

食品産業関連酵素を対象とした蛋白質工学的研究

小川 俊

はじめに	3
第1章 リンゴ銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼに関する研究	4
緒言	5
I エンドポリガラクトナーゼ I の酵母を宿主とした発現・精製・性質	9
I-1 序論	10
I-2 実験方法	11
I-3 実験結果	15
I-4 考察	31
II エンドポリガラクトナーゼIVの精製とクローニング	35
II-1 序論	36
II-2 実験方法	37
II-3 実験結果と考察	41
III エンドポリガラクトナーゼIVの <i>Aspergillus oryzae</i> を宿主とした発現・精製・糖鎖解析	48
III-1 序論	49
III-2 実験方法	50
III-3 実験結果と考察	53

IV	プロエンドポリガラクトナーゼ I の持つC末端44残基の機能解析	63
IV-1	序論	64
IV-2	実験方法	67
IV-3	実験結果	71
IV-4	考察	79
第2章	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> 由来	
	Oligo-1,6-glucosidaseに関する研究	81
2-1	緒言	82
2-2	実験方法	83
2-3	実験結果	87
2-4	考察	94
	摘要	96
	総括	99
	参考文献	102
	謝辞	113

はじめに

近年、様々な酵素が食品関連産業に利用されている。その用途は多様で、食品添加物としてその食品の味覚、食感、機能性を変化させるものや、特殊な食品素材や原料を作り出すために利用されるものもある。

その中でも特に、糖質関連酵素は大きな市場を形成している。澱粉糖化に使用されるアミラーゼ、プルラナーゼ、グルコアミラーゼ、異性化糖製造に使用されるグルコースイソメラーゼ、乳製品の性質向上のために添加されるラクターゼなどをはじめとし、機能性糖質素材であるシクロデキストリン製造に使用されるシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、その他にキトサナーゼやイヌリナーゼなど、実に様々な酵素が利用されている。産業用酵素が工業生産され、市場で販売されるまでには、酵素機能の最適化、生産性の確立、製品の安定性向上など、多くの課題を解決する必要がある。その中で蛋白質工学技術の役割はさらに高まっている。

本稿では食品産業に利用される糖質関連酵素の中から、果物の皮むきや果汁の清澄化等に利用されるペクチナーゼの一種である、リンゴ銀葉病菌(*Stereum purpureum*)由来エンドポリガラクトツロナーゼ(第1章)、および澱粉糖化工業への利用が期待される *Geobacillus thermoglucosidasius* 由来 Oligo-1,6-glucosidase(第2章)を対象として行った蛋白質工学的研究について述べる。

第1章

リンゴ銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼに関する研究

緒言

エンドポリガラクトナーゼ(EndoPG)は、ポリガラクトン酸の α -1,4-結合をエンド型に加水分解する反応を触媒する酵素であり Glycoside Hydrolases (GH)ファミリー28 に分類されている(Fig. 1)[1, 2]。ポリガラクトン酸は、植物細胞壁に含まれるペクチンを構成するホモガラクトナンの主鎖構造にあたる。植物細胞壁の構成成分を分解する活性から、EndoPG をはじめとしたペクチン質分解酵素は、植物病原菌や木材腐朽菌等で発現していることが多い。植物病原菌は、これらの酵素を分泌して細胞壁を破壊することで植物体内への侵入を果たし、さらに種によっては分解生成物を炭素源として利用する[3]。一方、産業的には果物ジュースの清澄化、野菜ジュースの液性改善、果物加工における皮むきの効率化等に利用されている。

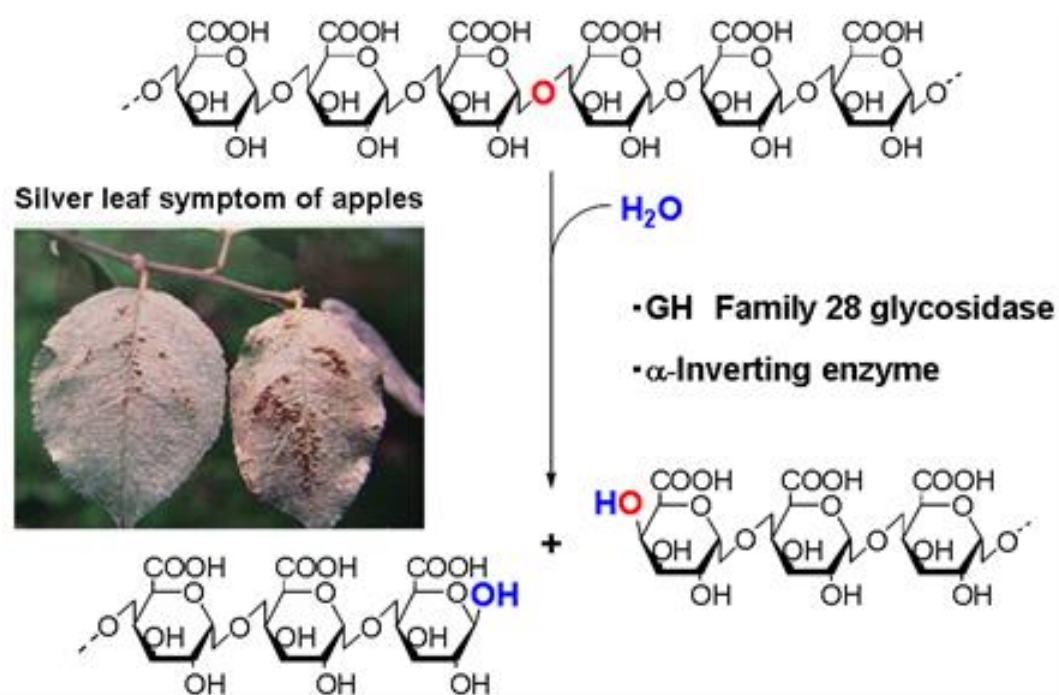


Fig. 1 リンゴ銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼの作用

銀葉症状(写真)発現物質として単離された EndoPG は GH ファミリー28 に属しており、インバーティング型の反応を示す。[2]

本研究の対象である EndoPG は、リンゴ銀葉病菌(*Stereum purpureum*)ASP-4B 株から、銀葉症状発現物質(Silver-Leaf Inducing Substance : SLIS)として単離、同定された[4, 5, 6]。この ASP-4B 株は、等電点の異なる 4 種類の EndoPG I、II、III、IV (pI 8.5, 8.1, 7.6, 4.9) を生産するが、EndoPG I は全生産量のうち最大の 50%を占め、最も高い等電点を示すことから、4 種の中では研究の初期に精製され、これまで詳細な研究が進められてきた[7]。

この精製において EndoPG I は、SDS-PAGE で分子量の極めて近い三成分に分かれることが明らかとなった[8, 9]。これは *N*結合型糖鎖の結合本数に違いであることが明らかとなっており、分子量の小さい方から EndoPG I a, I b, I c とし、それぞれ糖鎖が、2、3、4 本付加されている。また、一次構造を明らかにするためにクローニングが行われ、遺伝子配列が決定された[10, 11]。cDNA の情報から得られたアミノ酸配列情報の全長は 403 残基であり、プロテインシーケンサーによる *N* 末端配列解析の結果、24 残基がシグナル配列であることが分かった。またこの際、シーケンス解析により明らかとなったアミノ酸配列と、*S. purpureum* の培養ろ液から精製された EndoPG I を比較したところ、精製標品では *C* 末端に 44 アミノ酸残基の欠失があることが明らかとなった。本研究では、403 残基のうち、*N* 末端シグナル配列 24 残基を失ったもの(379 残基)を Pro-EndoPG I、さらに *C* 末端 44 残基を除いた配列(335 残基)を mature-EndoPG I とした。

さらに EndoPG I の高次構造を知るために LC-ESI-MS を用いたジスルフィド結合の位置、および糖鎖構造分析が行われた。その結果、ジスルフィド結合は 3 箇所あり、付加されている *N*結合型糖鎖の構造はハイマンノースタイプであること、*O* 結合型糖鎖は持たないことが明らかとなった。*N* 型糖鎖の結合モチーフは、一次配列中に 4 箇所含まれている(Fig. 2) [9]。

また EndoPG I は結晶性が非常に高く、精製酵素を使用した X 線結晶構造解析が 0.96 Å の超高分解能で行われ、EndoPG I の立体構造が明らかとなった(Fig. 3) [12, 13]。この立体構造解析は、mature-EndoPG I について行われたため、*C* 末端 44 残基部分の構造は不明である。

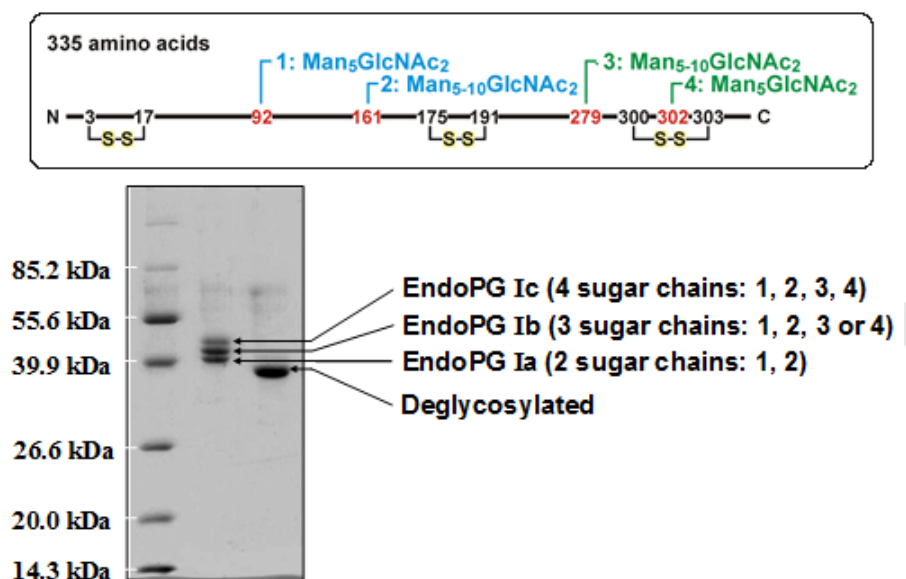


Fig. 2 EndoPG I の *N*結合型糖鎖およびジスルフィド結合
 EndoPG I は *N*型糖鎖結合モチーフを 4 箇所所有し、3 つのジスルフィド結合を形成している [8]。また、糖鎖結合本数の異なる 3 種が精製されている [9]。

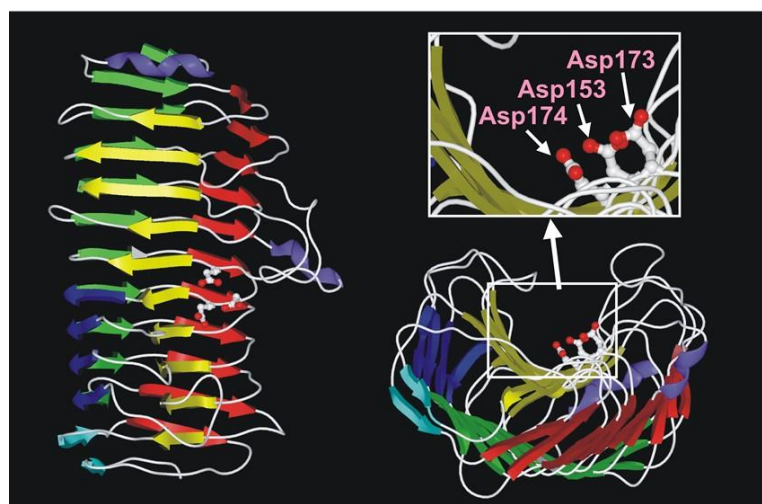


Fig. 3 EndoPG I の立体構造 (PDB : 1K5C)
 EndoPG I は特徴的な β -ヘリックス構造を形成している。また、触媒残基として Asp153、Asp173、Asp174 を持つ [13]。

これら詳細な解析の中でも、リンゴ銀葉病菌由来 EndoPG I 最大の特徴は、その耐熱性である[6]。他起源の EndoPG が、一般的に 50~60°Cで酵素活性を失うのに対し、EndoPG I はおよそ 10°C高い、70°Cでも活性を維持することができる[14、15]。産業利用の面から見ても、耐熱性の高い蛋白質は、製造工程、出荷運搬および製剤保管時の安定性が優れていることも多く、使用期限の延長などが重要視される産業用酵素としては非常に有利な性質と言える。そのため本酵素について、さらに詳細な情報を取得することは、産業利用される EndoPG の性質改良について考察する上でも意義があると考えられた。

第1章では、EndoPG I の酵母を宿主とした発現・精製・性質(I)、EndoPG IVの精製とクローニング(II)、EndoPG IVの *Aspergillus oryzae* を宿主とした発現・精製・糖鎖解析(III)、EndoPG I の持つユニークな C 末端 44 残基配列の機能解析(IV)についてそれぞれ述べる。

I、エンドポリガラクトナーゼ I の酵母を宿主とした

発現・精製・性質

I - 1 序論

これまでの研究で、大腸菌を宿主とした発現系を用いて EndoPG I を大量に取得することが可能となった[16]ため、銀葉病菌を培養して得られる Native の EndoPG I と組換え酵素(rEndoPG I)との間で、様々な酵素化学的性質の比較が行われた。その中で、耐熱性において顕著な差が見られ、rEndoPG I で 15°C ~ 20°C ほど劣っていることが明らかとなった[17]。前述したとおり、優れた耐熱性は EndoPG I の重要な特徴のひとつである。

Native EndoPG I と rEndoPG I の差異として、第一に糖鎖修飾の有無がある。大腸菌は糖鎖修飾能を持たないため、rEndoPG I には糖鎖が全く付加されていない状態である。他の酵素ではあるが、N 結合型糖鎖が熱安定性の向上に影響を与えているという報告も見られる[18-20]。第二に銀葉病菌・大腸菌間での、蛋白質フォールディング能力の差が考えられる。初期の EndoPG I 異種発現検討では、*Escherichia coli* BL21 株が宿主として選択されたが、この菌株では活性を持った組換え酵素を得ることができなかった。そこで、宿主をフォールディング能力が改善された菌株である Origami 株に変更したところ活性を持った組換え酵素を得ることができた[16]。この点を考えると、大腸菌のフォールディング能力の不備により、rEndoPG I の構造が不安定であり、耐熱性が低下している可能性も考えられた。清水らにより行われた Native EndoPG I および rEndoPG I の X 線結晶構造解析では、両者の立体構造は全くの同一であったという報告[13]もあるが、立体構造の不安定な rEndoPG I は、結晶化の過程で除かれた可能性も考えられる。

以上の経緯から、rEndoPG I の耐熱性が低下した原因を調べるため、大腸菌に比べてフォールディング能力が優れ、さらに糖鎖修飾能を持つ真核生物での発現系の構築、そして得られた組換え酵素の解析を行うことにした。本研究では、真核生物の宿主として一般的に用いられている酵母 *Pichia pastoris* [21-27] を選択して発現系を構築し、フォールディングが完全な組換え EndoPG I を取得すること、さらに得られた組換え酵素の性質を調べることで、糖鎖修飾と耐熱性の関連性を明らかにすることを目的とした。

I-2 実験方法

I-2-1 菌株、培養条件、プラスミド、プライマー

プラスミド調製用の宿主として、大腸菌 *E. coli* JM109 株を使用した。この菌株は Low-salt-LB 培地(1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム)で培養を行った。組換え EndoPG I 発現用の宿主には、*P. pastoris* GS115 株 (Invitrogen 社)を使用した。この菌株は YEPD 培地(2% ペプトン、1% 酵母エキス、2% グルコース)にて培養を行った。形質転換された *P. pastoris* は、100 µg/mL の Zeocin を含む、YPDS 培地(2% ペプトン、1% 酵母エキス、2% グルコース、18.2% ソルビトール)にて選択を行った。組換え酵素発現時には、BMGY 培地(2% ペプトン、1% 酵母エキス、100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH6.0、1.34% Yeast Nitrogen Base、 4×10^{-5} % ビオチン、1% グリセロール)および BMMY 培地(2% ペプトン、1% 酵母エキス、100 mM リン酸カリウム緩衝液 pH6.0、1.34% Yeast Nitrogen Base、 4×10^{-5} % ビオチン、0.5% メタノール)を使用した。培地は *Pichia* expression system manual (Invitrogen 社)を参考に調製した。蛋白質発現のプラスミドには、pPICZαA (Invitrogen 社)を選択した。このプラスミドは、*Saccharomyces cerevisiae* の α-ファクターシグナル配列 [28] を有しており、EndoPG I を分泌型で発現させることができる。また使用したプライマーは、北海道システムサイエンス社より購入した。

