

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 無機ピロリン酸加水分解酵素の error-prone PCR 変異導入による熱凝集抑制

杉山 典子、前田 歩、田中 浩史、花房 英一郎、金井 拓、佐藤 高則*

徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部生物化学研究室
770-8502 徳島市南常三島町 1-1

***Thermus thermophilus* Inorganic Pyrophosphatase Variants by Error-prone PCR Suppressed Thermal Aggregation**

**Noriko SUGIYAMA¹, Ayumi MAEDA¹, Hiroshi TANAKA¹,
Eiichiro HANAFUSA², Taku KANAI² and Takanori SATOH^{3,*}**

¹Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, ²Graduate school of Human and Natural Environment Sciences, The University of Tokushima, ³Institute of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima city, Tokushima 770-8502, Japan

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: tsatoh@ias.tokushima-u.ac.jp

ABSTRACT

Thermus thermophilus Inorganic pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1., *Tth* PPase) exhibits high thermostability, but thermal aggregation was observed on heating above 85 °C. In addition, we reported that sole cysteine in C-terminal region plays a key role in the thermostability and thermal aggregation of *Tth* PPase [Kohaku, Y. *et al.* (2008) *Natl.Sci.Res.*, **22**, 75-84]. In this study, we approached the suppression of its thermal aggregation by error-prone PCR mutagenesis of whole molecule or C-terminal region. Firstly, we obtained thermostable four variants (Q119H/L162F, L162F, K173E and K159E/A170T) by error-prone PCR mutagenesis. Moreover, we examined thermostabilities of four variants in terms of the enzyme activity, tertiary and quaternary structure.

Although conformation and quaternary structure of four variants were almost the same as those of wild type enzyme in native state, K173E and K159E/A170T variants showed higher thermostabilities than wild type in tertiary and quaternary structure. In particular, thermal aggregation of these two variants would be suppressed after heating at 85°C. Therefore, it was suggested that Lys159 and Lys173 in the molecular surface of C-terminal region may contribute to the formation of thermal aggregation of *Tth* PPase.

Keywords: *Thermophile, Pyrophosphatase, Error-prone PCR, Directed evolution, Thermus thermophilus*

1. 緒言

本研究対象である無機ピロリン酸加水分解酵素(PPase)は動物から植物まで広く存在し、Mg²⁺などの二価金属イオンの存在下で1分子の無機ピロリン酸を2分子の無機リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり、DNAやRNA合成の駆動力として働く¹⁾。これまでに原核生物由来のPPaseとして*Escherichia.coli* (*E.coli* PPase)²⁾、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB8 (*Tth*

PPase)³⁾、中等度好熱性細菌 *Thermophilic bacterium* PS - 3⁴⁾、*Bacillus stearothermophilus* (*Bst* PPase)⁵⁾ 由来のPPaseなどが報告されており、さらに古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius*⁶⁾ や *Pyrococcus horikoshii* PPase⁷⁾ の三次元立体構造と機能の相関についても報告されている。このうち本研究対象である *Tth* PPase は、一次構造およびX線結晶解析による三次元立体構造が既に解明されており、単量体あたり174アミノ酸残基からなる6量体を形成している(Fig.1)^{3),8),9)}。*Tth* PPase は80°Cで1h

の加熱後も酵素活性および四次構造が安定であり高い耐熱性を示すが、85°C以上の加熱で熱凝集を起こすことが報告されており^{3), 10), 11)}、この熱凝集に関与する部位に関する知見はほとんど無い。この観点から我々は、*Tth* PPase 分子表面に存在する2本の α -helix(AおよびB)に着目し、このうち α -helix Aは6量体の3量体—3量体界面を形成し、Thr138やAla141などのアミノ酸残基側鎖同士の相互作用が高温における四次構造形成能に関与することを明らかとした¹²⁾。さらに3量体—3量体界面のThr138とAla141をHis138とAsp141に改変することで三量体界面のイオン性が増し、三量体間界面が安定化することによって六量体の安定性が向上することや¹³⁾、この α -helix Aに続くflexible loopのAla144-Lys145領域を欠損させると熱凝集が抑制されることも明らかにしている¹¹⁾。

一方、C末端側にある α -helix Bは変性の開始点と考えられており、熱変性で露出したCys168が他分子と架橋し高分子化することで、熱凝集を引き起こす可能性が示唆されている。この部位をAlaに置換したC168A変異体は、熱凝集を抑制することが報告されているが¹⁴⁾、その他の熱凝集生成または抑制因子については明らかではない。そこで本研究では、 α -helix Bを含むC末端領域において熱安定性や熱凝集に関与するアミノ酸残基を新規に探索するため、進化工学的手法(error-prone PCR)¹⁵⁾を用いてこの領域にランダム突然変異を導入後、スクリーニングにより耐熱性を示す変異型酵素を選別し、得られた変異型酵素の変異箇所と熱安定性および熱凝集との相関を検討した。

2. 実験方法

試薬および材料

モリブデン酸アンモニウム四水和物、L-アスコルビン酸ナトリウム、ピロリン酸ナトリウム・10水和物、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、酢酸ナトリウム三水和物は、和光純薬工業より購入した。T4 DNA ligation Kit ver.2は宝酒造より、制限酵素はPromega, New England Bio Labs および宝酒造から購入した。塩化マグネシウム六水和物は片山化学より、DEAE-celluloseは和光純薬工業より、Sephacryl S-200HRはPharmaciaよりそれぞれ購入した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

