

アスパラギン酸プロテアーゼ類の 蛋白工学的改変によるケラチナーゼの開発

東京大学大学院理学系研究科

井上英史

An aspartic proteinases, proctase B from *Aspergillus niger var. macrosporus*, was prepared by two types of heterologous systems, i.e., an expression- *in vitro* refolding system using *Escherichia coli* and an expression-secretion system using *Bacillus brevis*. Both of the systems gave potentially active proproctase B, which was converted into the mature form under acidic conditions ($\text{pH} \leq 5$) by autoproducting. The completely processed form had almost the same properties with native proctase B although their N-termini were different from each other. The *B. brevis* expression system yielded proproctase B corresponding to 50 mg of active proctase B per one liter of culture. The replacement of Arg6 or Lys7 in the prosequence with glutamine increased the yield up to 120 mg. These expression systems, especially the *B. brevis* system, enable us to alter the properties of proctase B by site-directed mutagenesis and to study the relationships between the structure and substrate specificity of proctase B to increase the activities toward keratin and collagen.

1 緒言

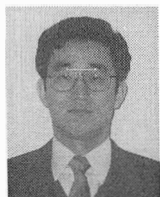
皮膚は身体を被覆することにより、体内の諸器官が外部から種々の刺激や傷害を受けることを防衛する。表皮の最も外側において、この重要な役割を担っている角質層は化粧品学においても非常に重要な身体組織である、角質層を構成する成分として主要なものはケラチンと呼ばれる蛋白質である。ケラチンは不溶性であり、かつ種々の要因に対して抵抗性が強く、このことにより身体の最外層の構成成分としての重要な役割を果たすと考えられる。しかし一方では、このような性質のためにケラチンは生化学的には非常に扱いにくい蛋白質であり、研究は進んでいない。蛋白質を分解する酵素プロテアーゼは、これまでに多くの生物種から非常に多数の分子種が単離され研究されてきているが、そのほとんどは、身体の強靱な組織を構成するケラチンやコラーゲンなどの“固い”

蛋白質を消化する機能を持たない、ケラチンを分解するプロテアーゼはケラチナーゼと総称されるが、ケラチナーゼに関する研究は少ない。

皮膚感染を起こす菌として *Candida* 属が知られるが、これらは菌体外にアスパラギン酸プロテアーゼを分泌する。このアスパラギン酸プロテアーゼはケラチンやコラーゲンを分解する活性を持つことが報告されている。アスパラギン酸プロテアーゼは、真核生物に広く存在しており、哺乳類においてもペプシン、レニン、カテプシンD・E等、生理機能の異なる他数の分子種が存在している。これらは構造や触媒機構において共通性を持っており、同一の起源から進化したと考えられる。我々が本研究で用いる糸状菌 *Aspergillus niger var. macrosporus* が分泌するアスパラギン酸プロテアーゼ（プロクターゼB）^{1, 2)} は消化薬として用いられているが、コラーゲンを分解するコラゲナーゼ活性を持つことが知られている¹⁾。

プロテアーゼがケラチンやコラーゲン等を分解するための必要条件は何であるのか、あるプロテアーゼを改変してこのような蛋白質に対する活性を高めるためにはどうすれば良いのか。このような点を明らかにし、ケラチン分解活性を持った新規な酵素を蛋白工学的に創生することは皮膚科学や化粧品学の基礎研究・応用に役立つと思われる。

Study on the relationship between structure and keratinase activity of aspartic proteinases.