I-2-2 EndoPG I 発現用プラスミドの調製

発現用プラスミド pPICZαA/EPG I は以下の方法で調製した。mature-EndoPG I の cDNA を、5'- CCGCTCGAGAAAAGAGCTACTTGC ACAGTCAAG -3' (*Xho* I)と 5'- AATACCGCGGTCACAAGTACTGGCCACC AGT -3' (*Sac* II)のプライマーを使用した PCR により増幅した。得られたおよそ 1,000 bp の PCR 産物を *Xho* I と *Sac* II で処理し、同じ制限酵素で処理した pPICZαA とライゲーションすることで、発現用プラスミド pPICZαA/EPG I を調製した。この方法でベクタープラスミドとライゲーションすることで、EndoPG I と α-ファクターシグナル配列を接続することができる。得られたプラスミド pPICZαA/EPG I は、ABI PRISM 310 DNA Sequencer を使用して塩

基配列を確認した。

I-2-3 酵母 *Pichia pastoris* の形質転換と培養

10 µg の pPICZαA/EPG I DNA を調製し、*Sac* I を使用して切断することで直鎖状にした。直鎖状にした pPICZαA/EPG I を、*P. pastoris* GS115 株のコンピテントセルへ、エレクトロポレーションにより導入した。形質転換体は、100 µg/mL の Zeocin を含む YPDS 培地に塗抹し、30°C にて培養を行って選択した。表現型が Mut⁺ (メタノール資化性) であることが確認されたシングルコロニーを 300 mL の BMGY 培地で OD_{600nm} が 5.0 程度になるまで 30°C、250 rpm の条件で約 20 時間培養を行った。培養した形質転換酵母を 2,000 g、5 分間の遠心分離で回収し、発現誘導と酵素生産のため 1,000 mL の BMMY 培地に懸濁し、30°C、250 rpm で 8 日間培養を行った。1 日置きにメタノールを終濃度 5% の条件で添加し、誘導状態を維持した。また、同時にサンプリングを行い、酵素活性を確認した。

I-2-4 組換え EndoPG I の精製

形質転換体の培養液 2.5 L から精製を行った。培養液を 3,000 g、10 分間の遠心分離にかけ、組換え EndoPG I を含む培養上清を取得し、培養上清を 80% 飽和硫酸沈殿処理した。12,000 g、10 分間の遠心分離を行って得られた沈殿物を 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.4)に再溶解し、同緩衝液に対する透析により、脱塩処理を行った。脱塩後に生じた不溶性成分を遠心分離により除去してから、同じく 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.4)にて平衡化した CM52 カラムクロマトグラフィー(φ 32 mm × 700 mm、Whatman 社)に供した。カラムに添加後、非吸着画分を洗い流すため、500 mL の同緩衝液を流し、その後 0~50 mM NaCl の濃度勾配を含む同緩衝液で吸着画分の溶出を行った。EndoPG I が含まれる画分は凍結乾燥後、-20°C で保存した。

I-2-5 PG 活性測定および蛋白質質量測定

EndoPG の活性測定は、全量 2.5 mL の 0.2% のポリガラクトuron酸を含む、100 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)を使用して行った。この反応溶液を 30°C にて保温

し、EndoPG を含む溶液を加えて反応を開始させ、反応時間ごとに生成されたポリガラクトロン酸の還元末端の量を Milner-Avigad 法[29]により測定した。30°Cで1分間に、1 μmol の還元末端を生じさせる酵素量を 1 unit と定義した。蛋白質濃度は、牛血清アルブミン(BSA)を標準蛋白質とした Bradford 法[30]により調べた。

I-2-6 SDS-PAGE およびウエスタンブロット

SDS-PAGE は Laemmli の方法により行った[31]。蛋白質を 12.5%ゲルにより分離し、銀染色を行った。銀染色には Silver Stain Kanto (関東化学社)を使用した。また、分子量マーカーは AMRESCO 社のものを使用した。

ウエスタンブロットでは、蛋白質をセミドライ法により PVDF 膜に転写した。メンブレンを 1%ゼラチン - TBS-T によりブロッキングした後、TBS-T 中で抗 EndoPG I ポリクロナール抗体[10]と反応させた。その後、TBS-T で洗浄し、2次抗体の Anti-rabbit-IgG (Vector 社)と反応させた。さらに洗浄を行った後、BCIP/NTB アルカリホスファターゼ Kit IV(Vector 社)と反応させて、蛋白質を可視化した。

I-2-7 MALDI-TOF-MS 分析

質量分析には Voyager RP HU BioSpectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems 社)を使用し、ポジティブイオンモードで測定を行った。シナピン酸を、50% アセトニトリル/0.1% TFA にて 5 mg/mL の濃度に溶解し、マトリクスとして使用した。分子量キャリブレーションには、ProteoMass Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma 社)に含まれる、アポミオグロビン (平均分子量 : $[\text{M}+\text{H}^+]=16,952.27$)、アルドラーゼ (平均分子量 : $[\text{M}+\text{H}^+]=39,212.28$)を使用した。

I-2-8 CD スペクトル測定と熱変性曲線

組換え EndoPG I を 20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)に対して透析し、脱塩処理を行った。脱塩処理後、同緩衝液にて 0.2 mg/mL に濃度調製し、CD スペクトル測定用のサンプルとした。CD スペクトルの測定は、Jasco J-720 Spectrometer

(Jasco 社)、2 mm キュベットを使用し、25°Cの条件で行った。

酵素サンプルを入れたキュベットを 30~90°Cの各温度で 5 分間熱処理し、CD スペクトルを測定した。熱変性曲線は 217 nm の測定値を使用して作成した。

I-2-9 非還元的ピリジルエチル(PE)化反応とトリプシン分解

組換え酵素サンプルをミリ Q 水に対し透析することで脱塩した。脱塩後、凍結乾燥により水分を除いた。凍結乾燥後のサンプル(蛋白量として約 100 µg)を、4-ビニルピリジン 0.5 µL、10 mM EDTA、7 M グアニジン塩酸塩を含む 50 mM Tris/HCl 緩衝液(pH 8.5) 100 µL に溶解しチューブ内を窒素置換後、アルミ箔で遮光し、室温で 30 分間 ピリジルエチル化反応を行った。反応後のサンプルをミリ Q に対して十分に透析後、凍結乾燥した。

I-2-10 トリプシン消化

ピリジルエチル化反応後に凍結乾燥した組換え酵素を、8 M 尿素を含む 50 mM 重炭酸アンモニウムに、蛋白質濃度として 10 µg/µL になるように溶解し、37°Cで 2 時間保温して変性処理を行った。変性後、7 倍量の 50 mM 重炭酸アンモニウムを加えることで尿素の濃度を下げ、トリプシン(酵素/組換え酵素=1:50)を加え、37°Cで 4 時間反応させ、そのまま凍結乾燥した。

I-2-11 LC-ESI-IT-TOF-MS 分析

分析は NanoFrontier LD (日立ハイテクノロジーズ社)を使用して行った。およそ 5 pmol のトリプシン消化サンプルを MonoCap for fast flow(φ 75 µm × 150 mm)(GL サイエンス社) カラムに添加した。LC の流速は 200 nL/min で、0.1%ギ酸を含む水 - アセトニトリルを移動相としてペプチドを分離した。

I-3 実験結果

I-3-1 組換え EndoPG I の発現と精製

mature-EndoPG I の cDNA 配列を、発現用プラスミド pPICZαA に組み込み、発現用ベクター pPICZαA/EPG I を作製した。この際、プラスミドの持つ α-ファクターシグナル配列と EndoPG I を直接繋ぐことで、組換え酵素を菌体外へ分泌するように設計した。作製したプラスミドを用いて *P. pastoris* GS115 株を形質転換し、組換え酵素の生産を行った。

Zeosin 存在下で生育可能であった形質転換体を選択し、メタノールによる誘導状態で培養した結果、培養上清に PG 活性が確認された。最大の PG 活性は 8 日目に得られ、15 U/mL であった。この結果から、形質転換体の培養期間は 8 日間とした。

また、組換え EndoPG I の発現と菌体外への分泌は、培養上清についてのウエスタンブロット (EndoPG I ポリクロナール抗体を使用) でも確認された (Fig. I-1)。ウエスタンブロットの結果、培養上清をアプライしたレーンでは近接した 4 本のバンドが見られた。これらはすべて大腸菌を宿主として取得した mature-EndoPG I よりも分子量の大きい位置で確認された。これは糖鎖の付加による変化であり、糖鎖結合数の異なる EndoPG I が複数存在していることが予想された。

次に、培養上清 2.5 L より、組換え EndoPG I の精製を行った。培養上清を硫酸沈殿により濃縮し、CM52 カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。EndoPG I は等電点が 8.5 と比較的高い数値であるため [7]、陽イオン交換カラムを選択した。ウエスタンブロットの結果から、複数の Glycoform が含まれていると予想されたことから、それらを分離するため溶出時の NaCl の濃度勾配は、緩やかな条件を設定した (Fig. I-2)。溶出の結果、PG 活性のピークは 4 箇所確認され、それぞれを回収した。

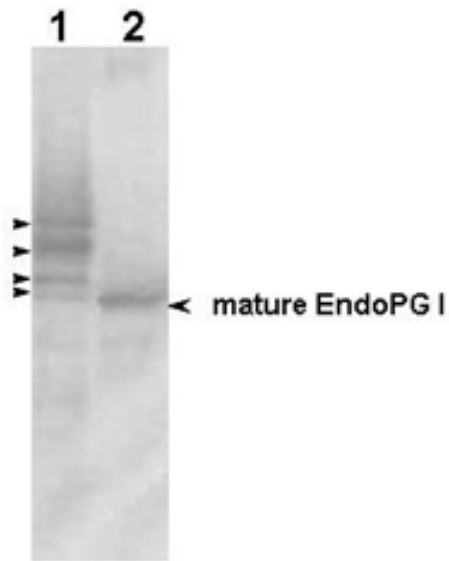


Fig. I -1 酵母培養ろ液のウェスタンブロッティング

1, 酵母培養ろ液(8日目)、2, mature-EndoPG I [16]

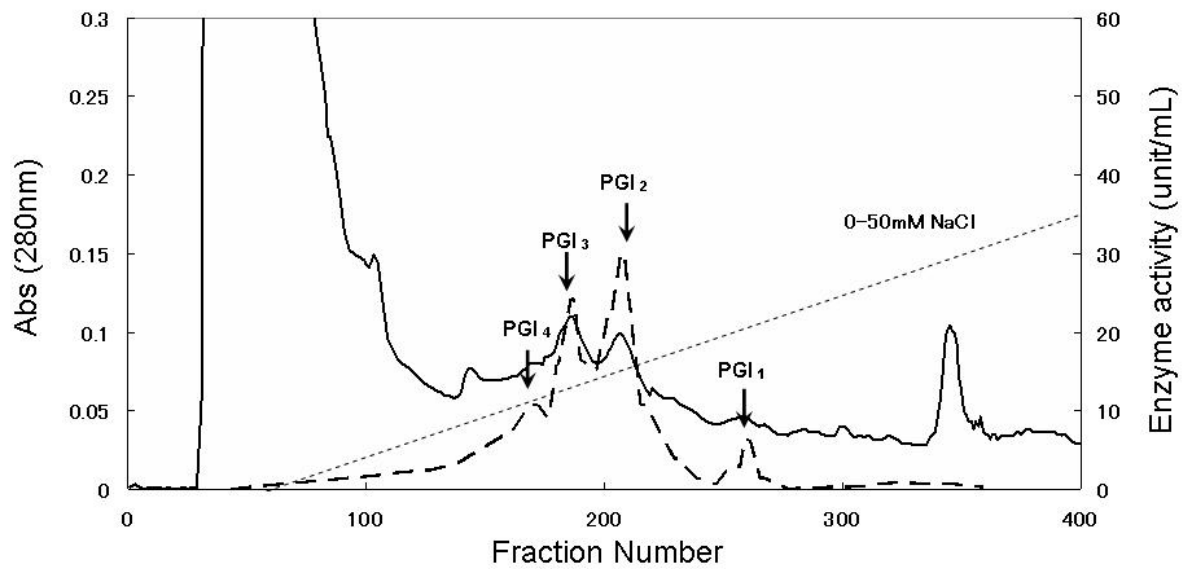


Fig. I -2 CM52 カラムクロマトグラフィー

—, Abs(280nm); - -, PG activity; ···, NaCl conc. (0~50 mM)

回収した PG 画分を、溶出された順に EndoPG I₄~I₁とした。これらを SDS-PAGE により分析した結果、I₄以外の 3 サンプルは均一に精製されたことが確認された(Fig. I-3)。I₄については不純蛋白質の混入が見られるが、得られた蛋白量が僅かであったことから、これ以上の精製操作は行わなかった。

mature-EndoPG I は、そのアミノ酸配列の中に 4 箇所 *N* 結合型糖鎖のモチーフを有している。また *P. pastoris* は組換え酵素にハイマンノース型の糖鎖を付加すること、*O* 結合型の糖鎖はほとんど付加されないことが知られている[32-34]。そのため EndoPG I₄~I₁について、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(EndoH)処理による糖鎖除去を試みた。その結果、これら 4 サンプルすべてで分子量の減少が見られ、大腸菌を宿主として得られた糖鎖付加のない mature-EndoPG I とほぼ同じ分子量を示した。また、MALDI-TOF-MS により詳細な分子量を測定した結果、EndoPG I₄~I₁はそれぞれ、mature-EndoPG I にハイマンノースタイプ糖鎖 4~1 本を加えた分子量であることがわかった。以上の結果から、4 種の組換え EndoPG I に見られる分子量の差は、糖鎖結合本数の差により生じていることが確認された。

この精製工程について Table. I-1 にまとめた。本検討では、1 回のカラムクロマトグラフィーにより、糖鎖結合数の異なる 4 種の組換え EndoPG I を分離し、うち 3 種を電気泳動的に均一に精製することに成功した。均一に精製された 3 種の酵素の比活性は Native EndoPG I とほぼ同一の 420±20 U/mg であった。

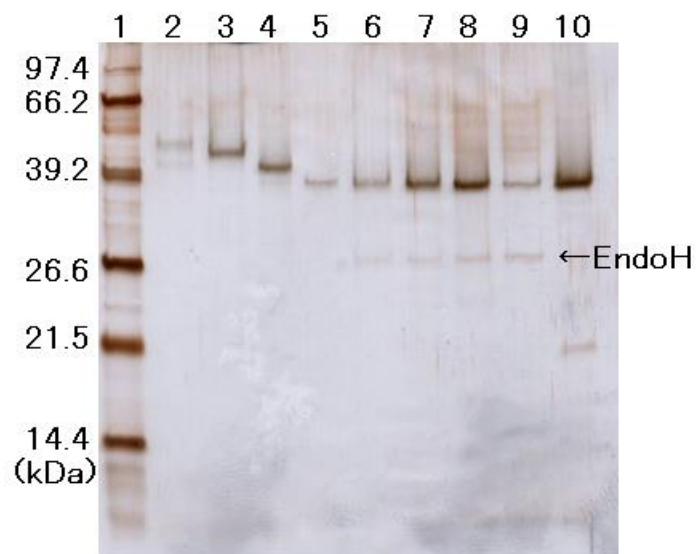


Fig. I -3 精製サンプルの SDS-PAGE 分析

1, 分子量マーカー; 2, EndoPG I₄; 3, EndoPG I₃; 4, EndoPG I₂;
 5, EndoPG I₁; 6~9, EndoH による脱糖鎖後 EndoPG I₄~I₁;
 10, mature-EndoPG I [16]