Error-prone PCRによる*Tth* PPase 遺伝子へのランダム突然変異導入

ランダム変異導入にはerror-prone PCR法¹⁵⁾を用いた。通常のPCR反応液の組成に、Mn²⁺、dATP/dTTP、またはdCTP/dGTPを各々の最終濃度が0.1~0.5mM、1mMになるよう加え、*Tth*

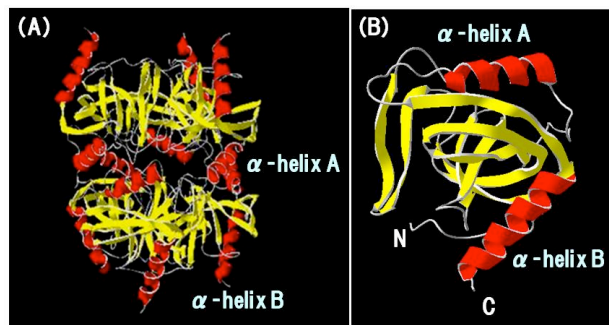


Fig. 1 Three-dimensional structure of *Tth* PPase

The three-dimensional structure of hexameric (A) and monomeric (B) *Tth* PPase. The figure was drawn by a Molecular Graphics Program, Swiss-Pdb Viewer Ver.4.0 (Swiss Institute of Bioinformatics). The X-ray structural data for *Tth* PPase was obtained from the Protein Data Bank (PDB code 2PRD)⁸⁾.

PPaseが挿入されたプラスミドベクターpUCTPPCRを鋳型として、*Taq* DNA Polymerase (Promega)によりPCR(94°C, 1分→61°C, 1分→74°C, 1分を30サイクル)を行った。PCRプライマーは、upperプライマーが5'-GACCTACAAGGCCCTCGAGGCCAAGAA-3'(No.5 primer; 27mer, *Tth* PPaseのGlu137-Lys146に相当)または5'-GTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC-3'(No.8 primer; 23mer, pUCTPPCRの*Tth* PPase遺伝子の上流側のプラスミド内塩基配列に相当)、lowerプライマーが、5'-TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'(No.9 primer; 27mer, pUCTPPCRの*Tth* PPase遺伝子の下流側のプラスミド内塩基配列に相当)を用いた。得られた遺伝子増幅断片を、*Tth* PPaseの発現ベクターpETTPの対応する領域と入れ換え、変異型発現ベクターpETTPEPCRを構築した。

変異型酵素のスクリーニング

変異型発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)株で形質転換し、LB/Amp寒天培地上で生育させたコロニーを初期ライブラリーとし、各コロニーを96穴プレートのLB/Amp液体培地に植菌し、37°Cで16h培養した。培養液にBugbuster (Novagen)を加え25°Cで20分間穏やかに振盪して大腸菌を溶菌し、粗抽出液とした。次にこの96穴プレートを各条件にて加熱した後、氷上で10 min冷却し、上清の活性測定を行った¹⁶⁾。96穴プレートに1mM MgCl₂と1mM PP_iを含む80mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0) 25 μ lに上清(酵素溶液)を3 μ l加え、37°Cで10分間保温した後、3%(v/v)過塩素酸溶液を25 μ l加えて懸濁し、酵素反応を停

止させた。次に 150 μ l の 5 μ M 硫酸銅溶液、15 μ l の 1%(w/v)モリブデン酸アンモニウム溶液、10 μ l の 1%(w/v) L - アスコルビン酸ナトリウム溶液を加え、10 分間放置後、発色の強度のより強いクローンを選別した。選別したクローンよりプラスミド DNA を調製し、DNA 塩基配列決定を行い、変異部位の同定を行った。

野生型酵素および変異型酵素の精製

野生型酵素および変異型酵素の精製は以下の手順で行なった。野生型酵素遺伝子および変異型酵素遺伝子を含む発現ベクター pETTP および pETTPEPCR を大腸菌 BL21(DE3)株で形質転換した。得られた形質転換株を大量培養後に菌体を回収し、超音波破碎を行い粗抽出液を得た。これを DEAE - Cellulose 陰イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S - 200HR ゲルろ過クロマトグラフィーによるカラム操作を行い、電気泳動的に単一の精製標品を得た。

酵素活性の測定とタンパク質定量

PPase の酵素活性は、Peel と Loughman の方法に従い 37°Cにて行なった¹⁶⁾。また、タンパク質濃度の決定は、bovine serum albumin を標準タンパク質として、Bradford 法により行なった¹⁷⁾。

遠紫外部 CD スペクトルの測定

CD スペクトルは、千葉工業大学総合科学研究所にて測定を行った。測定試料をタンパク質濃度を 0.1mg/ml に調製し、室温にて J-720 dichrograph (JASCO)により測定を行った。1mm 石英セルを用いて、200nm から 250nm の楕円率を測定し、分子楕円率 $[\theta]$ (deg \cdot cm²/dmol)に変換した。また、 α -helix 含量は、次式から算出した¹⁸⁾。
 α -helix 含量(%) = $-([\theta]_{222nm} + 2340) \times 100 / 30300$

蛍光スペクトルの測定

野生型酵素および変異型酵素の蛍光スペクトルの測定は、F-2500 spectrofluorometer (Hitachi)により、タンパク質濃度を 0.05 mg/ml とし、20mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)を溶媒として室温で行った。Trp 蛍光スペクトルは *Tth* PPase 内の Trp 残基 (Trp149 および Trp155)を内在性プローブとし、励起波長 295nm、蛍光測定波長を 320 ~ 400 nm に設定し測定した。熱安定性における蛍光スペクトル測定は、タンパク質濃度 0.05mg/ml に調製した酵素溶液を 40~90°Cの各温度で 1 時間加熱後氷冷し、上記の条件で蛍光スペクトルを測定した。