Hideshi Inoue

The University of Tokyo

また、ケラチン含有組織を蛋白質資源として有効利用することにも応用されることが期待される。そこで本研究では、種々のアスパラギン酸プロテアーゼを改変することにより、ケラチナーゼ活性を付与または増強することを目的とし、アスパラギン酸プロテアーゼの大量発現系を構築し、部位特異的変異を行うことにより発現量の向上を行った。

2 実験

2・1 大腸菌による発現系の構築

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び、*A. niger var. macrosporus* 由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をpolymerase chain reaction法により増幅し、それぞれT7プロモーターを持つ発現ベクターpAR2113⁴⁾に組み込み、大腸菌BL21(DE3)に導入した。発現に用いたプラスミドが各プロテアーゼ前駆体を正しくコードしていることを、DNAシーケンシングにより確認した。クローン化した形質導入株をM9ZB培地で培養し、イソプロピルチオガラクトピラノシドを加えることにより発現を誘導した。培養後、集菌した菌体をリゾチーム処理、超音波破碎処理により溶菌した。以下にプロブクターゼBにおける実験手順を記す。溶菌後遠心して封入体を沈殿させ、8M尿素、100mM 2-メルカプトエタノールを含むトリス-塩酸バッファー(pH8)で変性プロブクターゼBを抽出した。透析して変性剤と還元剤を取り除くことによりリフォールディングを行った。遠心して上清をとり、DE52カラムに吸着させた。0~0.5M NaClの直線濃度勾配によりプロブクターゼBを溶出し、潜在活性をもつフラクションを集めた。次にPhar-macia LKBの Superose6HRカラムを用いてゲル濾過を行い、さらに20mMトリエタノールアミン緩衝液(pH7.3)に対し透析した後MonoQカラムに吸着させ、0-1M NaCl濃度勾配により溶出した。潜在活性を持つフラクションを集め、10mM

リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に対し透析した。

2・2 アッセイ

蛋白質分解活性は、pH2(リン酸ナトリウム)で酸変性したヘモグロビンを基質として用いて行った⁵⁾。

2・3 *Bacillus brevis*による発現系の構築

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び *A. niger var. macrosporus* 由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をpolymerase chain reaction法により増幅し、発現ベクターpNU211R2L5⁶⁾に組み込んだ。これを *B. brevis* HPD31株に導入し、PY-1培地中で培養した⁷⁾。以下に、プロクターゼBについて行った手順を述べる。培養上清を集め、60~80%硫酸で沈殿する画分を集め、プロブクターゼBの部分精製試料とした。また、培養上清に塩酸を加えてpH2.2とし、37°Cで10分処理した後、遠心して沈殿物を除き、60%飽和硫酸で沈殿させた画分をプロクターゼBの部分精製試料とした。

2・4 部位特異的変異

変異をデザインした合成オリゴDNAを用いて、Kunkelの方法⁸⁾によりプロクターゼBcDNAに変異を導入した。発現に使ったプラスミドは変異が正しく導入されていることをDNAシーケンシングにより確認した。

3 結果

3・1 大腸菌による発現

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び *A. niger var. macrosporus* 由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をそれぞれT7プロモーターを持つ発現ベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3)による発現を行った。その結果、プロクターゼBにおいて、完全長のプロ体蛋白質が大量に(1リットル培養液中200mg以上)発現した。ただし、発現したプロブクターゼBの

大部分は、不溶性の封入体を形成しており、活性を持たなかった。そこで、大腸菌を溶菌後、遠心分離により封入体を分離し、8M尿素と100mM 2-メルカプトエタノールにより可溶化する画分を集め、透析して尿素と2-メルカプトエタノールを取り除くことによりリフォールディングを行った。その結果、酸性条件下において変性ヘモグロビンを基質に用いたアッセイにより酸性プロテアーゼの活性が認められた。このプロブロクターゼBは、DE52、Superose HR、MonoQによるカラムクロマトグラフィーにより精製され、SDS-PAGE上で単一のバンドになった。この完全精製物の収量は1リットルの培養液から1mgであった。一方、ヒト・ペプシノーゲンAは完全長の蛋白質を発現させることが出来なかった。

3・2 *B. brevis* による分泌発現系の構築

B. brevis は菌体外に大量の蛋白質を分泌することが知られている。そこで、*B. brevis* の菌体外主要蛋白質のシグナルペプチドと種々アスパラギン酸プロテアーゼのプロ体との融合蛋白質の分泌発現を行った。その結果、ペプシノーゲンAの発現量はたいへん少なく、またプロカテプシンEの発現は全く検出できなかったが、プロブロクターゼBについては潜在活性の発現が見られた。