Table. I -1 組換え EndoPG I の精製

Purification Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Culture supernatant※	24,300	1,778	14	100	1.0
Ammonium sulfate precipitation	13,354	178	75	55	5.5
CM52					
EndoPG I ₄	126	0.41	307	0.52	22.4
EndoPG I ₃	2,424	5.8	418	10	30.5
EndoPG I ₂	1,743	3.9	447	7.2	32.6
EndoPG I ₁	188	0.46	408	0.77	29.8

※ Culture medium supernatant 2.5 L

I-3-2 組換え EndoPG I の糖鎖修飾と耐熱性

MALDI-TOF-MS 分析により EndoPG I₁ の分子量を調べた結果、分子量として、36,426 Da、36,590 Da、36,748 Da の 3 つが検出された (Fig. I-4)。これらはそれぞれ、mature-EndoPG I に、M8、M9、M10 のハイマンノース型糖鎖が付加された分子量を示している。MS スペクトルに、 m/z 36,749 より大きいピークも見られるため、M10 よりも大きい糖鎖が付加された組換え酵素も存在する可能性はあるが、正確に分子量を確認できたのは M10 までであった。さらに、EndoH 処理した EndoPG I₂ の分子量を調べた結果、35,022 Da であることが分かった (Fig. I-5)。これは、mature-EndoPG I に 2 分子の GlcNAc を加えた分子量である。この結果から、EndoPG I₂ には 2 本の糖鎖が付加されていることが分かった。よって、CM52 カラムクロマトグラフィーによる分画では、糖鎖付加数が多い順に溶出されていることが示された。

さらに EndoPG I₂ の持つ糖鎖が、どの *N* 型糖鎖結合モチーフの位置に付加されているかを、トリプシン消化後の EndoPG I₂ を LC-MS 分析することにより調べた。その結果、結合モチーフを含む 4 種のペプチド断片すべてについて、糖鎖が付加されていない分子イオンが検出された。これは、糖鎖修飾の位置はランダムな状態であることを示している。この結果は、Asn92 および Asn161 の位置で必ず修飾を受けるなど、結合位置が決定されている Native EndoPG I の場合とは異なるものであった (Fig. 2)。

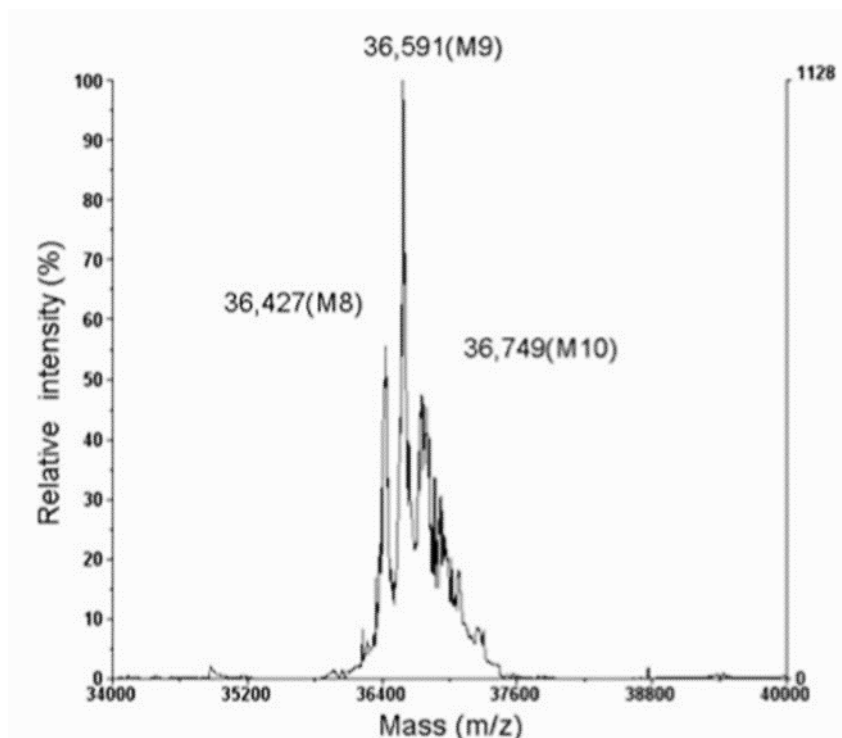


Fig. I -4 EndoPG I₁のMALDI-TOF-MS分析

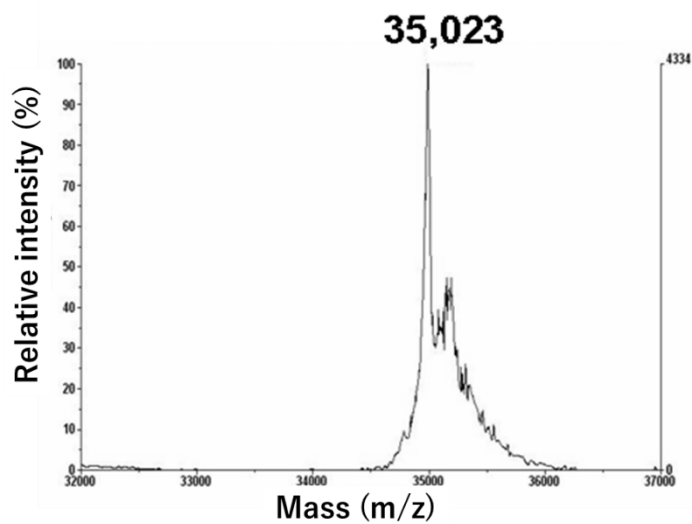


Fig. I -5 脱糖鎖 EndoPG I₂のMALDI-TOF-MS分析

各MALDI-TOF-MS分析では、シナピン酸をマトリクスとして用いた。また、キャリブレーションにはアポミオグロビンとアルドラーゼを使用した。

次に、組換え EndoPG I₁～I₄の耐熱性を調べるため、CD スペクトルを利用した熱変性曲線を作成した。EndoPG I は X 線結晶構造解析の結果から、β-ヘリックス構造を形成することが明らかとなっている。CD スペクトルではこの構造の特徴として、波長 217 nm の位置に極小値を生じるため(Fig. I -6)、熱変性曲線の作成には、この極小値の変化を利用した。実験のコントロールとして糖鎖を 2 本有している Native の EndoPG I a を選択し同様の実験を行った。その結果、熱変性の *T*_m 値は EndoPG I₁～I₄、および EndoPG I a すべて同じ値の 79.5℃を示した(Fig. I -7)。

しかし 4 種の組換え酵素では、70℃付近(Fig. I -7 矢印位置)に EndoPG I a では見られないシグモイドカーブが見られ、二段階の変性を起こしていることが分かった。これは電気泳動的に均一なサンプル中に、熱安定性の異なる成分が含まれていることを示している。

この結果から、まず 75℃で 10 分間熱処理を行い、生じた不溶性画分を遠心分離により除去した後のサンプルについて、熱変性曲線の作成する試験を行った。この試験は、精製において最も比活性が高い状態で得られた EndoPG I₂を用いて行った。熱処理の温度については、組換え酵素の熱変性曲線から判断した。その結果、熱処理後のサンプルでは 70℃付近に見られたシグモイドカーブが消え、EndoPG I a とほぼ同一の熱変性曲線を示す結果となった(Fig. I -8)。

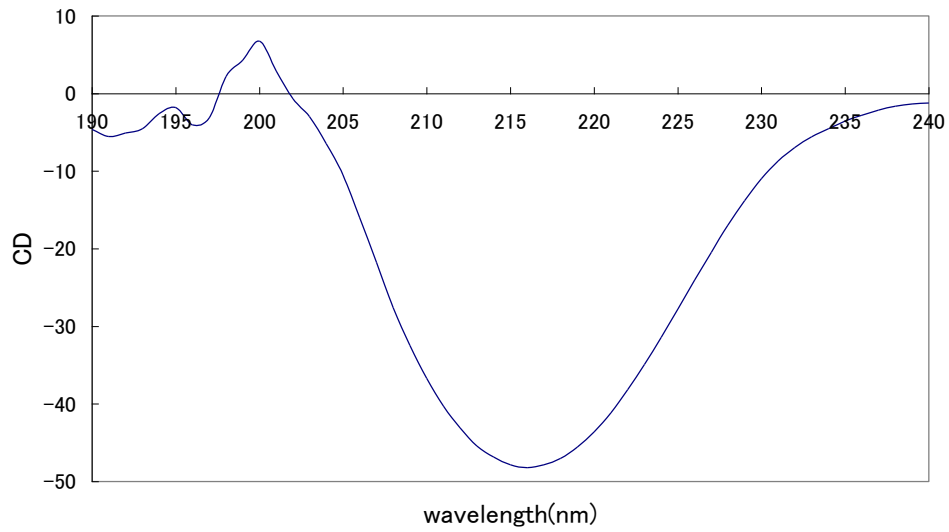


Fig. I -6 組換え EndoPG I₂ の CD スペクトル

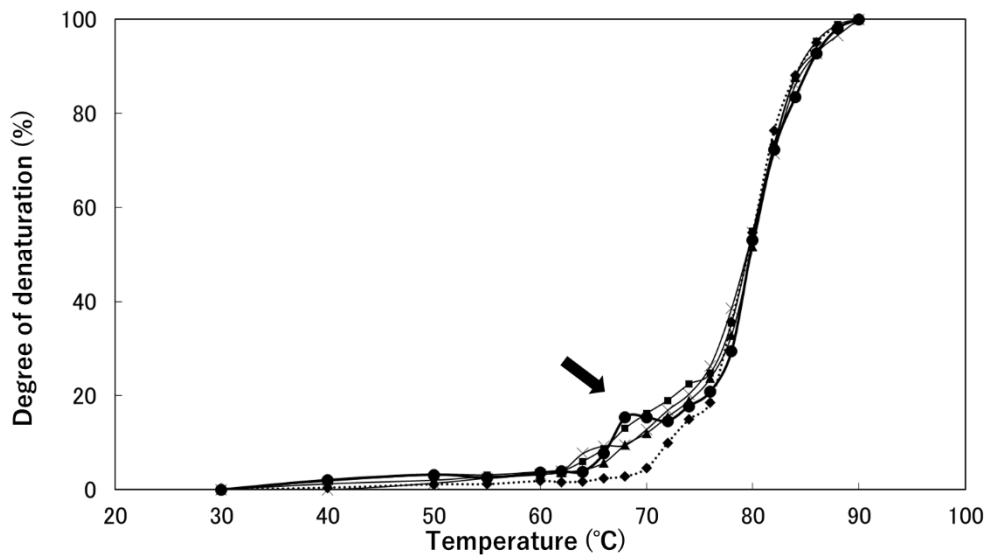


Fig. I -7 組換え EndoPG I₁ ~ I₄ の熱変性曲線

×, EndoPG I₄; ■, EndoPG I₃; ●, EndoPG I₂; ▲, EndoPG I₁; ◆, Native EndoPG Ia
 CD スペクトル測定用のキュベットにサンプルを入れ、30°C~90°Cの各温度で5分間
 処理後に CD スペクトルを測定し、217 nm の値を用いてグラフを作成した。縦軸は、
 完全な変性が起こり極小値が得られない時の CD 値を 100%とした相対値である。矢印
 は二段階の変性を示している。

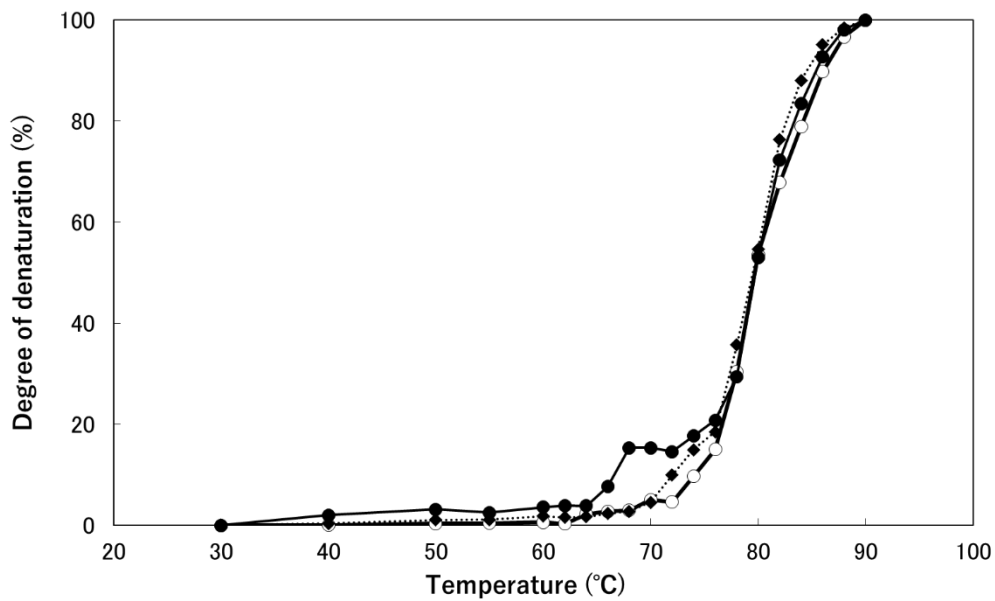


Fig. I -8 熱処理 EndoPG I₂ の熱変性曲線

○, 75°C加熱処理後 EndoPG I₂; ●, 未処理EndoPG I₂; ◆, Native EndoPG Ia
 精製 EndoPG I₂ を 75°C で 15 分処理した。遠心分離により得られた上清に含まれる酵素について熱変性曲線を作成した。

I-3-3 組換え EndoPG I のジスルフィド結合解析

以前の研究で、大腸菌を宿主とした EndoPG I の発現系を構築し組換え酵素 (rEndoPG I) を得た。その検討の初期には、宿主として *E. coli* BL21 株を使用していたが、この菌株では活性を持った組換え酵素を得ることができなかった。そのため、フォールディング能力(特に、ジスルフィド結合形成能)が改善された菌株である Origami 株に宿主を変更したところ、活性を持った組換え酵素を得ることに成功した[16]。この経緯から、EndoPG I₁~I₄に含まれる熱安定性の異なる成分は、ジスルフィド結合の形成に不備がある組換え酵素であると推測し、LC-MS 分析によるジスルフィド結合の解析を行うこととした。分析は、精製において最も比活性が高い状態で得られた EndoPG I₂ について行った。

Fig. I-9 に、既に明らかとなっている EndoPG I のジスルフィド結合の位置を示した。トリプシン消化によって得られるペプチド 1~5 に含まれるシステイン残基がジスルフィド結合の形成に関連している。また Fig. I-10 は、非還元的 PE 化およびトリプシン消化した EndoPG I₂ を LC-MS 分析した際の Total Ion Current Chromatogram (TIC) を示している。TIC からは、各ペプチド断片が LC により良く分離されていることが分かる。また、ジスルフィド結合に関わるペプチドが溶出された位置を、保持時間と合わせて矢印で示した。

まず T38.1 で得られたペプチドの分子量測定の結果は、 m/z 828.16 $[M+4H]^{4+}$ であった (Fig. I-11)。これは、第一のジスルフィド結合 (Cys3-Cys17) が正常に形成されている際に検出される理論値 m/z 3312.6 に等しい値である。一方、PE 化されたペプチド 1、2 の分子量を示すシグナルは検出されなかった。