四次構造の分析

野生型酵素および変異型酵素の分子量の測定は、50mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を移動相に用いて、HPLC に接続した TSKgel G3000SW カラム

(Tosoh, 7.5mm I.D. \times 30cm) により室温で行なった。流速 0.3ml/min で試料 5 μ g を注入し、波長 280nm で検出した。溶媒および試料は全て 0.45 μ m フィルター (Millipore)でろ過したものを使用した。熱安定性における四次構造の分析は、タンパク質濃度 0.1mg/ml に調製した酵素溶液を 40~90°Cの各温度で 1 時間加熱後氷冷し、さらに 0.45 μ m フィルターろ過後の試料を、上記の条件で測定した。得られた溶出曲線の面積は、chromatopac CR - 6A (Shimadzu) を用いて算出した。

3. 実験結果

変異型酵素のスクリーニングおよび変異箇所の同定

まず、*Tth* PPase 遺伝子の Thr138 から Gly174 を含む C 末端領域に相当する部分に対し、No.5 upper primer および No.9 lower primer を用いて、error-prone PCR を行い、ランダム変異を導入した。このとき、dNTP の濃度において dATP と dTTP、または dCTP と dGTP が通常の反応組成より 1mM 高いものと Mn²⁺濃度を 0.1、0.25、0.3、0.4、0.45mM と変えたものを、組み合わせて PCR を行なった。その結果、1mM dCTP、dGTP と 0.45mM Mn²⁺を含む反応液でのみ PCR 増幅断片が確認できなかった。そこで PCR 増幅断片が確認できた 1mM dCTP、dGTP および 0.45mM Mn²⁺を含む反応液以外の試料各々を混合し、制限酵素による切断と T4 リガーゼによる ligation により、変異遺伝子を発現ベクターに組み込んだ。次にこのベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換しコロニーを得た後、96 穴プレートで培養を行い溶菌後、条件を変えた 1 次~3 次スクリーニング(一次：90°C、2 時間加熱、二次：90°C、3 時間加熱、三次：95°C、30 分加熱)により 1948 個中 5 個の耐熱性を保持した陽性コロニーを得た。これら 5 個のコロニーの発現確認を行い、DNA 塩基配列決定により変異箇所を同定した。その結果 5 個のうち 2 個は野生型 *Tth* PPase であったが、残る 3 個はそれぞれ、L162F(TTG \rightarrow TTT)、K173E (AAG \rightarrow GAG)、K159E (AAG \rightarrow GAG)/A170T (GCC \rightarrow ACC) のアミノ酸残基置換が確認された。

次に、*Tth* PPase 遺伝子全領域に対しても同様に error-prone PCR を行い、ランダム変異を導入した。No.8 upper primer および No.9 lower primer を用いて、*Tth* PPase 遺伝子に先と同様の条件で PCR を行い、得られた変異遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。96 穴プレートで培養を行い溶菌後、条件を変えた 1 次~3 次スクリーニング(一次：80°C、1 時間加熱、二次：90°C、1 時間加熱、三次：100°C、1 時間加熱)により 2400 個中 1 個の耐熱性を保持した陽性コロニーを得た。この変異型酵素遺伝子を DNA

Table I The characteristics of wild type *Tth* PPase and variants.

	Enzymatic activity		Fluorescence spectra		CD spectra		Quaternary structure ^e
	Specific activity (units/mg)	Relative activity ^a (%)	λ_{\max}^b (nm)	F _{max} ^c	[θ] _{222nm} (deg·cm ² /dmol)	α -helix content ^d (%)	
Wild type	890	100	335.0	2770	-8480	20.3	Hexamer
Q119H/L162F	984	111	336.0	3080	-8390	19.9	Hexamer
L162F	948	107	335.0	2550	-8450	20.2	Hexamer
K173E	846	95.1	335.0	3010	-8480	20.3	Hexamer
K159E/A170T	825	92.7	335.0	2070	-8330	19.8	Hexamer

^a The specific activity of wild type *Tth* PPase was taken as 100%. ^b λ_{\max} is the maximum wavelength of tryptophan fluorescence spectra. ^c F_{max} is the fluorescence intensity (arbitrary unit) at the emission maximum of tryptophan fluorescence spectra. ^d α -helix content was calculated by the following equation¹⁸; α -helix content (%) = $-([\theta]_{222\text{nm}} + 2,340) \times 100 / 30,300$. ^e Quaternary structure was estimated from the elution profile on TSK-gel G3000SW gel filtration chromatography.