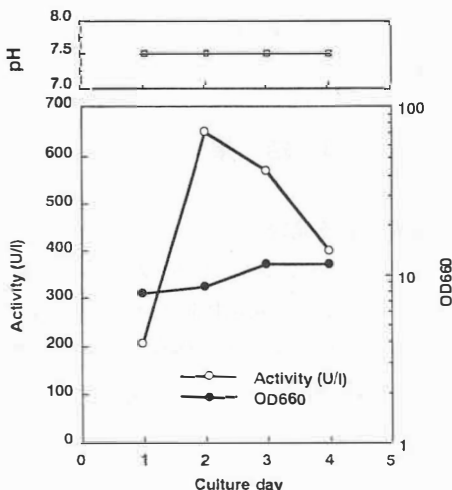


Fig. 1 *B. brevis* によるプロブロクターゼB分泌発現の経時変化

発現したプロブロクターゼBは、ヘモグロビンをを用いたアッセイにより、1リットル培養液あたり約50mgのプロクターゼB活性に相当すると見積もられた。(Fig. 1)

3・3 組み換え発現により得たプロブロクターゼBと天然プロブロクターゼBとの比較

大腸菌で発現して精製したプロブロクターゼB、*B. brevis* から得られたプロブロクターゼB、いずれも酸性条件下で、SDS-PAGE上で天然のプロブロクターゼBと等しい移動度を示す活性型成熟体に変換し、他のプロテアーゼ活性を必要とせずに、自己触媒的にプロセッシングすることが明らかになった。得られる成熟型プロブロクターゼBは天然のものと同じ比活性や性質(pH依存性等、Fig. 2)を持ち、

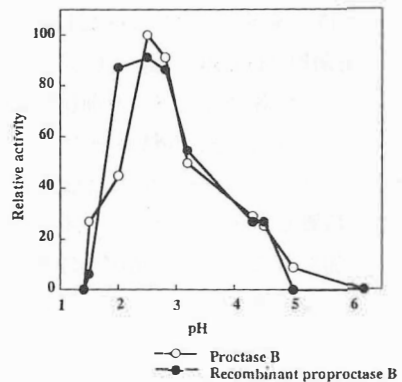


Fig. 2 プロブロクターゼBと組み換えプロブロクターゼBの活性のpH依存性

正しい高次構造を持ったプロブロクターゼBが得られたと考えられた。しかしながら、N端の配列、すなわちプロ体から成熟体を精製するときのプロセッシング部位は異なっており、組み換え体のN端はいずれの発現系を用いた場合も天然のものより2残基長かった。

このことは *A. niger var. macrosporus* にはプロブロクターゼBが自己触媒的に活性化した後さらにN端の2残基を切断するプロテアーゼが存在することを意味する。ただし、このことは組み換え発現系を用いてプロブロクターゼBの機能改変を行うことにおいては全く影響がない。

	10	20	30	40
ANB	APAP <u>TR</u> KGFTINQIAR <u>PAN</u> K <u>TR</u> TRTINLPGMYARSLAKFGGTVPQSVKEAA			
PGA	IMYK <u>V</u> PLIR <u>KK</u> SL <u>RR</u> TL <u>SE</u> RGLLK <u>DF</u> LK <u>KH</u> NLN <u>PARK</u> YFPQWEAPTL			
PCE	QGS <u>LHR</u> VPL <u>RR</u> HP <u>SL</u> <u>KK</u> KL <u>RARS</u> QLSEFW <u>KSH</u> NLD <u>MIQ</u> FTES			

Fig. 3 プロ配列の比較

ANB : *A. niger* var. *macrosporus* proctase B PGA : Human pepsinogen A
 PCE : Human procathepsin E 二重下線 : 塩基性アミノ酸残基