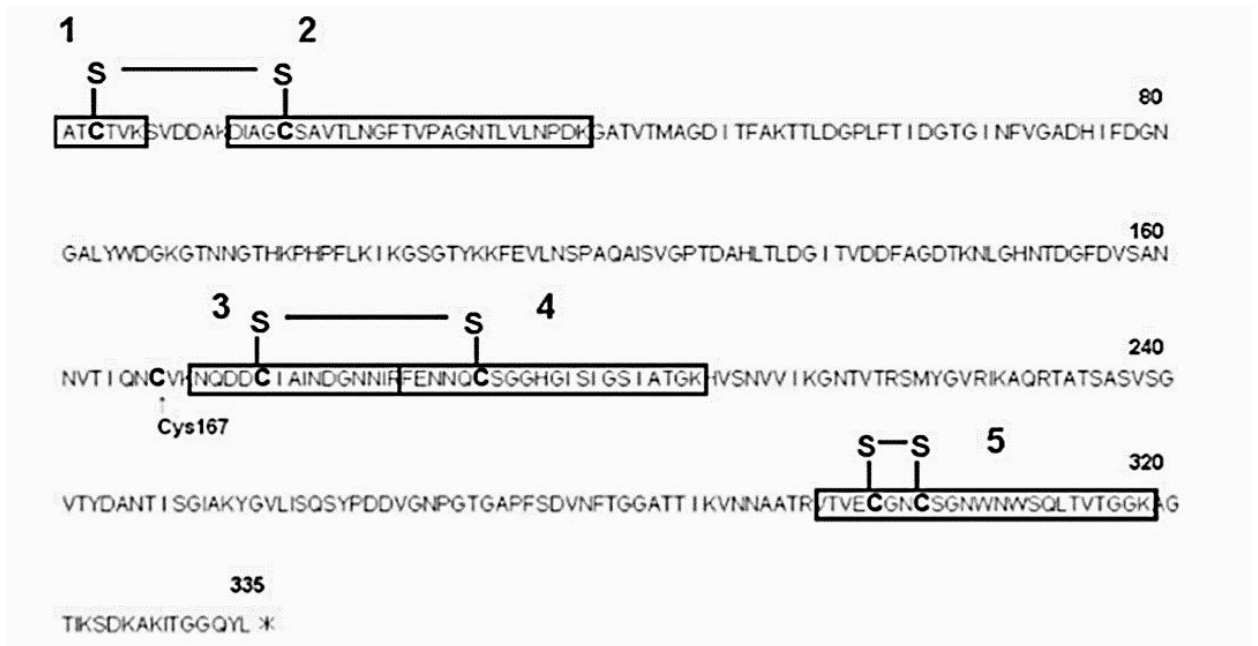


Fig. I -9 トリプシン消化により生じるジスルフィド結合関連ペプチド
 ジスルフィド結合に関連したシステイン残基を含むペプチド 1~5 を示した。3 番目のジスルフィド結合は、ペプチド 5 に含まれる 2 残基のシステイン間で形成される。Cys167 はジスルフィド結合を形成しないフリーな状態である。

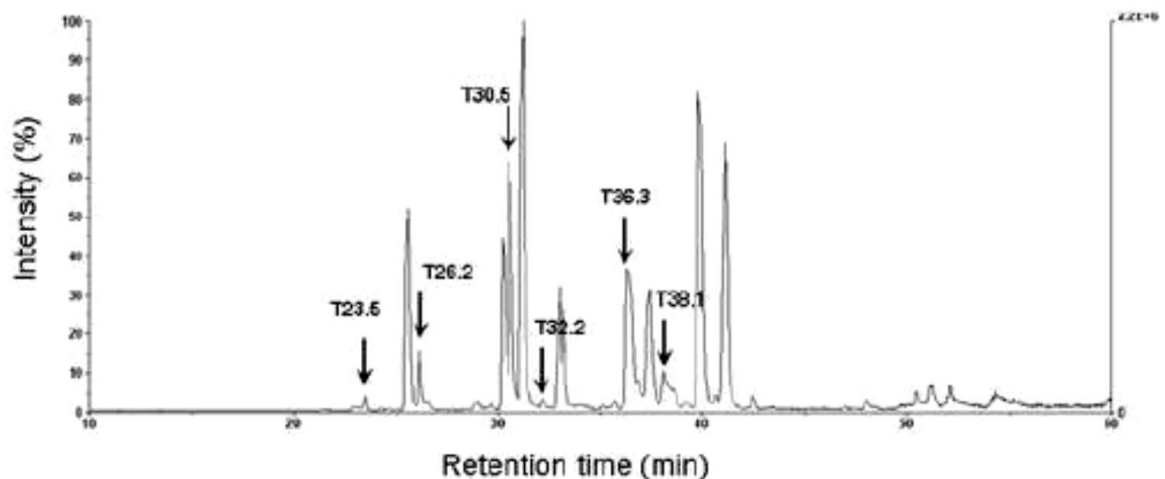


Fig. I -10 トリプシン消化後 EndoPG I₂ の TIC
 6 つの矢印は、Fig. I -9 に示したペプチド 1~5 に関連したピークを示している

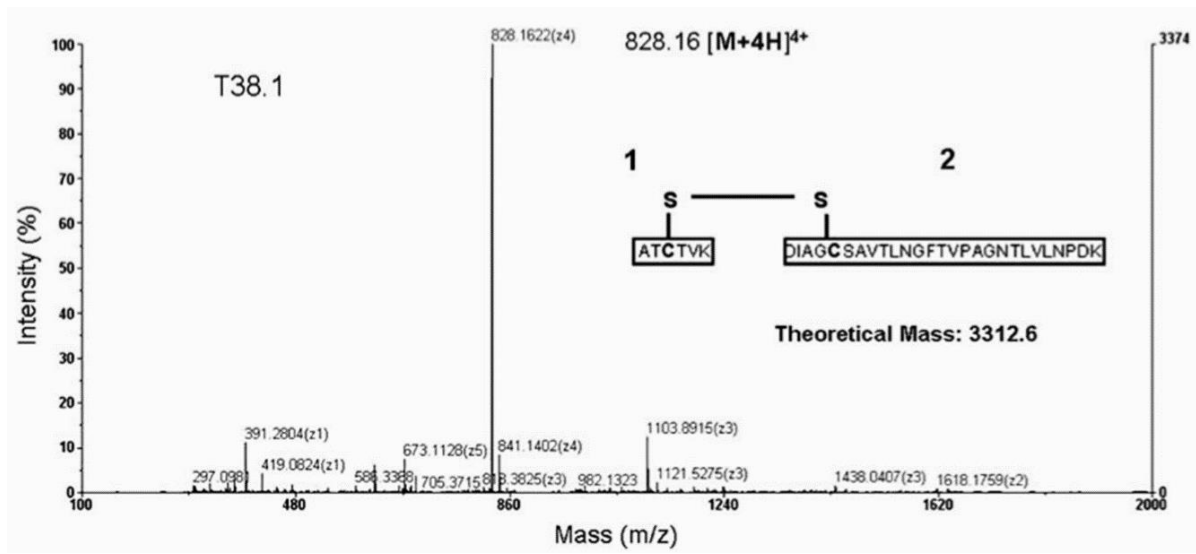


Fig. I -11 T38.1 で溶出されたペプチドの MS スペクトル
 m/z 828.16 [M+4H]⁴⁺はペプチド 1 と 2 がジスルフィド結合で連結したジペプチドのシグナルに相当する。ペプチド 1 と 2 が分離した状態のシグナルは検出されなかった。

次に、T30.5 で得られたペプチドの分子量測定の結果は、 m/z 750.94 $[M+5H]^{5+}$ であった。これは第二のジスルフィド結合(Cys175-Cys191)が正常に形成されている際に検出される理論値 m/z 3748.7 に等しい値である。加えて、PE 化されたペプチド 3 および 4 の分子量として、 m/z 593.94 $[M+3H]^{3+}$ (T23.5)、 m/z 546.51 $[M+4H]^{4+}$ (T26.2)が検出された(Fig. I -12)。

また、ペプチド 5 については、第三のジスルフィド結合(Cys300-Cys303)が正常に形成されている際に検出される m/z 813.70 $[M+3H]^{3+}$ (T36.3)と、PE 化された m/z 663.56 $[M+4H]^{4+}$ (T32.2)の両方が検出された(Fig. I -13)。

LC-MS 分析の結果、組換え酵素の中には、第二および第三のジスルフィド結合が形成されていないものが含まれていることが明らかとなった。

さらにジスルフィド結合の不全体について詳細に調べるため、EndoH により脱糖鎖した EndoPG I₂を PE 化後、トリプシン消化せずに MALDI-TOF-MS 分析を行った(Fig. I -14)。その結果、 m/z 35,548 の分子イオンが検出された。これは mature-EndoPG I に 5 分子の PE が付加した分子量である(5 残基のシステインが修飾を受けた)。EndoPG I はシステイン残基を 7 残基有しており、6 残基で 3 箇所のジスルフィド結合形成を形成し、1 残基はフリーな状態である。PE 化された 5 残基のシステインは、2 組のジスルフィド結合に関わる残基およびフリーの残基であると推察される。

つまり、組換え酵素の中に、第二、第三の 2 箇所のジスルフィド結合がどちらも形成されていない不全体が含まれていることが分かった。

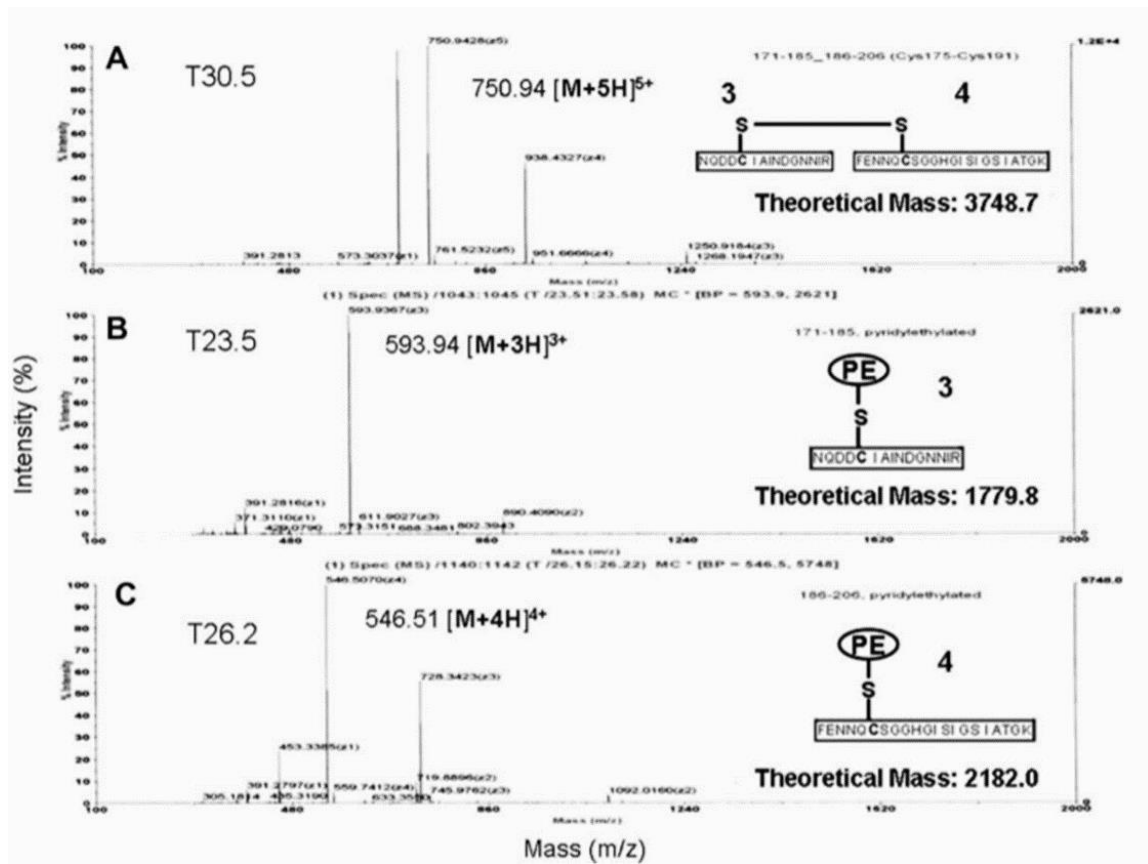


Fig. I -12 T30.5、T23.5、T26.2 で溶出されたペプチドの MS スペクトル
 T30.5(A)ではペプチド 3 と 4 がジスルフィド結合により結合している状態の MS スペクトルが得られた。一方、T23.5(B)、T26.2(C)では、それぞれのペプチドが PE 化された状態の MS スペクトルが得られた。

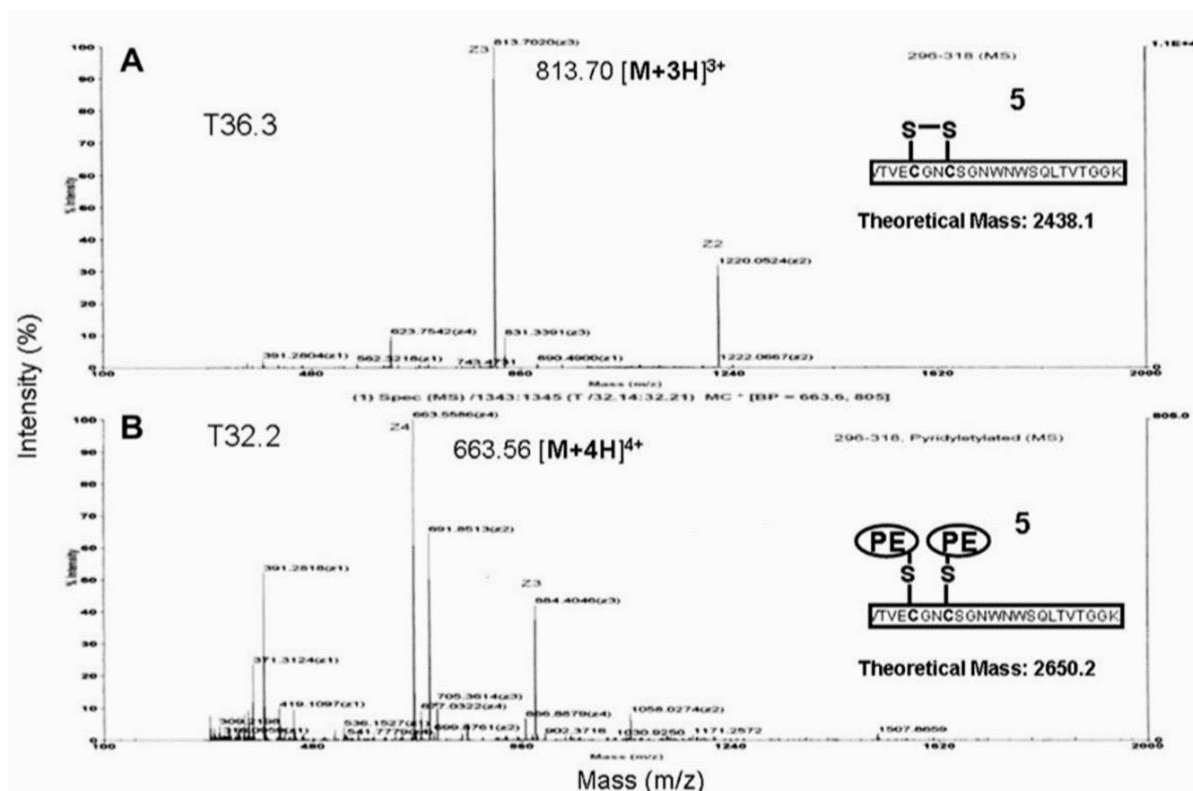


Fig. I -13 T36.3、T32.2 で溶出されたペプチドの MS スペクトル
 T36.3(A)は、ペプチド 5 内でジスルフィド結合が形成された状態の MS スペクトルが得られた。一方、T32.2 ではジスルフィド結合を形成していないために、2 残基のシステイン残基が PE 化された状態の MS スペクトルが得られた。

