ耐性）は分離している。よって、高アルカリ耐性に必要な変異はこれら2群を隔てる枝の上で起こったはずである。この場合、変異の順序を気にしなければ、系統樹の根はどこでもよい。この枝の両端のAとBで示した結

節点には両グループの祖先酵素が位置するが、その間で蓄積された変異は、現存するどの酵素間で比較するよりも高アルカリ耐性に必須の変異を高頻度で含んでいる。

最大節約アミノ酸置換過程を求めることで、祖先酵素AとBのアミノ酸配列を推定することができる^{6), 7)}。この場合は、図1に示した系統樹の結節点に20種類のアミノ酸をすべての組み合わせで当てはめ、それぞれの組み合わせについて系統樹上で何回アミノ酸置換が起こったかを数え、最も置換数が少ないモデルを選択した。

この方法で祖先酵素のアミノ酸配列を推定した結果から、アルカリ耐性の祖先酵素Bから高アルカリ耐性の祖先酵素Aへの過程で、アスパラギン（3.9残基）、アルギニン（1.9残基）、ヒスチジン（1.3残基）、スレオニン（1.2残基）、グルタミン（1.1残基）が増加し、アスパラギン酸（2.5残基）、リジン（1.5残基）、グリシン（1.5残基）、グルタミン酸（1.4残基）が減少したことが分かった。酸性アミノ酸が減少し、塩基性アミノ酸であるアルギニンが増加する事によって、等電点はアルカリ側

図1 アルカリ耐性プロテアーゼの分子系統樹。この系統樹は、進化距離に最尤法、樹形に近隣結合法を用いて作成されたものである。値はそれぞれの枝の進化距離（PAM）。

Alkaline tolerance of proteins

Tsuyoshi SHIRAI

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University

図2 高アルカリ耐性獲得過程で形成されたと推定される水素結合・静電相互作用ネットワーク (立体図). 太線で示したアミノ酸側鎖は図1の祖先酵素BからAの間で置換された部位のものである. 水素結合を点線で、第二Ca²⁺結合部位を黒丸で示した.

にシフトする. 実際, M-プロテアーゼの等電点 (10.6) は、例えば *B. subtilis* 由来のズブチリシン Carlsberg (9.4) よりも高い. これは、よりアルカリ性側で蛋白質表面の電荷バランスをとれるように変化したためと考えられる.

M-プロテアーゼの結晶構造によると、この高アルカリ耐性獲得の過程は単に表面電荷の調節だけが目的ではないことがうかがえる. 図2に耐性獲得過程で置換されたアミノ酸残基によって形成される水素結合・静電相互作用ネットワークを示した. このネットワークはM-プロテアーゼの両末端が接近する領域から、第二Ca²⁺結合部位まで伸びている. M-プロテアーゼの属するズブチリシン族のプロテアーゼは2~3箇所のCa²⁺結合部位を持ち、イオンの結合は酵素の構造安定化に必要である. このネットワークはCa²⁺の結合による構造安定化の効果を、両末端が接触する領域まで伝搬すると考えられる. アルカリ耐性グループから高アルカリ耐性グループへの過程で、分子内の水素結合および静電相互作用の総数は増加するが、その増加分はこのネットワークに含まれる数とほぼ一致し、このネットワークが重要な内部相互作用であることを示している.

上記の方法で推定される祖先酵素間のアミノ酸置換総数は42.1である. 結晶構造上でこれら置換部位の配置をみると、酵素分子の半球に分布が偏っている事がわかる (図3). この半球は、上記の水素結合・静電相互作用ネットワークを含む領域であり、これらの置換はネットワーク構造の微調整の役割を持っていると考えられる. あるアミノ酸残基の置換は、立体構造上で近接

水素結合・静電相互作用ネットワーク

図3 M-プロテアーゼ立体構造と置換部位の分布. 細線より左は主としてアミノ末端側の残基からなる領域、右はカルボキシル末端側からなる領域である. 図1の祖先酵素BからAの間で置換されたと推定される部位を球で示した. 図中央付近で側鎖を示したのは触媒残基である. この図はMOLSCRIPT²⁾で作成した.

した部位の置換パターンに影響を与える場合がある. このアミノ酸置換の相互作用がドミノ式に伝搬した過程が、図3に示した置換部位の局在化として観察されたものと考えている.

3. 分子進化と蛋白工学

蛋白質の分子進化は自然による蛋白工学であり、その成果は明らかに現在の人為的な工学の域を超えている. 自然の手法による結果をよく観察して模倣することは、蛋白工学技術を洗練させるための有力な手段である. 天然蛋白質の構造比較は頻繁に行われているが、現存する蛋白質間の比較には相当な“雑音”が混入していることは否めない. 例えばここに示した例で、高アルカリ耐性獲得の後もそれぞれの酵素は相当数の置換を受けているが、それらは耐性獲得に本質的な寄与はしなかったはずである. 分子進化の系統と構造の比較を組み合わせることは、結果のみを比較するのではなく、その結果にいたるプロセスを加味することにあたる. この例では、系統樹を使って特定の時期に蓄積されたアミノ酸置換だけを取り出すことで、水素結合・静電相互作用ネットワーク周辺への置換の集中が観察された. これを、“耐性獲得のために必要な構造を組み込んだ場合には周辺構造にそれなりのアフターケアが必要になる”と解釈すれば、蛋白工学における一つの経験則になる. 分子系統の推定法をはじめ、分子進化の研

究のために開発された手段を蛋白工学の道具として利用する方法は相当に発展の余地があるように思われる。

謝 辞

この研究は、人見 潤氏、尾崎克也博士、小林 徹博士、伊藤 進博士(花王株式会社生物科学研究所)、日高輝夫君、久山和雄君、鈴木淳巨博士、山根 隆博士、芦田玉一博士(名古屋大学大学院工学研究科)との共同研究として行われたものであり、以上の方々に感謝致します。

文 献

- 1) 上島孝之(1995) 産業用酵素, pp.15-58, 丸善, 東京.
- 2) 伊藤 進(1993) 好アルカリ性微生物(堀越, 秋葉編), pp.266-273, 学会出版センター, 東京.
- 3) Shirai, T., Suzuki, A., Yamane, T., Ashida, T., Kobayashi, T., Hitomi, J. and Ito, S. (1997) *Protein Engng.* **10**, 627-634.
- 4) Shirai, T., Yamane, T., Hidaka, T., Kuyama, K., Suzuki, A., Ashida, T., Ozaki, K. and Ito, S. (1997) *J. Biochem.* **122**, 683-685.
- 5) Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr* **24**, 946-950.
- 6) Stewart, C.-B., Alden, R. A. and Kraut, J. (1969) *Nature* **221**, 401-404.
- 7) Goodman, M., Moore, W. and Matsuda, G. (1975) *Nature* **253**, 603-608.