塩基配列決定したところ、Q119H(CAG → CAT)/L162F(TTG → TTT)のアミノ酸残基置換が確認された。以上の結果より、*Tth* PPase のランダム変異体として、4 種の変異型酵素(L162F、K173E、K159E/A170T、Q119H/L162F)が得られた。

野生型酵素および変異型酵素の発現と精製

上記で得られた 4 種の変異型酵素の発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換し、培養後粗抽出液を調製した。これらを、15%ゲルを用いた SDS-PAGE により分析したところ、変異型酵素の発現が確認された(Data not shown)。さらに、大量培養を行い、超音波破碎により溶菌させて粗抽出液の得た後、DEAE-cellulose 陰イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-200HR ゲルろ過クロマトグラフィーの二本のカラム操作により、電気泳動的に単一な 4 種の変異型酵素を得た。野生型酵素についても、同様の手法により精製標品を得た。

野生型酵素および変異型酵素の Initial characterization

まず、変異導入による酵素への影響を検討するため、試料のタンパク質濃度を 0.1 mg/ml (蛍光スペクトルのみ 0.05mg/ml) に調整し、未加熱状態(Native 状態)における野生型および変異型酵素の酵素活性、二次構造(CD スペクトル)、三次構造(蛍光スペクトル)、四次構造(ゲルろ過クロマトグラフィー)について検討した(Table I)。

酵素活性では、野生型酵素活性を 100%として相対活性を表すと、L162Fは106%、K173Eは95%、K159E/A170Tは93%であり、変異導入による酵素活性の顕著な差異は見られなかった。次に、野生型および変異型酵素の二次構造を検討するために、遠紫外部 CD スペクトルを測定した。その結果、野生型酵素と比較して、各変異型酵素の二

次構造および α -helix 含量に顕著な差異は観察されなかった。さらに、変異導入に伴う三次構造への影響を検討するため、分子内 Trp 残基を蛍光プローブとして、励起波長 295nm で蛍光スペクトルを測定した。その結果、各変異型酵素の Trp 残基周辺の立体構造変化は生じていないことが示唆された。最後に変異導入による四次構造への影響を検討するため、未加熱状態において、HPLCを用いた TSK-gel G3000SW ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った。その結果、四次構造はいずれも Hexamer であり、変異導入による四次構造への影響は見られなかった。以上より、変異導入に伴う酵素活性や立体構造への顕著な影響は無いものと考えられる。

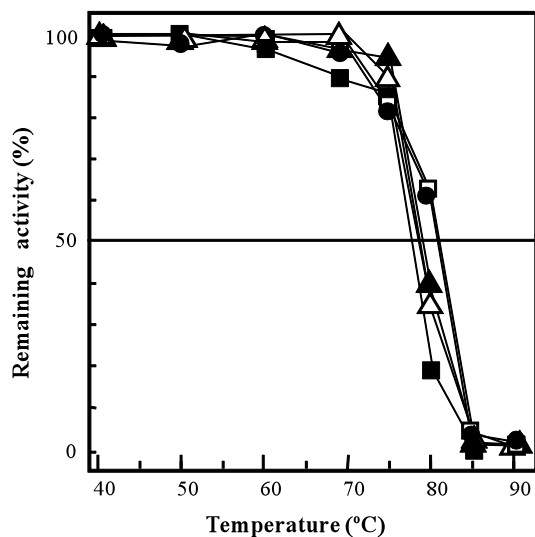
野生型酵素および変異型酵素の酵素活性の熱安定性

次に、酵素活性を指標として、野生型酵素および変異型酵素の酵素活性の熱安定性を検討した(Fig.2)。各試料(0.1mg/ml)を 40~90°Cで 1 時間加熱し、10 分間氷冷後、酵素活性の測定を行った。その結果、Q119H/L162F の熱安定性は野生型酵素と同等であったが、他の変異型酵素は野生型酵素に比べ熱安定性の低下が見られた。特に 80°C加熱後では、野生型酵素の残存活性は 61.4%であったが、L162Fは38.8%、K159E/A170Tでは34.0%、K173Eでは18.8%と顕著な差異が観察された。

野生型酵素および変異型酵素の三次構造の熱安定性

野生型酵素および変異型酵素の三次構造の熱安定性の差異を検討するため、各試料を 0.05mg/ml に調製後、40-90°Cで 1 時間加熱し、Trp 蛍光スペクトルによる分析を行った(Fig.3)。その結果、Q119H/L162F、L162F 変異体は野生型酵素と同様の熱安定性を示したが、K173E および

K159E/A170T 変異体では 85°C 以上において三次構造の熱安定性の上昇が見られた。このことは、両変異型酵素では、85°C 加熱後も約 70% の可溶性分子が存在しており、両変異型酵素では熱凝集が



抑制される可能性が示唆された。

Fig.2 Thermostability of enzyme activity for wild type *Tth* PPase and variants

The enzyme (0.1mg/ml) was incubated in 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) at the indicated temperatures for 1 h. Then the enzyme activity was measured at 37°C after rapid cooling, and the activity at 40°C was taken as 100%. Symbols: □, wild type; □, Q119H/L162F, □, L162F; □, K173E; △, K159E/A170T.

野生型酵素および変異型酵素の四次構造の熱安定性

各試料を 40°C から 90°C で 1h 加熱し、HPLC を用いた TSK - gel G3000SW ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った(Fig.4)。その結果、L162F は野生型と比較して 80°C での可溶性成分の減少および熱凝集生成の増加が見られた。また K173E、K159E/A170T においてのみ、80°C、85°C 加熱後で、高分子化成分(oligomer, >200kDa)の生成が観察された(Fig.4(D),(E))。そこで 85°C における野生型、K173E、K159E/A170T の四次構造の熱安定性を経時的に分析した(Fig.5)。各試料を 85°C で 10~30 分間加熱し、HPLC を用いた TSK - gel G3000SW ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った。その結果、野生型では熱凝集成分を除去して分析しているため顕著なピークは観察されなかったが、K173E および K159E/A170T では可溶性成分(oligomer, hexamer, trimer)が検出され、加熱時間の経過に伴い、hexamer の減少、oligomer の増加、trimer の生成が見られた。また、K159E/A170T に比べ K173E では 10min 加熱後で