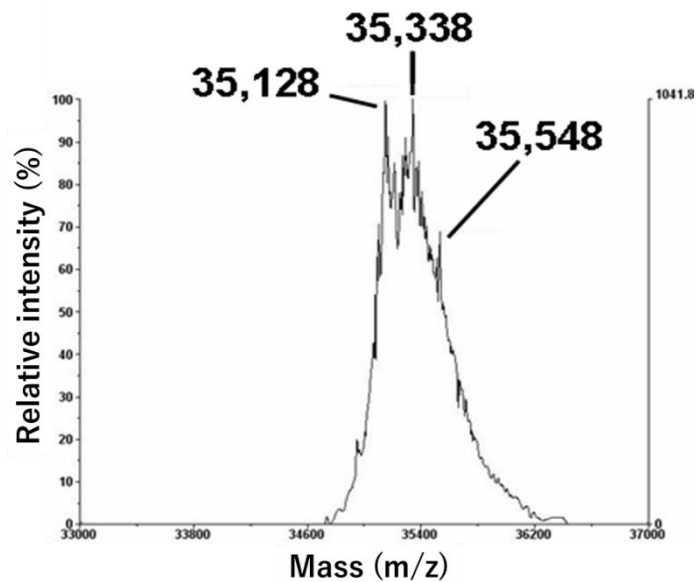


Fig. I -14 非還元 PE 化 EndoPG I₂ の MALDI-TOF-MS 分析

非還元的 PE 化後、トリプシン消化をせずに MALDI-TOF-MS 分析を行った。

m/z 35,548 は、5 残基のシステイン(3 組のジスルフィド結合のうち 2 組およびフリーの 1 残基)が PE 化された状態の分子イオンを示している。

また、m/z 35,128 は正常な組換え酵素、m/z 35,338 は 1 組のジスルフィド結合が形成されない場合の分子イオンを示している。

I-4 考察

酵母 *P. pastoris* を宿主として EndoPG I を発現させた。その際に得られた PG 活性の最大値は、8 日間の培養で 15 U/mL であった。*S. purpureum* ASP-4B 株は、平均して 20 U/mL の PG を培養液中に分泌する[4]。一方、大腸菌を宿主として PG を発現させた際には、培養液 1 mL あたり最大 3.7 U/mL の活性しか得られなかった[16]。この結果と比較すると、酵母を宿主として mature-EndoPG I を効率よく発現させることができたと言える。

酵母培養上清をウエスタンブロットにより分析した結果、4 つの近接したバンドが検出された(Fig. I-1)。これらはすべて mature-EndoPG I よりも分子量が大きい位置で検出された。mature-EndoPG I は 4 箇所の *N* 結合型糖鎖モチーフを有している。よって、これら 4 本のバンドは糖鎖結合数の違いによるものだと考えられた。実際、SDS-PAGE(Fig. I-3)および詳細な MALDI-TOF-MS 分析の結果から、EndoPG I₁~I₄ はそれぞれ糖鎖を 1、2、3、4 本持っていることが明らかとなった。Native EndoPG I 場合では、糖鎖を 1 本のみ持っている EndoPG I₁ のような状態の酵素は得られていない。また、LC-MS を用いた分析で、糖鎖の結合位置はランダムに決定されていると考えられた。これも糖鎖修飾の位置が決定されている Native とは異なるものであった(Fig. 2、[9])。

CM52 カラムクロマトグラフィーで溶出された活性ピークから判断して、4 種の Glycoform は、I₂、I₃、I₄、I₁ の順に多く生産されていると考えられた(Fig. I-2)。また、それらの比活性は、EndoPG I₄ を除いて、Native の EndoPG I とほぼ同じ値となった(Table. I-1)。EndoPG I₄ では、他の蛋白質が混入してしまったために、明らかに低い値となった。この実験では、1 回の陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで、4 種の Glycoform を分離し、さらにそのうち 3 つを純粋に精製することに成功した。Ni カラムなどのアフィニティーカラムを使用せず、イオン交換カラムで溶出の際の NaCl の濃度勾配を緩やかな条件にすることで、それぞれの Glycoform が分離することができた。EndoPG I₄ については、十分な蛋白量が得られなかったため、これ以上の精製は行わなかった。

MALDI-TOF-MS の結果から、EndoPG I₁ は M8~M10 のハイマンノース型

糖鎖を有していることが分かった(Fig. I -4)。 *P. pastoris* を宿主とした場合には、 *S. cerevisiae* の付加する糖鎖に比べて非常に小さく M8~M15 のハイマンノース型糖鎖が付加されること、また O 結合型の糖鎖はほとんど付加されないことが知られている [32-34]。この精製過程では、糖鎖を持たない組換え酵素は得られなかった。

また、CD スペクトルを使用して熱変性曲線を作成し、得られた組換え酵素の熱安定性を比較した。組換え酵素の T_m 値は 79.5°C を示し、EndoPG I a と同じ値となった(Fig. I -7)。しかし、EndoPG I₄ を除いては、電気泳動的に均一なサンプルではあるが、EndoPG I a には見られない 2 段階の変性が確認された。この 2 段階の変化は、4 つの組換え酵素すべてに見られている。これは、熱安定性の異なる 2 成分が、電気泳動的に均一なサンプル中に含まれていることを示している。そこで、EndoPG I₂ を一段階目の変性温度である 75°C で処理して、遠心分離により変性蛋白質を除いた後、再び同じ方法で熱変性曲線を作成した。その結果、事前に熱処理を行ったサンプルでは、2 段階の変化は無くなり、EndoPG I a と同じ曲線を描いた(Fig. I -8)。このことから、電気泳動的に均一なサンプル中に、熱安定および熱不安定な組換え酵素の両方が存在していることが示された。また CD スペクトルから判断すると、熱不安定なものでも二次構造に問題はないものと予想される(Fig. I -6)。

以前の研究で、大腸菌を宿主とした EndoPG I の発現系を構築し組換え酵素を得た。その際、はじめに宿主として選択したのは、*E. coli* BL21 株であるが、この菌株では活性を持った組換え酵素を得ることができなかった。そこで、宿主をジスルフィド結合形成能力が改善された菌株である Origami 株に変更したところ活性を持った組換え酵素を得ることができた [16]。この経験から、ジスルフィド結合の解析を実施した。解析は、Hitachi NanoFrontier LD により行った。

その結果、第一の結合(Cys3-Cys17)では、すべての結合が正常であることが分かった(Fig. I -11)。一方、第二(Cys175-Cys191)と第三(Cys300-Cys303)に関しては、結合が形成されていない不完全体の分子量も検出された(Fig. I -12、I -13)。不完全体の割合は、MS の intensity 値からは判断できない。しかし、熱変性曲線から予想すると、20%程度の不完全な組換え酵素を含んでいると考え

られる(Fig. I-7)。さらに、第二と第三のジスルフィド結合が共に形成されない状態の組換え酵素も存在していることが Fig. I-14 の結果から示された。

第一のジスルフィド結合は、酵素全体のフォールディングにおいて重要な結合であると考えられる。そのため、第一のジスルフィド結合が形成できなかった組換え酵素は、全体の立体構造を形成できず、分解されてしまったと予想される。第二のジスルフィド結合に関与している Cys175 は、立体的に近くに存在しているフリーのシステイン Cys167 と間違ったジスルフィド結合を形成する可能性もあるが、そのようなペプチドの分子量は検出されなかった(Fig. I-15、I-16)。

ジスルフィド結合の解析は比活性が最も高い数値で精製された EndoPG I₂ のみで行ったが、他の組換え酵素でも類似した熱変性曲線を示していることから、同様の結果を示すと予想される。

大腸菌を宿主とした発現系では、ジスルフィド結合の不備がしばしば問題となる[35, 36]。それに対して、酵母 *P. pastoris* を宿主とした発現系では、ジスルフィド結合の不全体が生じるという報告はこれまでなく、蛋白質の発現において新たな知見を得ることができた。

また、糖鎖の結合箇所がランダムであること、また付加された本数により耐熱性に差がみられないことから、EndoPG I の持つ糖鎖は熱安定性に影響していないと考えられる。

Pichia を宿主として得られた組換え酵素の、比活性などの機能が Native の蛋白質に比べて劣っている報告も見られる[37]。その原因として、この研究で明らかにした、ジスルフィド結合の不全体の混入が可能性として挙げられる。

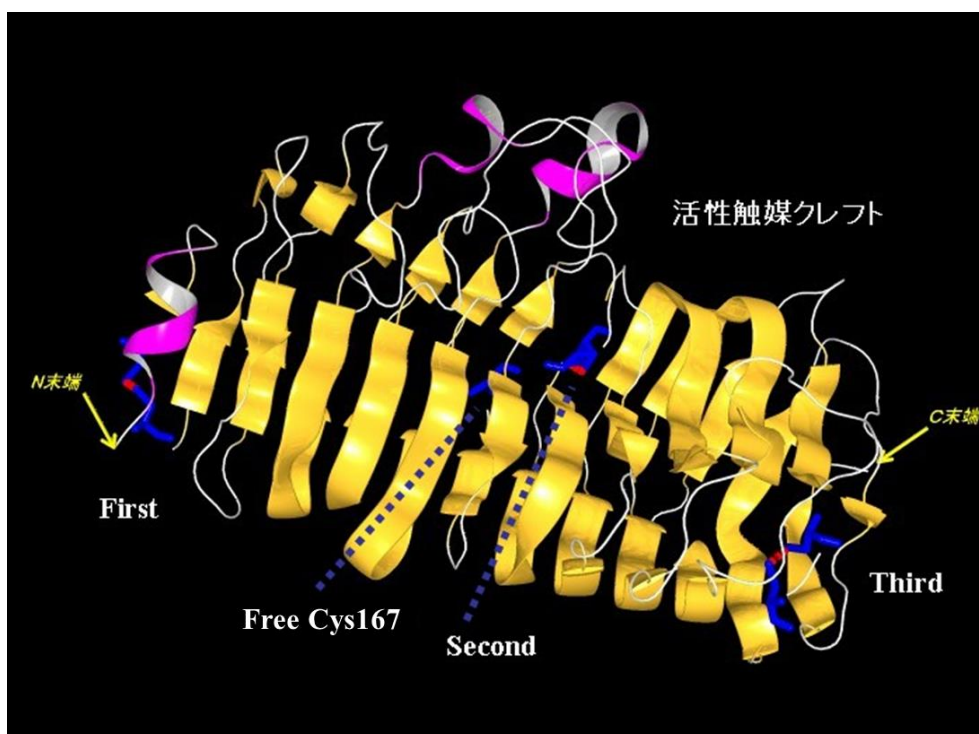


Fig. I -15 EndoPG I の構造とジスルフィド結合の位置

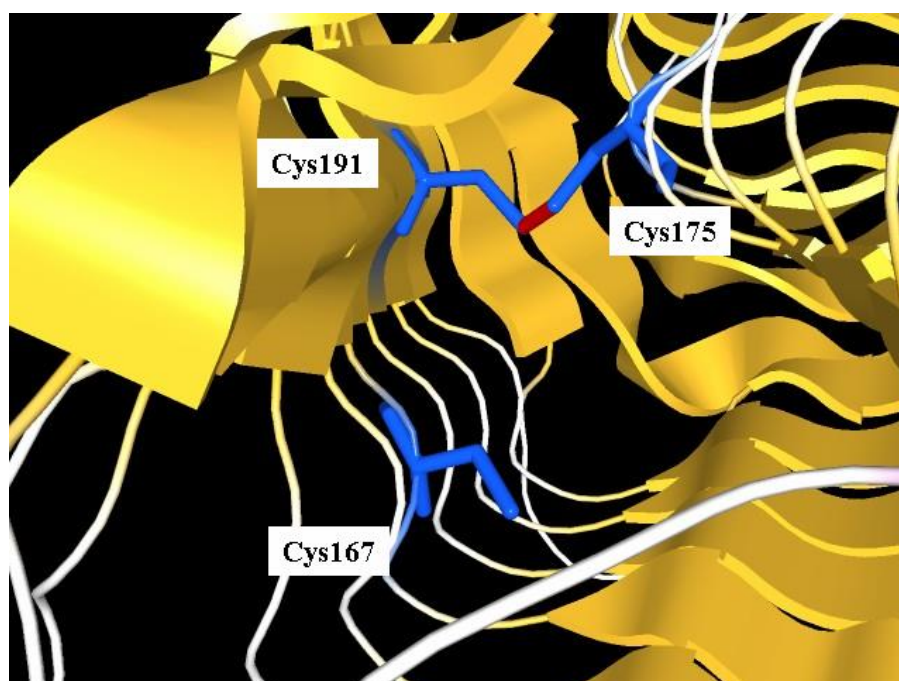


Fig. I -16 第二のジスルフィド結合付近の立体構造

Cys191 と Cys175 で形成される第二のジスルフィド結合近傍には、フリーの Cys167 が存在している。

II、エンドポリガラクトナーゼIVの精製とクローニング

II-1 序論

前述のとおり、リンゴ銀葉病菌(*S. purpureum*)ASP-4B株は、等電点の異なる4種類の EndoPG I、II、III、IVを生産する (pI 8.5, 8.1, 7.6, 4.9) [7]。

この中で酵素の生産量が多く精製などの操作に有利であったことから、これまで EndoPG I を中心として研究が進められ、その諸性質が明らかにされた。

EndoPG I の特徴のうち最も注目されたのは、その高い耐熱性である。他起源の EndoPG が 50~60°C程度で失活するのに対して、EndoPG I はおよそ 10°C 高い 70°Cでも活性を維持することができる[6、14、15]。

この高い耐熱性を EndoPG I がいかにして獲得しているかを調べるため、他起源の EndoPG のアミノ酸配列との比較を行ったが、40~50%程度の相同性を示すのにとどまる結果となった(Fig. IV-1、P65)。一方、同起源の EndoPG 同士で比較を行えば、より高い相同性を示すことが予想される。このことから、*S. purpureum* が生産する残り 3 種の EndoPG のアミノ酸配列を明らかにして EndoPG I の配列と比較することが、EndoPG I の高い熱安定性について理解する上で必要であると考えた。本研究では、残り 3 種のうち最も等電点が離れている EndoPG IVを選択し研究を進めることとした。

第1章-IIでは、リンゴ銀葉病菌培養液からの EndoPG IVの精製およびクローニングについて述べる。また今回の実験により明らかとなった EndoPG IVのアミノ酸配列と EndoPG I の配列を比較し、EndoPG I の熱安定化機構について考察した。

II-2 実験方法

II-2-1 使用菌株と培養条件

本研究に使用した *S. puepreum* ASP-4B 株は、青森県リンゴ試験場より恵与された。この菌株の培養は、ジャガイモ煎汁培地(ジャガイモ 250 g/L、1% グルコース)にて、26°C、18 日間 静置培養を行った。

II-2-2 EndoPG IVの精製

以下に記述する方法で、*S. puepreum* ASP-4B 株 培養ろ液から EndoPG IVa と EndoPG IVb の精製を行った。精製操作はすべて 5°C以下の条件で行った。

【手順 1】 培養ろ液に含まれる EndoPG の濃縮

3.85 L の培養ろ液を脱イオン水で 3 倍希釈したものを DE52 と CM52(Whatman 社)の混合カラム(ϕ 5.1×32 cm)に供して蛋白質を吸着させた。吸着した蛋白質を 300 mM NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.2)で溶出した。溶出液を 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.2)に対して透析後、凍結乾燥した。

【手順 2】 CM52 カラムクロマトグラフィー

凍結乾燥したサンプルを溶解し、50 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化した CM52 カラム(ϕ 2.7×48 cm)に添加した。この条件で EndoPG IVは非吸着画分に得られる。非吸着画分を回収し、20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.8)に対して透析後、凍結乾燥した。