3・4 プロ配列の改変による発現量の向上

ペプシノーゲンAとプロカタペシンEはプロ配列のN端近傍に塩基性アミノ酸残基が多数存在しているのに対し、プロクターゼBでは塩基性残基が比較的少ない(Fig. 3)ことから、N端近傍の塩基性残基の存在が分泌発現において不利な要因となる可能性が考えられた。そこで、プロクターゼBプロ配列の6位のアルギニン残基と7位のリジン残基をそれぞれグルタミンに変換した変異体(R6Q及びK7Q変異体)を部位特異的変異法により作製した。その結果、いずれの変異体においても発現量が上昇し、R6Q変異体では1リットル培養液あたり120mgの潜在活性型プロプロクターゼBの発現が見られた(Table 1)。これらのプロ体は野生型プロ体と同様に酸性条件下で自己触媒的に速やかに活性型成熟体に変換した。一方、16、22、32位のアルギニン、20、36、46位のリジンは、いずれをグルタミンあるいはアスパラギンに変換しても発現量の増大が見られなかった。

Table 1 *B. brevis*によるプロプロクターゼBの発現部位特異的変異による発現量の増大

Proproctase B	Medium	Amounts of ANB
Wild type	5'PY	50 mg
R6Q	5'PY	90 mg
K7Q	5'PY	80 mg
R6Q	5'PY + 0.3% glycine	120 mg

4 考 察

プロクターゼBの発現系を大腸菌及び*B. brevis*を用いて構築した。特に*B. brevis*による分泌発現系の方がいくつかの点で大腸菌による系に比べてすぐれていると考えられる。すなわち、第一に、*B. brevis*による発現系ではリフォールディングの処理をすることなく潜在活性型のプロ体を大量に発現できる。第二に、*B. brevis*の系では菌体外にプロプロクターゼBを分泌するので*B. brevis*由来の蛋白質の混入が少ない。第三に、活性型プロクターゼBの収量が*B. brevis*の系の方が多い。発現量はプロ配列N端近傍の塩基性残基を減らすことにより増加したが、このことは他のアスパラギン酸プロテアーゼにも応用できるものと考えられる。すなわち、プロプロクターゼBよりもヒト・ペプシノーゲンAやヒト・カタペシンEの方がプロ配列N端近傍が塩基性残基に富んでおり、このことが*B. brevis*による分泌発現に不利である可能性が考えられる。今後検討の余地がある課題である。第四に、*B. brevis*が活性型アスパラギン酸プロテアーゼを菌体外に生成することは、種々の変異体の活性の測定を簡便にし、目的とする基質(ケラチン)を含んだ寒天培地を用いることにより、一度に大量の変異体のスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。また、栄養源をケラチンに制限することによってケラチナーゼ活性発現菌の選択も可能かもしれない。また、プロクターゼBのコラーゲン分解活性を増強する研究も同様に行うことが可能である。

5 総括

A. niger var. *macrosporus* 由来プロクターゼBを大腸菌及び *B. brevis* を用いて発現し、活性型酵素を得た。特に *B. brevis* の系ではプロ配列を改変することにより、1リットルの培養により120mgの活性型酵素を分泌発現させることに成功した。このことは他のアスパラギン酸プロテアーゼ類を発現させる上でも重要な指針を提供すると思われる。また、この活性型酵素の菌体外高発現系を利用することにより、改変酵素の作製と検索を容易に行うことが可能となった。

引用文献

- 1) Koaze Y., Goi H., Ezawa K., Yamada Y., and Hara T. *Agric. Biol. Chem.*, 28 216-223 (1964)
- 2) Horiuchi S., Yamasaki M., and Yamada Y. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo (Biol. Part)* 19 127-139 (1969)
- 3) Chomarat N., Robert L., Seris J. L., and Kern P. *Enzyme Microb. Technol.*, 16 756-760 (1994)
- 4) Studier F. W., Rosenberg A. M., Dunn J. J., and Dubendorff J. W. *Methods in Enzymol.*, 185 60-89 (1990)
- 5) Anson, M. L. *J. Gen. Physiol.* 22 77-89 (1939)
- 6) Sagiya Y., Yamagata H., and Udaka S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press. (1994)
- 7) Udaka S., and Yamagata H. *Methods Enzymol.*, 217 23-33 (1993)
- 8) Kunkel T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 488-492 (1985)