の oligomer の生成量が多く見られた。このことから、K159E/A170T および K173E では、85°C で熱凝集の抑制に伴う可溶性高分子化成分の増加が生じており、*Tth* PPase における熱凝集生成は、

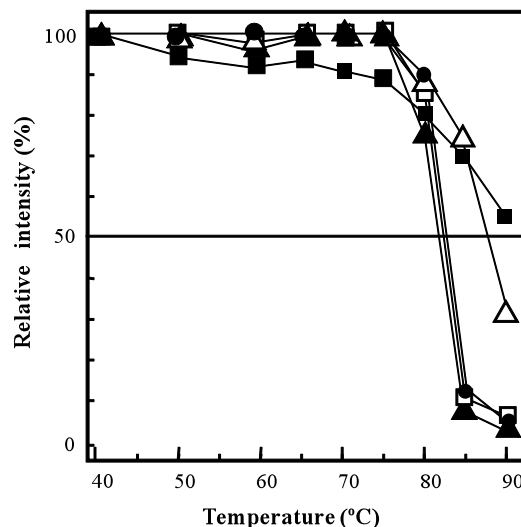


Fig.3 Thermostability of Tryptophan fluorescence spectra for wild type *Tth* PPase and variants

The enzyme (0.05mg/ml) was incubated in 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) at the indicated temperatures for 1 h. Then, the emission spectrum of each sample was measured with excitation at 295 nm after rapid cooling. On heating above 85 °C, each sample was centrifuged after heating, and then its supernatant was measured. The fluorescence intensity at maximum wavelength was plotted as relative value to that at 40 °C. Symbols: □, wild type; □, Q119H/L162F, □, L162F; □, K173E; △, K159E/A170T.

分子が高分子化する過程を経て起きる可能性が示唆された。

4. 考察

本研究では、*Tth* PPase の熱安定性や熱凝集生成に関与する新規のアミノ酸残基に関する知見を得るため、比較的研究例の少ない *Tth* PPase の α -helixB を含む C 末端領域に着目し、*Tth* PPase 遺伝子の α -helixB を含めた C 末端領域および全領域に進化分子工学的的手法(error-prone PCR)を用いたランダム突然変異型酵素を作製した。その結果、四種の変異型酵素(Q119H/L162F、L162F、K173E、K159E/A170T)が得られた(Fig.6)。

各変異型酵素は、Native 状態では酵素活性、二次構造、三次構造、四次構造において、野生型酵素との顕著な差異は見られなかったことから (Table I)、変異導入は、酵素活性と立体構造に大きな影響を与えないと考えられる。このことは、