【手順 3】 1st DE52 カラムクロマトグラフィー

凍結乾燥したサンプルを溶解し、20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.8)で平衡化した DE52 カラム(ϕ 3.6×50 cm)に添加した。カラム体積の 2 倍量と同緩衝液で洗浄した後、0~50 mM NaCl の濃度勾配を含む同緩衝液により溶出を行った。活性画分を回収し、限外濾過により 50 mL まで濃縮した。濃縮液は 20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5)に対して透析した後、凍結乾燥した。

【手順 4】 2nd DE52 カラムクロマトグラフィー

凍結乾燥したサンプルを溶解後、20 mM リン酸緩衝液(pH 6.3)に対して透析し、同緩衝液で平衡化した DE52 カラム(ϕ 2.2×81 cm)に添加した。溶出は 0～40 mM NaCl の濃度勾配を含む同緩衝液により溶出を行った。

活性画分を回収し、限外濾過により 50 mL まで濃縮した。濃縮液は 20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5)に対して透析した後、凍結乾燥した。

II-2-3 PG 活性測定および蛋白質質量測定

I-2-5 記載の方法で行った。

II-2-4 脱糖鎖 EndoPG IVa、IVb の調製

脱塩処理をした EndoPG IVa、IVb それぞれ 100 μ g を 100 μ L の 50 mM 酢酸-ピリジン緩衝液(pH 5.6)に溶解し、25 U の EndoH を加えた。調製した反応液は 37°C で一晩反応させた。

反応後のサンプルから μ RPC C2/C18 PC3.2/3 カラムを使用した SMART システム (Pharmacia 社)により、脱糖鎖 EndoPG IVa、IVb を精製した。溶出の条件は、1%～90% アセトニトリルの濃度勾配を含む 0.1% トリフルオロ酢酸/水により行った。

II-2-5 SDS-PAGE 分析

I-2-6 記載の方法で行った。

II-2-6 ESI-MS による分子量測定

ESI-MS による分析は API-300 Atmospheric Pressure Ionization Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry (PerkinElmer Sciex 社)を用いて行い、マススペクトルの解析ソフトには、BioMultiView ver. 1.0(PerkinElmer Sciex 社)を用いた。脱塩処理をした 100 μ g の EndoPG IV を 80 μ L の 0.02% ギ酸を含む 35% アセトニトリルに溶解した。このサンプルをシリンジポンプにより 5 mL/min の流速で機器に送り、分子量測定を行った。測定はすべてポジティブイオンモードで行った。

II-2-7 アミノ酸配列解析

精製した EndoPG IV の N 末端のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサー PPSQ-10 (Shimadzu 社) を使用して行った。

II-2-8 CD スペクトル測定と熱変性曲線

I-2-8 記載の方法で行った。

II-2-9 全 RNA の抽出と cDNA 合成

13 日間培養した *S. purpureum* の菌糸を No.1 ろ紙(Whatman 社)を使用して回収し、蒸留水でよく洗浄した。全 RNA の抽出には QuickGene RNA tissue Kit SII (富士フィルム社) を使用した。得られた RNA サンプル 20 ng から、GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems 社) を使用して逆転写反応を行い、cDNA を調製した。逆転写には、アダプター配列を付加したオリゴ dT₁₆ プライマー(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3')を使用した。

II-2-10 3'-RACE 法

前項で調製した cDNA を鋳型として使用し、PCR により EndoPG IV の配列の増幅を行った。プライマーには 5'-GCWACTTGYACMGTYAAR -3' (F1) および 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC -3' (3'-AP) を使用した。F1 プライマーは、精製 EndoPG IV の N 末端アミノ酸配列解析の結果から、3'-AP プライマーは逆転写の際に付加したアダプター配列に基づいて設計した。

この PCR により得られた約 1,200 bp の DNA 断片と pGEM-T easy クローニングベクター(Promega 社)とをライゲーションし、大腸菌 JM109 株に導入して、形質転換を行った。形質転換処理をした大腸菌をアンピシリンと、IPTG および X-gal を含む LB 培地(1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% 塩化ナトリウム)に塗抹して、37°C で一晩培養した。培養後に得られた白色コロニーをアンピシリン入りの LB 培地にて培養し、プラスミドを抽出した。

II-2-1.1 ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)によるテーリングと 5'-RACE 法

テーリングのため、5 μ L の 10 mM dCTP と 10 μ L の 5 \times TdT 緩衝液、7.5 U の TdT (Invitrogen 社)を混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、65 $^{\circ}$ C、10 分の加熱により反応を停止した。

テーリング反応後に精製した DNA サンプルを鋳型として、5'-RACE のための PCR を行った。プライマーにはアダプター付きのオリゴ dG プライマーとして、5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHIIGGGHIIGGGIIG -3' と 5'- TTATGATGTCTCTGAGGAGTTCG -3' (R1)を使用した。次にこの PCR で得られた DNA 断片を鋳型として、ネステッド PCR を行った。

ネステッド PCR には、5'- GGCCACGCGTCGACTAGTAC -3' (5'-AP : 5'-アダプター配列にアニール)と、5'- GCACCGACAAACTGGATGTTAGT -3' (R2)を使用した。R1 プライマーと R2 プライマーは 3'-RACE により明らかとなった EndoPG IV の配列に基づいて設計した。この PCR で得られた約 350 bp の DNA 断片を同様に pGEM-T easy クローニングベクター (Promega 社)に導入し、目的配列を組み込んだプラスミドを取得した。使用したプライマーはすべて北海道システムサイエンスより購入した。

II-2-1.2 cDNA 配列解析

3'-RACE および 5'-RACE により調製したプラスミドに含まれる DNA 断片の塩基配列を調べた。解析は、BigDie Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社)と、ABI PRISM 310 シーケンサー (Applied Biosystems 社)を使用して行った。

II-3 実験結果と考察

II-3-1 EndoPG IVa、IVb の単離

リンゴ銀葉病菌 *S. purpureum* ASP-4B 株の生産する 4 種の EndoPG I ~ IV のうち、III と IV は CM52 クロマトグラフィーの非吸着画分に得られた。この画分の比活性は 43 U/mg であった。この溶出画分を DE52 カラムクロマトグラフィーに供することで EndoPG IV の精製を行った。この 1st DE52 カラムクロマトグラフィーでは、EndoPG IV は吸着し、III は非吸着となる条件を設定した。EndoPG IV を含む吸着画分を 10 mM NaCl により溶出した結果、比活性は 157 U/mg であった。次に 1st DE52 から溶出した EndoPG IV を含む画分を 2nd DE52 に供して吸着させ、0~40 mM NaCl の濃度勾配により EndoPG IV を溶出した(Fig. II-1)。2 箇所に分かれて溶出した活性画分を EndoPG IVa、IVb としてそれぞれ回収し、限外ろ過により濃縮後、20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5)に対して透析した。透析した酵素サンプルは凍結乾燥し、-20°C で保存した。

精製した EndoPG IVa、IVb の比活性はそれぞれ 448 U/mg および 421 U/mg であった。以前までの検討で明らかとなっている EndoPG I の比活性はおよそ 450 U/mg であることから[6]、類似した数値となった。この精製工程は Table. II-1 にまとめた。結果として EndoPG IVb が IVa に比べ 3.31 倍多く得られた。

精製 EndoPG IVa、IVb の純度検定を SDS-PAGE により行った結果、電気泳動的に均一であることが確認された(Fig. II-2)。また、ESI-MS 分析から、EndoPG IVa、IVb の分子量はそれぞれ 36,017 Da および 37,266 Da であった。

次に、精製 EndoPG IVa、IVb を EndoH により処理した結果、明らかな分子量低下が見られた(Fig. II-2)。脱糖鎖後の IVa、IVb の分子量を ESI-MS で分析した結果、それぞれ 34,987 Da および 35,202 Da であった。EndoH により分解を受けることから、N 型糖鎖による修飾を受けていることが分かる。IVa について、EndoH による脱糖鎖前後での分子量の差は 1,030 Da であり、これは Native EndoPG I の糖鎖修飾との類似性を考慮すると M5 のハイマンノースタイプ糖鎖が除去された分子量であると推察された ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2 = 1,216 \text{ Da}$ 、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1 = 1,032 \text{ Da}$)[9]。IVb での分子量減少は IVa よりも大きかったが、これは N 結合型糖鎖の結合本数の差異であると考えられた。

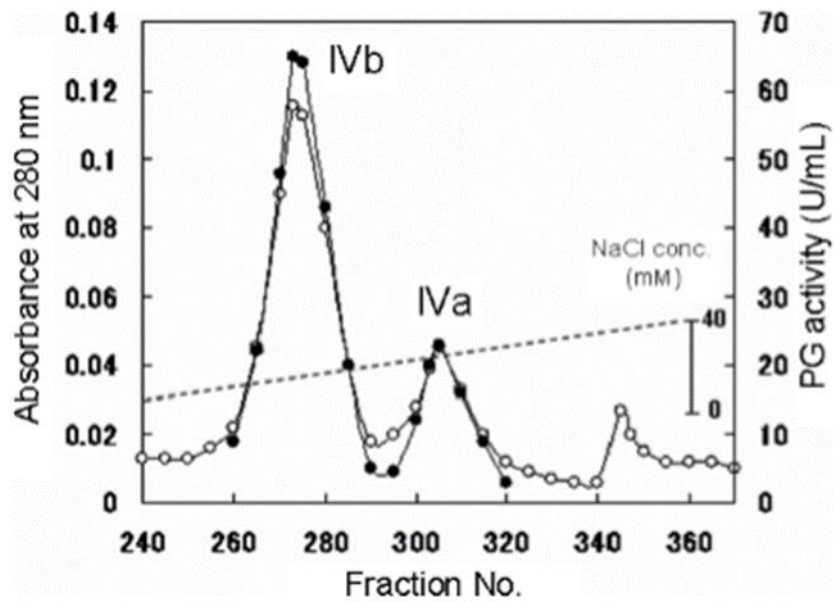


Fig. II-1 2nd DE52 カラムクロマトグラフィー溶出パターン
○, A280nm; ●, PG activity; ----, NaCl conc.(0~40 mM)

Table. II-1 EndoPG IVa、IVb の精製

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Culture filtrate*	187,500	5275	36	1.0	100
CM-DE adsorption	151,200	2419	63	1.8	81
CM52	53,970	1265	43	1.2	29
DE52	11,600	95	157	4.4	6.2
2nd DE52					
EndoPG IVa	1755	7.3	448	12.4	0.9
EndoPG IVb	5821	24	421	11.7	3.1

* 培養液 3.85 L から精製

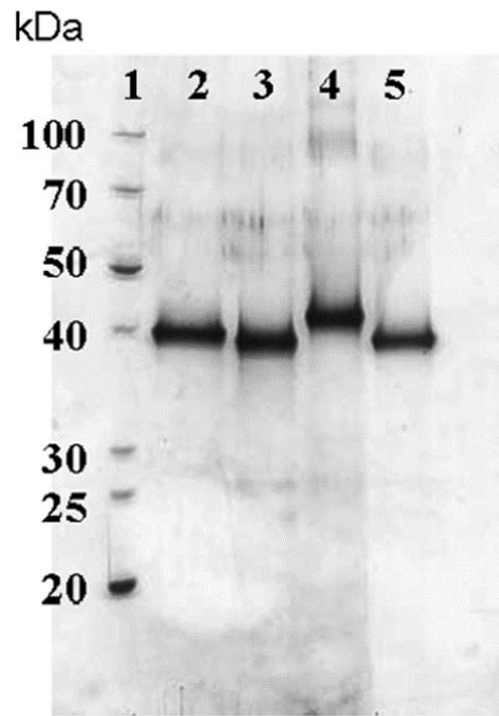


Fig. II-2 精製 EndoPG IVa、IVb の SDS-PAGE 分析
1, 分子量マーカー; 2, EndoPG IVa; 3, EndoPG IVa(EndoH 処理);
4, EndoPG IVb; 5, EndoPG IVb(EndoH 処理)、EndoH 処理により、
分子量の低下が見られた。染色は銀染色により行った。

II-3-2 精製 EndoPG IVa、IVb の性質

EndoPG IVa、IVb の最適 pH は 4.75 であり、EndoPG I の最適 pH 5.0 とほぼ同じ数値であった。次に、熱処理後の残存活性を測定することにより耐熱性を調べた結果、IVa、IVb 共に 55°C、15 分(pH 5.0)までほぼ 100%の活性を維持することが分かった。EndoPG I では同様の試験で 70°Cまで安定であることから、耐熱性に関しては明確な差があることが明らかとなった。

また CD スペクトルを利用した熱変性曲線を作成し、EndoPG IV と EndoPG I の立体構造から見た耐熱性を比較した(Fig. II-3)。その結果、EndoPG IVa、IVb の T_m 値は共に 62.0°Cであった。それに対し、EndoPG I では 79.5°Cであり、EndoPG IVの方が耐熱性として 17.5°C低いことが示された。

II-3-3 EndoPG IVのクローニング

プロテインシーケンサーにより、精製 EndoPG IVの N 末端アミノ酸配列解析を行った結果、ATCTVKSVADSNDIAGCAAV の 20 残基が明らかとなった。これはIVa、IVb とともに同じ結果となった。一方、EndoPG I の N 末端 20 残基は ATCTVKSVDDAKDIAGCSAV であることから、高い相同性を示していることが分かる(下線 4 残基に差異が見られた)。

N 末端アミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて Race 法によるクローニングを行い、EndoPG IV cDNA 配列 1,104 bp を明らかにした。cDNA 配列から明らかとなった EndoPG IVのアミノ酸配列(mature 部)を Fig. II-4 に示した。また N 末端配列解析の結果と合わせて、EndoPG IVは 25 アミノ酸残基のシグナル配列を有していることも明らかとなった。

EndoPG IVの mature アミノ酸配列 343 残基からの理論分子量は 35,104 Da であり、ESI-MS の結果から算出される 34,784 Da (脱糖鎖IVa-GlcNAc の値、即ち 34,987 Da-203 Da = 34,784 Da)より、320 Da 大きかった。この 320 Da の差については、C 末端 3 残基の欠失によるものと考えられる。EndoPG I では、44 残基もの欠失が見られたが、IVではそれほど大きな欠失は見られなかった。

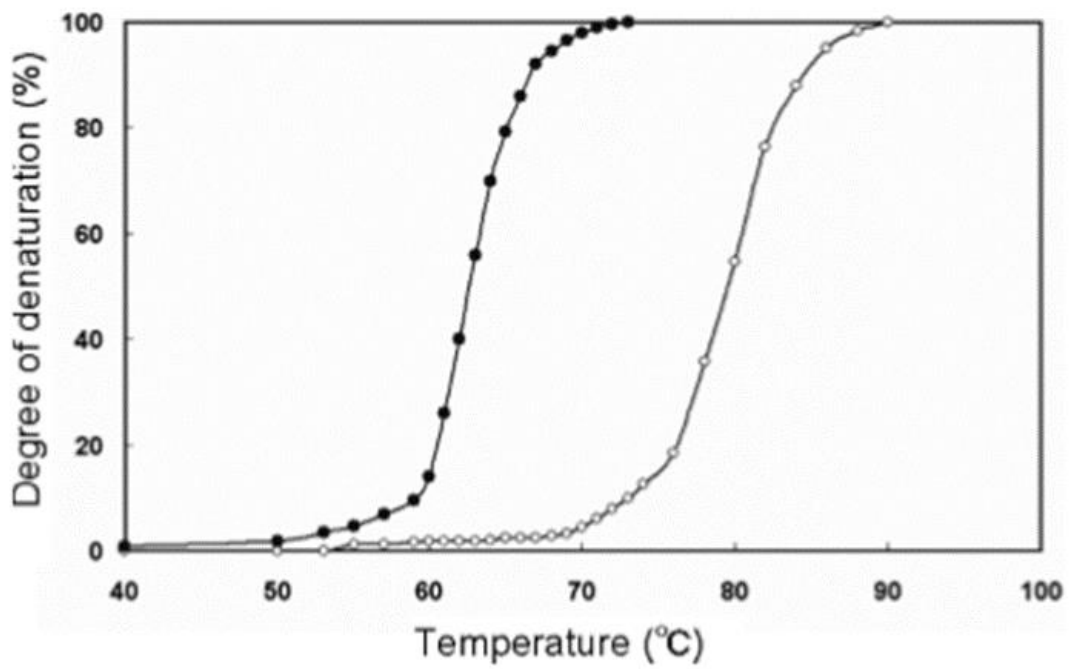


Fig. II-3 CD スペクトルによる熱変性曲線

●, EndoPG IVa; ○, native EndoPG Ia

Fig. I-7 と同様の方法で熱変性曲線を作成した。T_m 値は、IV:62.0°C、I:79.5°C であり、17.5°Cの差が見られた。



Fig. II-4 EndoPG I と EndoPG IV のアミノ酸配列比較

*N*型糖鎖結合モチーフの位置を口で囲って示した。EndoPG I と EndoPG IV の配列を比較し、同一のアミノ酸残基を*で示した。また、IVに不足しているプロリン残基を網掛けで示した (Pro126、Pro269)。矢印(↓)は、EndoPG I でサブサイト+1 および-1 を形成する 14 残基を示しており、これらは I と IV ですべて同一のアミノ酸残基であった。EndoPG I で欠失が起きる C 末端 44 残基を小文字で表記した。