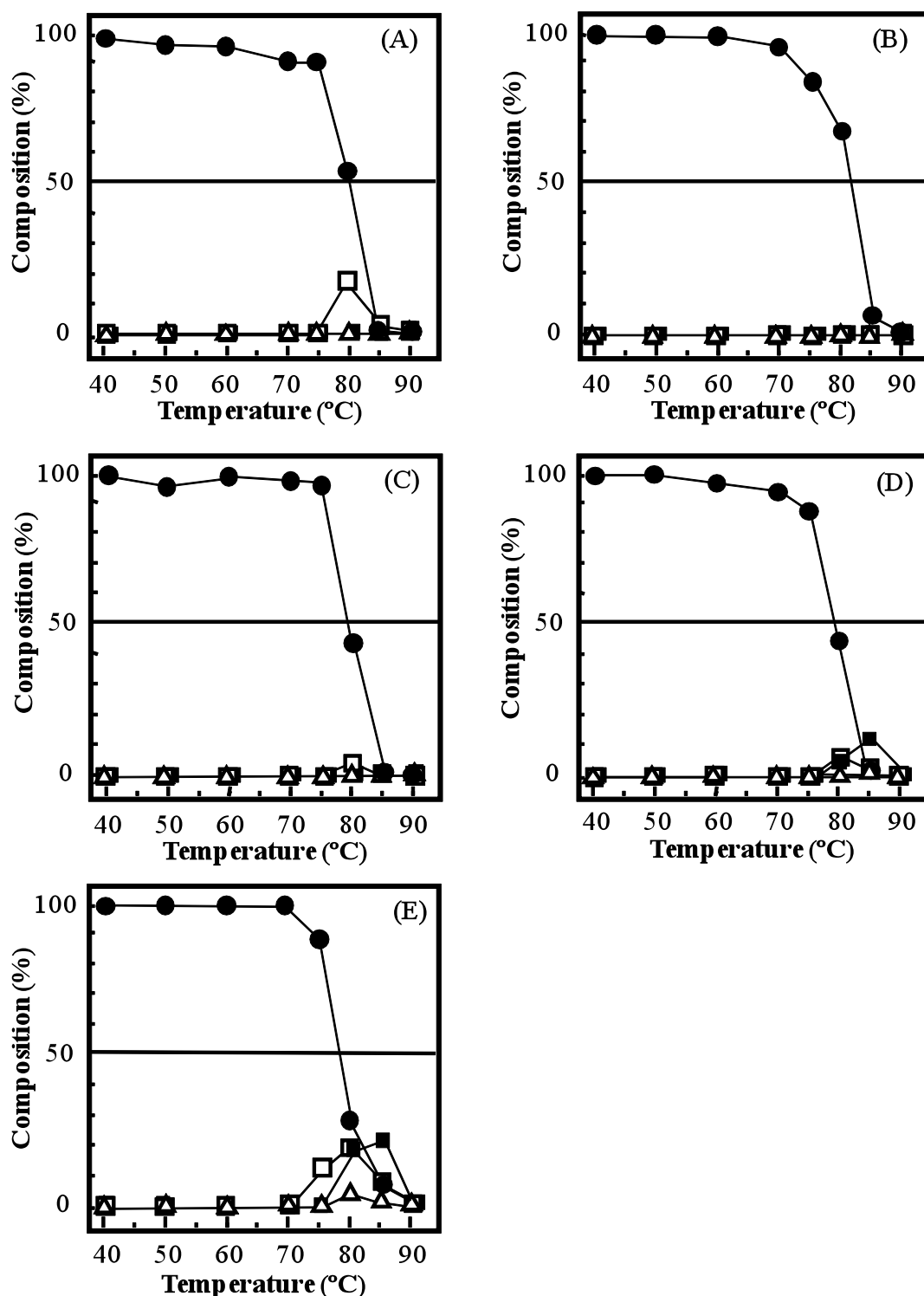


Fig.4 Oligomeric thermostability for wild type *Tth* PPase and variants

Panels: (A) Wild type, (B) Q119H/L162F, (C) L162F, (D) K173E, (E) K159E/A170T. The enzyme (0.1mg/ml) was incubated in 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) at the indicated temperatures for 1 h. After rapid cooling, the gel filtration chromatography was performed as described in MATERIALS AND METHODS. Composition was estimated from each peak area of hexamer, trimer, monomer, and oligomer (component having much higher molecular weight than hexamer) in the HPLC elution profiles. 100% was taken as the sum of all peak area after heating at 40°C. Symbols: ●, hexamer; □, trimer; Δ, monomer; ■, oligomer.

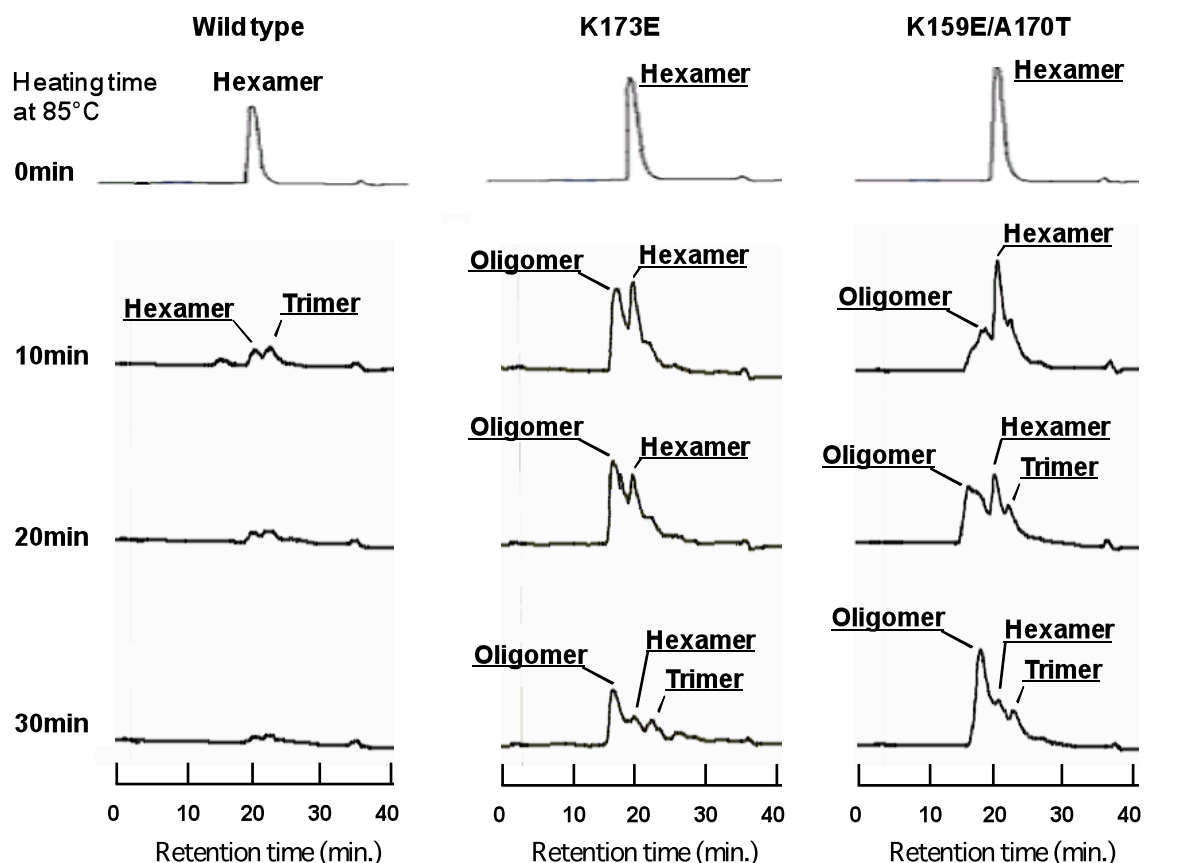


Fig. 5 The elution profiles of TSK-gel G3000SW gel filtration chromatography (HPLC) for wild type *Tth* PPase and variants after heating at 85 °C

The flow rate was 0.3 ml/min. Each sample (0.1mg/ml) was heated at 85°C for the indicated times, and filtered by Millex filter (pore size 0.45µm, Millipore). 50µl of each protein after was injected to column, followed by eluted with 50mM Tris-HCl (pH 7.8), and then analyzed as described in MATERIALS AND METHODS.