EndoPG IVと mature-EndoPG I の間でのアミノ酸配列のホモロジーは 72% であった。N型糖鎖結合モチーフは、I で4箇所あるのに対して、IVでは2箇所であり、Asn161 と Asn279 の位置で共通していた。EndoPG IVの蛋白質に含まれる塩基性アミノ酸残基(Lys および Arg)は EndoPG I よりも少なく、これが EndoPG IVの等電点が低い特徴につながっていると考えられた。Kester ら[38] が報告したエンドポリガラクトナーゼ、エキソポリガラクトナーゼの配列と比較したところ、Asn151、Asp153、Asp173、Asp174、His195、Gly196、Arg226、Lys228 の8残基については保存されていた。また、EndoPG I との比較から、触媒残基と考えられる Asp153、Asp173、Asp174 の3残基、およびサブサイト+1、-1 を構成する 14 残基が保存されていることが明らかとなった。さらに EndoPG I においてジスルフィド結合を形成することが分かっているシステイン残基についても保存されている。以上の結果から、EndoPG IVと EndoPG I はアミノ酸配列のみでなく、立体構造も類似している可能性が高いと考えられた。実際、大木らの研究[39]により、EndoPG IVは、EndoPG I と同じ位置で3つのジスルフィド結合を有することが確認されている。

EndoPG IVと I の間で多くの類似点が見られる一方で、耐熱性に大きな差が見られた。プロリン残基は蛋白質の耐熱性に影響を与えることが良く知られているが、EndoPG I にはプロリンが 10 残基のあるのに対して、IVは 2 残基少なく 8 残基となっている。10 残基のプロリンのうち Pro126 (IVでは N)と Pro269 (IVでは A)以外の 8 残基は、その位置も保存されている。この 2 残基のうち、Pro269 は EndoPG I でループ構造内に存在している残基であり、耐熱性について特に重要なアミノ酸残基であると考えられる。

その後の大木らによる研究[39]では、EndoPG IVに A269P の変異を加えた場合では、耐熱性が 3°C上昇したことが報告されている。さらに、EndoPG IVと I のアミノ酸配列の差異に注目して検討が進められたが、有効なアミノ酸変異は見出されていない。以上の結果から、EndoPG I においては P269 を始めとした多くのアミノ酸残基が複雑に関与し、高い熱安定性を獲得していると言える。

Ⅲ、エンドポリガラクトナーゼⅣの

Aspergillus oryzae を宿主とした発現と糖鎖解析

Ⅲ-1 序論

第1章-Iでは、*P. pastoris*を宿主とした EndoPG Iの発現について検討を行った。そこで得られた組換え酵素を解析した結果、ジスルフィド結合の不備が原因で熱安定性の劣る酵素が混在していることが明らかとなった。遺伝子組換え酵素の産業利用を考えた場合、製品の安定性を担保する上で、このような不均一性は問題となる可能性があり、よりフォールディング性能の高い宿主についての検討が必要だと考えられた。そこで次に、糖鎖修飾能を有しかつ蛋白質フォールディング能力の高い真核生物の宿主の候補として、*Aspergillus*属菌を使用した検討を行うことにした。*A. oryzae*は食経験のある安定性の高い微生物であり、これは産業上での利用にも有利な点である。

現在、*Aspergillus*を使用した蛋白質発現系は広く用いられており、*Penicillium sp.*のグルカナーゼ[40]、*Myceliophthora thermophila*のラッカーゼ[41]、*Thielavia terrestris*のグルコアミラーゼ[42]など、多くの利用実績が報告されている。さらに Woosley ら[43]は *A. niger*を宿主として発現させた endoPG Cについて、付加された糖鎖構造を含め詳細な解析を行っている。また *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*由来のペクテートリアーゼ3を、*A. niger*、*A. nidurans*、*A. awamori*の3種を宿主として発現した Bartling らの研究では、同じ *Aspergillus*属菌でも付加された糖鎖構造が異なることが報告されている[44]。その中で、*A. oryzae*を宿主とした組換え酵素に付加された糖鎖構造について、詳細な報告はなされていない。

以上の背景から、第1章-Ⅲでは *A. oryzae*を宿主とした EndoPG IVの発現と組換え酵素の精製、およびそれに付加された糖鎖構造の解析について述べる。EndoPG IVを選択した理由は、糖鎖修飾に関する解析を進めるにあたり、N型糖鎖結合モチーフの少ない EndoPG IVで検討を進めるのが有利であると考えたためである。また得られた組換え酵素の耐熱性を指標として、宿主のフォールディング性能について考察した。

Ⅲ－２ 実験方法

Ⅲ－２－１ 菌株、培養条件、プラスミド、プライマー

プラスミド調製用の宿主として、大腸菌 JM109 株を使用した。この菌株は LB 培地で培養を行った。*A. oryzae* niaD300 株は、EndoPG IV 発現用の宿主として用いた。また *A. oryzae* での発現用ベクターには pNAN8142 を選択した。宿主菌株およびベクターは、株式会社大関より恵与された[45, 46]。プライマーは北海道システムサイエンスより購入した。大腸菌を宿主として生産した組換え EndoPG IV は大木らにより取得されたものを用いた[39]。

Ⅲ－２－２ EndoPG IV 発現用プラスミドの調製

発現用プラスミド pNAN8142/EPGIV の構築では、まず PCR により、EndoPG IV 配列の増幅を行った。PCR のプライマーには、5'-TTTTAAGCTTATGCCTTCCTTCTCTTCCCTGA-3' (*Hind*III) と、5'-TTTGTCTAGATTATGATGTCTCTGAGGAGTCG-3' (*Xba*I) を使用した。プライマーは、増幅された配列に *S. purpureum* 由来のシグナル配列が含まれるように、また 5' 側に *Hind*III サイト、3' 側に *Xba*I サイトが付加されるように設計した。

PCR により増幅された約 1,200 bp の DNA 断片を、*Hind*III、*Xba*I で処理し、pNAN8142 上のそれぞれ同じ制限酵素サイトに組み込み、pNAN8142/EPGIV を構築した。

Ⅲ－２－３ 麹菌 *Aspergillus oryzae* の形質転換と培養

約 10 µg の pNAN8142/EPGIV DNA を、*niaD* 配列中にある *EcoR*I サイトで切断して直鎖状とし、形質転換に使用した。*A. oryzae* の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法により行った[47]。形質転換処理後、最小培地で培養を行い、形質転換体を選択した。

得られた形質転換体を DPY 培地(2% トリプトン、1% デキストリン、0.5% 酵母エキス、0.5% リン酸二水素カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム)で、30°C、90 時間振とう培養し、組換え酵素の生産を行った。

Ⅲ-2-4 組換え EndoPG IV (rEndoPG IV) の精製

A. *oryzae* 形質転換体 培養ろ液からの rEndoPG IV の精製は、以下に記載する 3 つの手順で行った。すべての精製操作は 4℃以下で行った。

【手順 1】 培養ろ液に含まれる rEndoPG IV の濃縮

培養液 3 L から精製操作を開始した。まず、80% 飽和硫酸銨析により、培養液中の蛋白質を沈殿させた。rEndoPG IV を含む沈殿物を 12,000 g × 10 分の遠心分離により回収した。得られた沈殿物を 20 mM 酢酸緩衝液(pH 5.5)に再懸濁し、さらに同緩衝液に対して十分に透析した。

【手順 2】 DE52 カラムクロマトグラフィー

透析後のサンプルから遠心分離により不溶性画分を除去した後、同緩衝液により平衡化した DE52 カラム(φ 32 mm × 850 mm)に供して、rEndoPG IV を吸着させた。カラムを 500 mL の緩衝液で洗浄後、rEndoPG IV は 0~62 mM NaCl の濃度勾配を含む同緩衝液により溶出した。溶出後、PG 活性を示す画分を回収して凍結乾燥を行い、その後は-20℃で保存した。

【手順 3】 ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

凍結乾燥後のサンプルを 2 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)に溶解し、同緩衝液に対して十分に透析した。透析したサンプルを遠心分離にかけ、不溶性画分を除去した後、同緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(φ 20 mm × 300 mm)に供し rEndoPG IV を吸着させた。溶出は 5、10、30、50、100 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)により、ステップワイズ方式で行った。精製後は SDS-PAGE 分析を行った。

Ⅲ-2-5 PG 活性測定および蛋白質量測定

I-2-5 記載の方法で行った。

Ⅲ-2-6 SDS-PAGE 分析

I-2-6 記載の方法で行った。

Ⅲ－２－７ MALDI-TOF-MS 分析

I－２－７記載の方法で行った。糖鎖分析の際には、低分子量物質の分析に適した α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリクスとして用いた。

Ⅲ－２－８ CD スペクトル測定と熱変性曲線

I－２－８記載の方法で行った。

Ⅲ－２－９ 糖鎖構造の解析

糖鎖サンプルを取得するため、rEndoPG IV₁、IV₂を EndoH で処理後、遠心フィルターの UltraFree MC5000NMWL (ミリポア社)で処理した。フィルターを透過した低分子画分を組換え酵素由来の糖鎖サンプルとした。

糖鎖の構成糖分析は CarboPac™ PA1 カラム(DIONEX 社)を使用したイオンクロマトグラフィーにより行った。糖鎖サンプルは、2 M TFA 中、100°C、3h 加水分解したものを分析した。濃度 400 mg/mL のフコース、ガラクトース、グルコース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミンをスタンダードとして使用した。

Ⅲ－３ 実験結果と考察

Ⅲ－３－１ 組換え EndoPG IVの発現と精製

pNAN8142/EPGIVを導入した *A. oryzae* の培養液から、rEndoPG IVの精製を行った。培養上清に含まれる PG 活性は 90 時間の培養で 6 U/mL であった。この培養上清を硫酸沈殿により濃縮し、DE52 カラムクロマトグラフィーによる精製を試みた。これまでの研究から、EndoPG IVの等電点が 4.9 と低い数値であることが明らかとなっていた[7]ため、精製には陰イオン交換樹脂を選択した。目的蛋白質を DE52 カラムに吸着させた後、NaCl の濃度勾配により溶出を行った(Fig. Ⅲ-1)。EndoPG IVには N結合型糖鎖のモチーフが 2 箇所ある。第 1 章 - I で、N結合型糖鎖のモチーフを 4 箇所持つ EndoPG I を酵母で発現させた際には、糖鎖結合本数の異なる組換え酵素が 4 種得られた。そのため、Fig. Ⅲ-1 に見られる 3 つの活性ピークは、糖鎖結合数の異なる rEndoPG IVであると考えられた。また EndoPG I での結果から、その糖鎖結合本数を予測し、溶出された順にIV₂、IV₁、IV₀とした。フラクシオン No.200 以降で検出されている PG 活性は宿主由来のものであることを確認している。

DE52 カラムクロマトグラフィーで精製した rEndoPG IVについて SDS-PAGE 分析を行った結果、更なる精製操作が必要であることが明らかとなったため、3 つの活性画分それぞれについてヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を試みた。その結果、3 種の rEndoPG IVは、50 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)により溶出された。

2 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製した rEndoPG IVについて SDS-PAGE 分析を行った結果、3 種の rEndoPG IVは単一に精製されたことが明らかとなった(Fig. Ⅲ-2)。また、EndoH により脱糖鎖処理した組換え酵素について同様に SDS-PAGE 分析した結果、IV₂、IV₁では分子量低下が見られるのに対して、IV₀では分子量変化は見られなかった。この結果から、IV₂では N結合型糖鎖が 2 本、IV₁では 1 本付加されていること、IV₀は糖鎖を持たないことが推察された。この精製工程を Table.Ⅲ-1 にまとめた。精製した組換え酵素の比活性はおよそ 400 U/mg であり、Native の EndoPG IVと近い数値となった(Table. Ⅱ-1)。

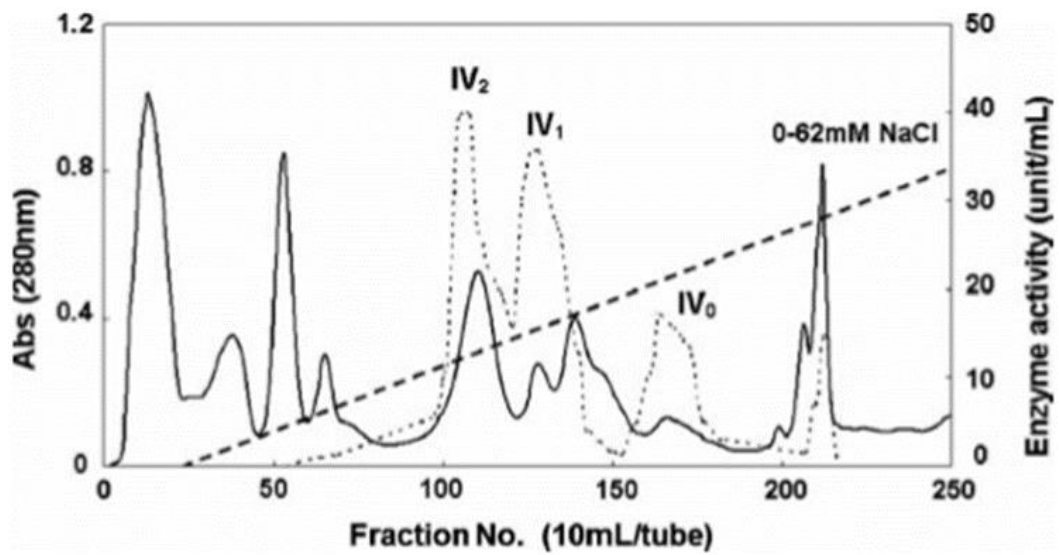


Fig. III-1 DE52 カラムクロマトグラフィー
 —, A_{280nm} ; ···, PG activity; - - -, NaCl conc.(0~62 mM)

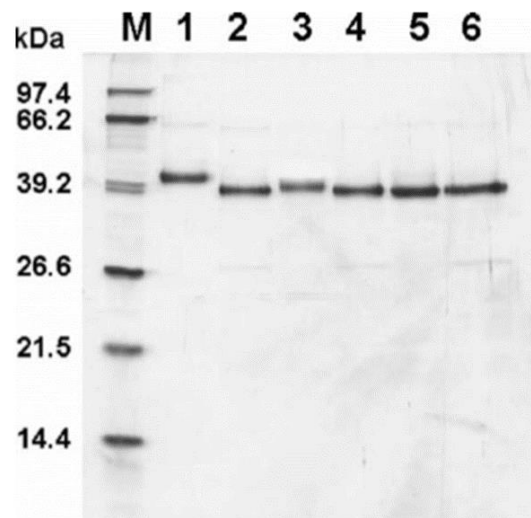


Fig. III-2 精製 rEndoPG IV の SDS-PAGE 分析
 M, 分子量マーカー; 1, rEndoPG IV₂; 2, rEndoPG IV₂ (EndoH 処理);
 3, rEndoPG IV₁; 4, rEndoPG IV₁ (EndoH 処理); 5, rEndoPG IV₀;
 6, EndoPG IV₀ (EndoH 処理)。EndoPG IV₂、IV₁ では EndoH 処理に
 より分子量低下が見られた。

Table. III-1 rEndoPG IVの精製

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Culture filtrate*	18824	20916	0.9	100	1.0
Ammonium sulfate Precipitation	12331	717	17.2	65.5	19.1
DE52 PG IV ₂	4716	34.6	136	25.1	151
PG IV ₁	2413	27.7	87.1	12.8	96.8
PG IV ₀	2438	22.7	107	13.0	119
Hydroxyapatite					
PG IV ₂	2028	5.1	398	10.8	442
PG IV ₁	1724	4.3	401	9.2	445
PG IV ₀	1560	3.8	411	8.3	456

*Culture filtrate 3.0 L.