上記の変異箇所(Fig.6)が酵素の活性部位やサブユニット界面に含まれておらず、直接酵素活性や四次構造には影響を与えないためであると考えられる。

また、酵素活性を指標とした熱安定性に関しては、三種の変異型酵素(L162F、K159E/A170T、K173E)で80°C以上において熱安定性の減少が観察され(Fig.2)、三次構造(Trp 蛍光スペクトル)ではK173EおよびK159E/A170Tで85°C以上で熱安定性の上昇が見られた(Fig.3)。一方、四次構造の熱安定性においては、K173E、K159E/A170Tにおいてのみ、80°C、85°C加熱後で、oligomerとtrimerの生成が観察された(Fig.4)。さらにこの二種の変異型酵素については、85°Cにおける四次構造の経時変化より、hexamerおよびoligomerの存在が確認されたことから(Fig.5)、Lys159、Ala170、Lys173におけるアミノ酸残基の置換が熱凝集(aggregation)抑制に関与していることが示唆された。また、*Tth* PPaseにおける熱凝集生成は、hexamer→oligomer→aggregationのように進行し

ていると推定され、このことはα-helix Bを発端に分子の立体構造が崩れていき¹⁴⁾、Cys168による酵素分子同士の会合とLys159やLys173などのイオン性残基の関与により、高温での溶解度の減少を導き、活性型hexamerの減少と高分子化を経て、不活性型熱凝集成分が増加すると思われる。

また、各変異型酵素におけるアミノ酸残基の役割については、L162FおよびQ119H/L162Fの場合、野生型酵素と同様に熱凝集生成が見られ高分子化成分が見られないことから共通する変異部位(L162F)は熱凝集への関与は低いと考えられる。また、酵素活性の熱安定性への影響については、Q119H/L162FにおけるQ119H変異が、近接する活性部位残基(Asp97、Asp102、Lys104など)や単量体界面残基(Arg114)、周囲のイオン結合Asp120-Arg158への微細環境に影響を及ぼすと推定されるが(Fig.6)、この点に関してはさらに検討する必要がある。

一方、Lys173はC末端に位置し、他残基と相互作用を形成していないため側鎖のフレキシビ

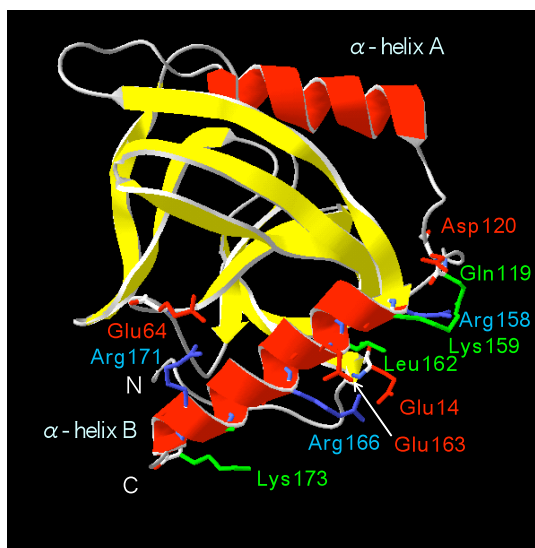


Fig. 6 Three-dimensional structure of *Tth* PPase and substituted amino acids by error-prone PCR .

The three-dimensional structure of monomeric *Tth* PPase. The figure was drawn by a Molecular Graphics Program, Swiss-Pdb Viewer Ver.4.0 (Swiss Institute of Bioinformatics). The X-ray structural data for *Tth* PPase was obtained from the Protein Data Bank (PDB code 2PRD) [12]. Amino acids in the α-helix B forming ionic interactions were drawn by red (acidic amino acid) and blue (basic amino acid). Substituted amino acids (Gln119, Lys159, Leu162, Ala170, Lys173) by error-prone PCR were shown in green.

リティが高いと推定される。この残基の電荷の逆転(K173E)が、C末端のカルボキシル基や、周囲のArg166やArg171に作用して、間接的に分子内部にあるGluやAspなどとのイオン性相互作用(Glu14-Arg166-Glu163, Glu64-Arg171, Asp120-Arg158)に影響を与え(Fig.6)^{8), 9)}、活性部位を含む分子の立体構造を変化させたため、酵素活性の熱安定性(Fig.2)が低下したと考えられる。

また、このK173Eにおける85°Cにおける熱凝集の抑制(Fig.5)は、変異導入によって酵素分子の表面電荷の負電荷が増加し、可溶性成分(oligomer, hexamer, trimer)の割合が上昇したためだと思われる。この高分子化や熱凝集の抑制は、部位は異なるが同じく分子表面に位置するAla144, Lys145の欠損変異体においても観察されている¹¹⁾。本研究の結果でも、分子表面のLys173は熱凝集生成に関与しており、*Tth* PPaseの分子表面の電荷の相違が、高温での分子の溶解度や分子間会合に影響を与えることが改めて示唆された。

最後に、K159E/A170Tについては、得られた四種の変異型酵素の中でも耐熱性を最も保持していた。このことは、Lys159は活性部位と離れて

おり、さらにA170Tのアミノ酸置換によりOH基が主鎖のNH基と水素結合を形成し分子を安定化している可能性もあり、酵素活性への影響はK173Eより少なかったと思われる。また、85°Cにおける熱凝集生成の抑制は、K173Eと同様に、変異導入による酵素分子の表面電荷の負電荷が増加したためだと考えられ、酵素分子表面の負電荷の増加は、酵素分子の高温での溶解度の増加を導き、熱凝集生成を抑制すると推定される。

以上のことから、*Tth* PPase分子のα-helix Bに含まれるイオン性残基(Lys159およびLys173)は、*Tth* PPaseの分子全体の電荷に大きく影響すること、またこの電荷変化は分子の変性状態転移(hexamer→oligomer→aggregation)に影響を与え、特に熱凝集の過程に関与する事が明らかとなった。今後、本研究のC末端領域に関する知見や他の耐熱化因子に関する知見を基に、耐熱化因子を組み合わせるにより*Tth* PPaseの更なる人工耐熱化が可能であると考えられる。

謝辞

本研究は、実吉奨学会(Saneyoshi Foundation)および徳島大学教育改善推進費(奨励研究)の支援により実施された。CDスペクトルの測定ならびに研究の実施に際し、ご協力頂きました故・三浦謹一郎東京大学名誉教授(元千葉工業大学教授)、東京大学大学院の武井俊朗博士に深く感謝いたします。

参考文献

1. Lahti, R. (1983) Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* **47**, 169-179
2. Harutyunyan, E. H., Oganessyan, V. Y., Oganessyan, N. N., Avaeva, S. M., Nazarova, T. I., Vorobyeva, N. N., Kurilova, S. A., Huber, R., and Mather, T. (1997) Crystal structure of holo inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9Å resolution. Mechanism of hydrolysis. *Biochemistry*, **36**, 7754-7760
3. Satoh, T., Samejima, T., Watanabe, M., Nogi, S., Takahashi, Y., Kaji, H., Teplyakov, A., Obmolova, G., Kuranova, I., and Ishii, K. (1998) Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.*, **124**, 79-88
4. Maruyama, S., Maeshima, M., Nishimura, M., Aoki, M., Ichiba, T., Sekiguchi, J., and Hachimori, A. (1996) Cloning and expression of the inorganic pyrophosphatase gene from thermophilic bacterium PS-3. *Biochemistry and Molecular Biology International.*, **40**, 679-688

5. Satoh, T., Shinoda, H., Ishii, K., Koyama, M., Sakurai, N., Kaji, H., Hachimori, A., Irie, M., and Samejima, T. (1999) Primary structure, expression, and site-directed mutagenesis of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biochem.* **125**, 48-57
6. Leppänen, V. M., Nummelin, H., Hansen, T., Lahti, R., Schäfer, G., Goldman, A. (1999) *Sulfolobus acidocaldarius* inorganic pyrophosphatase: structure, thermostability, and effect of metal ion in an archaeal pyrophosphatase. *Protein Sci.* **8**, 1218-1231
7. Liu, B., Bartlam, M., Gao, R., Zhou, W., Pang, H., Liu, Y., Feng, Y., and Rao, Z. (2004) Crystal structure of the hyperthermophilic inorganic pyrophosphatase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biophys. J.* **86**, 420-427
8. Teplyakov, A., Obmolova, G., Wilson, K.S., Ishii, K., Kaji, H., Samejima, T., and Kuranova, I. (1994) Crystal structure of inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophilus*. *Protein Sci.* **3**, 1098-1107
9. Salminen, T., Teplyakov, A., Kankare, J., Cooperman, B.S., Lahti, R., and Goldman, A. (1996) An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Protein Sci.* **5**, 1014-1025
10. Satoh, T., Takahashi, Y., Oshida, N., Shimizu, A., Shinoda, H., Watanabe, M., and Samejima, T. (1999) A chimeric inorganic pyrophosphatase derived from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* has an increased thermostability. *Biochemistry*, **38**, 1531-1536
11. Satoh, T., Oshida, N., Ono, M., Hattori, M., Ohta, T., Watanabe, M., Shinoda, H., Takahashi, Y., Lee, J.S., and Samejima, T. (1999) Deletion of Ala144-Lys145 in *Thermus thermophilus* inorganic pyrophosphatase suppresses thermal aggregation. *J. Biochem.* **125**, 858-863
12. Kouzai, M., Kohaku, Y., Sugiyama, N., Yamaguchi, Y., and Satoh, T. (2008) Threonine 138 is crucial for the Quaternary Structure and the Thermostability of *Thermus thermophilus* Inorganic Pyrophosphatase. *Natural Science Research*, **22**, 65-73
13. Tanaka, H., Maeda, A., Sugiyama, N., Kyogoku, H., Kouzai, M., Takei, T., Miura, K., and Satoh, T. (2008) Thermostabilization by the Improvement of Intertrimeric Residues in *Thermus thermophilus* Inorganic Pyrophosphatase. *Natural Science Research*, **22**, 85-96
14. Kohaku, Y., Maeda, A., Kouzai, M., Sugiyama, N., Fukuhara, K., Kanai, T., Takei, T., Miura, K. and Satoh, T. (2008) Effect of Cys168 substitutions on the Thermostability and the Thermal Aggregation of *Thermus thermophilus* Inorganic Pyrophosphatase. *Natural Science Research*, **22**, 75-84
15. Song, J. K and Rhee, J. S. (2000) Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A(1) by evolutionary molecular engineering. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 3, 890-894
16. Peel, J.L. and Loughman, B.C. (1957) Some observations on the role of copper ions in the reduction of phosphomolybdate by ascorbic acid and their application in the determination of inorganic orthophosphate. *Biochem.J.*, **65**, 709-716
17. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
18. Chen, Y. H., Yang, J. T., and Matinez, H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, **11**, 4120-4131

論文受付 2013年9月3日
 改訂受付 2013年9月30日
 論文受理 2013年9月30日