III-3-2 rEndoPG IVの質量分析および糖鎖構造解析

MALDI-TOF-MSにより rEndoPG IV₀を分析した結果、m/z 35,099 のピークが検出されたことから、酵素の分子量は 35,098 Da であることが明らかとなった(Fig. III-3)。これはアミノ酸配列から算出された理論値 35,104 Da とほぼ同じ数値であった。この分析では他に、m/z 35,261 と 35,420 のピークが検出されている。それぞれの差が約 162 であることから、これらのピークは rEndoPG IV₀に何らかのヘキソース(Hexose)が 1 分子、または 2 分子付加されたものであると考えられる。よって rEndoPG IVは、O 結合型糖鎖による修飾も受けていると推察された。Native の EndoPG IVでは、O 結合型糖鎖による修飾は見られない。また分子量測定の結果から、rEndoPG IV₀は N結合型糖鎖を持たないことが明らかとなった。Native の EndoPG IVでは、糖鎖修飾について微小不均一性は見られるが、EndoPG IVa、IVb とともに N 結合型糖鎖を有している。Woosley らの報告の中で、*A. niger*を宿主として endoPG C を発現させた際には、O 結合型糖鎖による修飾が確認されている[43]。

次に rEndoPG IV₁の MALDI-TOF-MS 分析を行った結果、m/z 36,320 のシグナルが検出された。これは EndoPG IVの理論分子量(35,104 Da)に Hexose が 5 残基の糖鎖(GlcNAc₂+Hexose₅ : 1,216 Da)が付加された時の分子量を示している。また、162 刻みのマルチなピークとして検出されているが、これは O 結合型糖鎖と N 結合型糖鎖の微小不均一性によるものだと考えられる(Fig. III-4)。

EndoHにより rEndoPG IV₁の脱糖鎖を行った後に分子量測定を行った結果、m/z 35,303 のシグナルが検出された。これは EndoPG IVの理論分子量に GlcNAc が 1 残基付加した際とほぼ同じ数値を示している。さらに、Hexose が 2 残基まで付加していると考えられるシグナルも見られた(Fig. III-5)。

次に、rEndoPG IV₁から除去した糖鎖を回収して、MALDI-TOF-MS による分析を行った。その結果、m/z 1,054 から 1,875 まで、162 の差で複数のピークが見られた。これらの m/z 値は、GlcNAc₁+Hexose_{5~10}の分子量に相当する。よって、*A. oryzae*は Hexose を 5~10 残基を含む N 結合型糖鎖を組換え蛋白質に付加することが明らかとなった(Fig. III-6)。

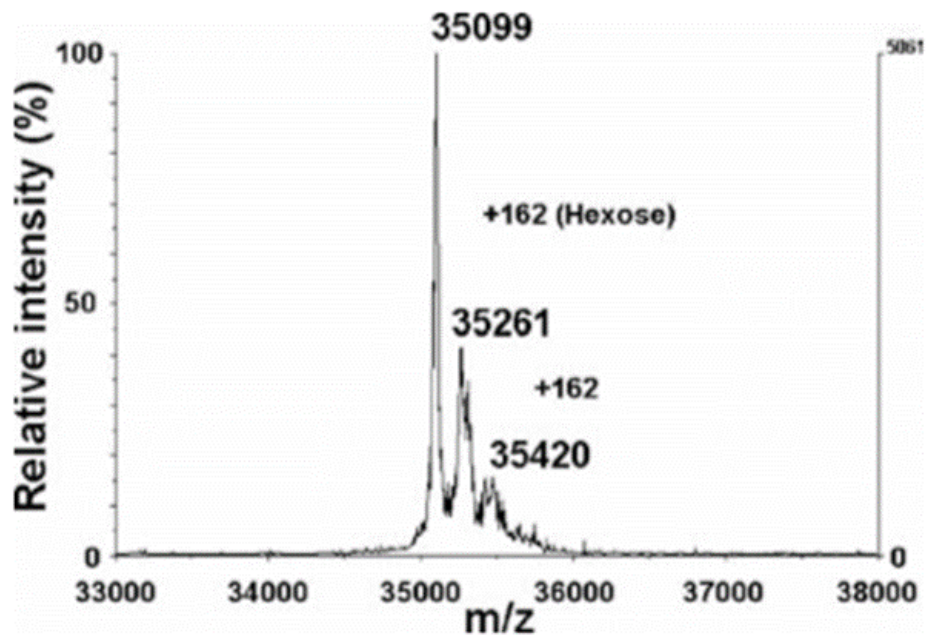


Fig. III-3 rEndoPG IV₀ の MALDI-TOF-MS 分析

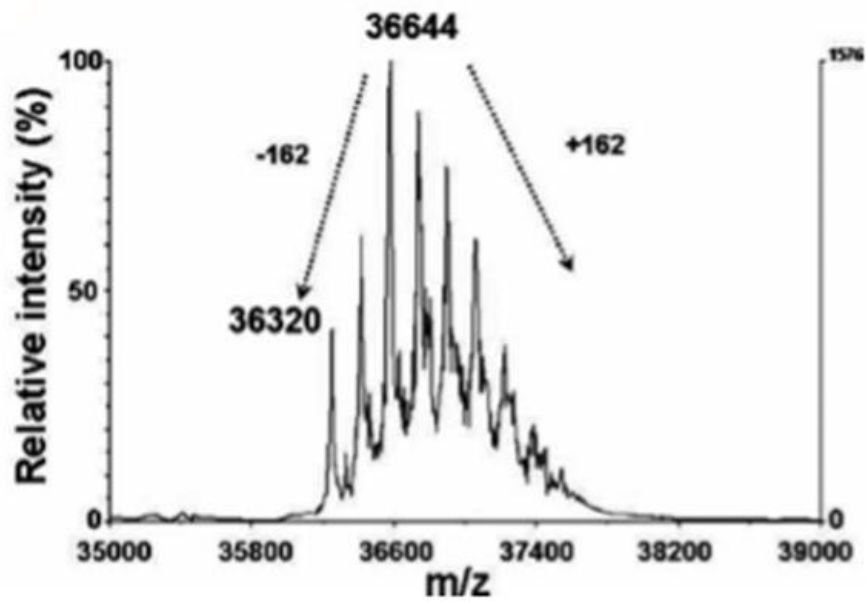


Fig. III-4 rEndoPG IV₁ の MALDI-TOF-MS 分析

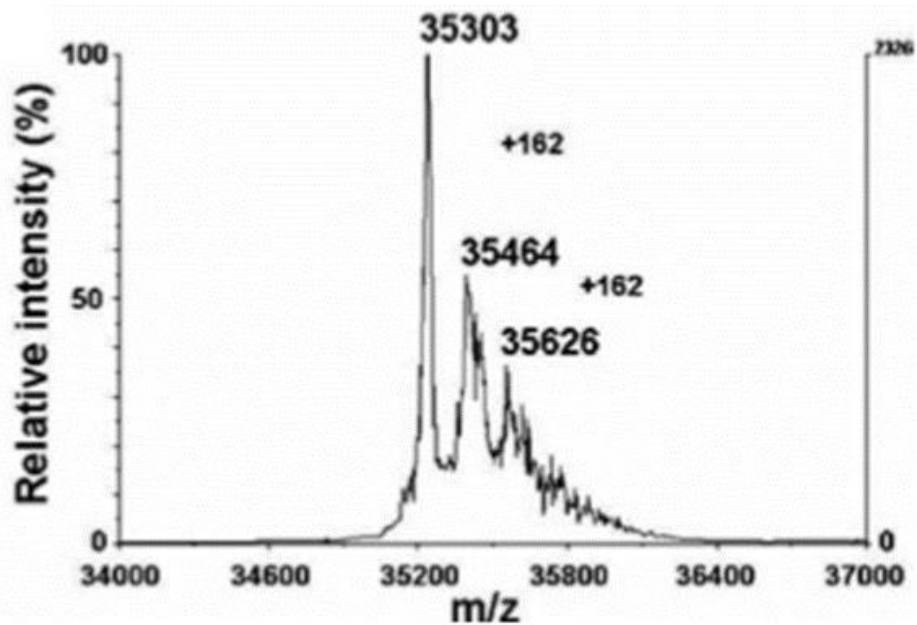


Fig. III-5 rEndoPG IV₁ の MALDI-TOF-MS 分析(EndoH 処理)
 Fig. III-3、III-4、III-5 の MALDI-TOF-MS 分析では、シナピン酸をマトリクスとして用いた。また、キャリブレーションにはアポミオグロビンとアルドラーゼを使用した。

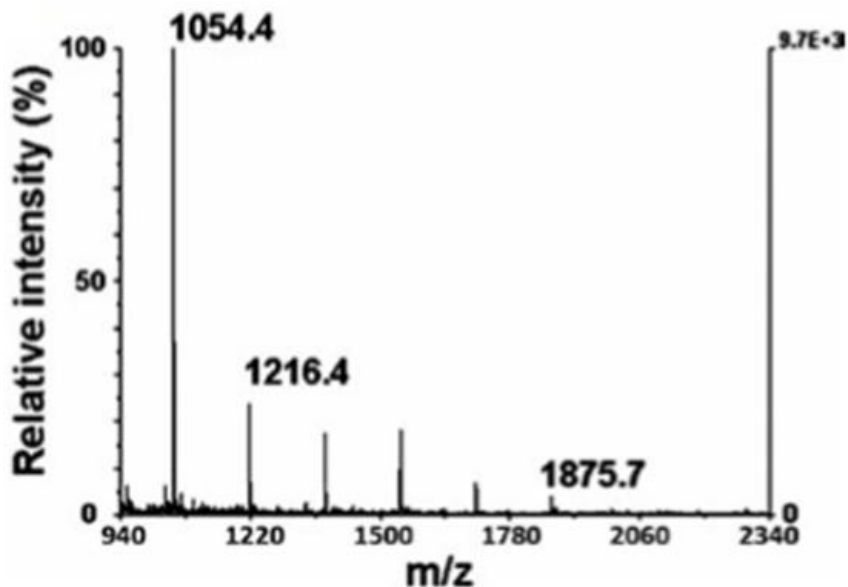


Fig. III-6 rEndoPG IV₁ より回収した糖鎖の MALDI-TOF-MS 分析
 糖鎖の分析には、マトリクスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を用いた。キャリブレーションにはブラジキンと ACTH fragment 18-39 を使用した。

さらに、イオンクロマトグラフィーにより糖鎖の構成糖分析を行った結果、ガラクトースとマンノースを含むことが明らかとなった。これらの結果は、*A. oryzae* が組換え酵素に付加する糖鎖に関して新規の情報となった。

rEndoPG IV₂についてもIV₁と同様の分析を行った。その結果、rEndoPG IV₂に付加されている *N* 結合型糖鎖は 2 本であると考えられた。糖鎖が 2 本である影響から、MS スペクトルはIV₁よりも複雑になったと考えられた(Fig. III-7)。

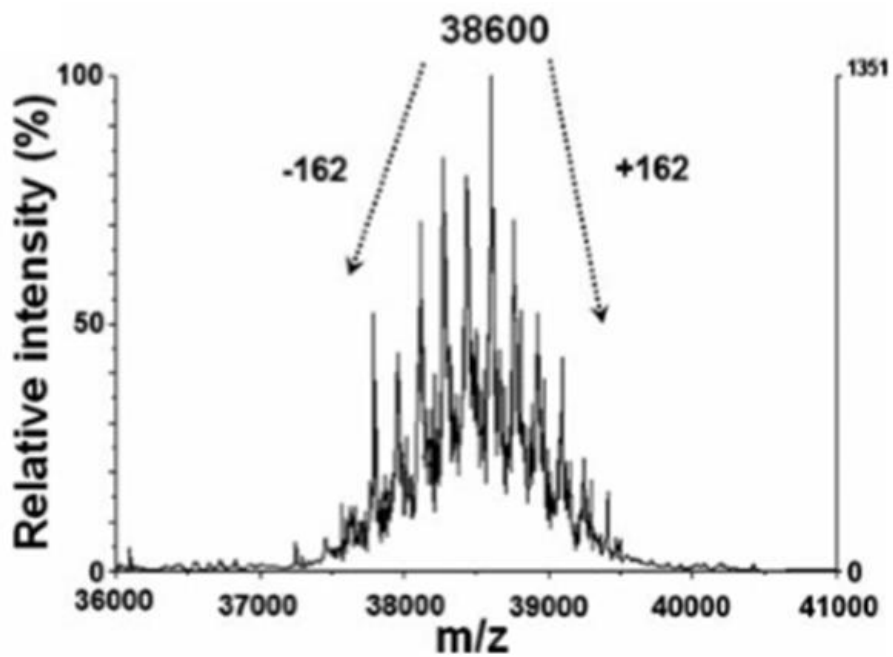


Fig. III-7 rEndoPG IV₂のMALDI-TOF-MS分析

このMALDI-TOF-MS分析では、シナピン酸をマトリクスとして用いた。

また、キャリブレーションにはアポミオグロビンとアルドラーゼを使用した。

III-3-3 rEndoPG IVの構造安定性

3種のrEndoPG IVについて、CDスペクトルを使用した熱変性曲線を作成した(Fig. III-8)。大木らが*E. coli*を宿主として発現・精製した組換えEndoPG IVの分析結果では2段階の変性が見られた[39]。これは、*P. pastoris*を宿主として用いた第1章-Iの結果(Fig. I-7, I-8)と同様の特徴であり、ジスルフィド結合の不完全体が原因であると考えられ、1段階目の変化は、熱安定性の低下した不完全体の変性を示している。

rEndoPG IV₀およびIV₁の*T_m*値はそれぞれ60°Cと59°Cであった。これは第1章-IIに示したNativeの酵素とほぼ同じ数値である。また、この実験で2段階の変化が見られないことから、*A. oryzae*を宿主とした場合では、*P. pastoris*を用いた際とは異なり、ジスルフィド結合が正しく形成されているものと考えられた。

一方、rEndoPG IV₂では、62°Cと80°Cの2ステップの変化が見られた。この理由については明らかとなっていないが、IV₂に付加された糖鎖がCDスペクトルに影響を与え、正確な測定ができなかった結果であると推察している。酵素活性を指標として耐熱性を調べた結果では、IV₀およびIV₁とほぼ同等の結果であったことから、rEndoPG IV_{0~2}の*T_m*値は本来類似した値であると考えられる。

第1章-IIIでは*A. oryzae*を宿主として得られた組換えEndoPG IVについて研究を行った。その結果、付加されるN結合型糖鎖はGlcNAc₂Hexose_{5~10}で、Hexoseにはガラクトースおよびマンノースを含むこと、またO結合型糖鎖による修飾があることを明らかにした。また、熱変性曲線を解析した結果から、*E. coli*や*P. pastoris*を宿主とした際に見られたジスルフィド結合の不完全体は含まれていないと考えられ、*A. oryzae*は比較的高いフォールディング能力を有した宿主であることが明らかとなった。

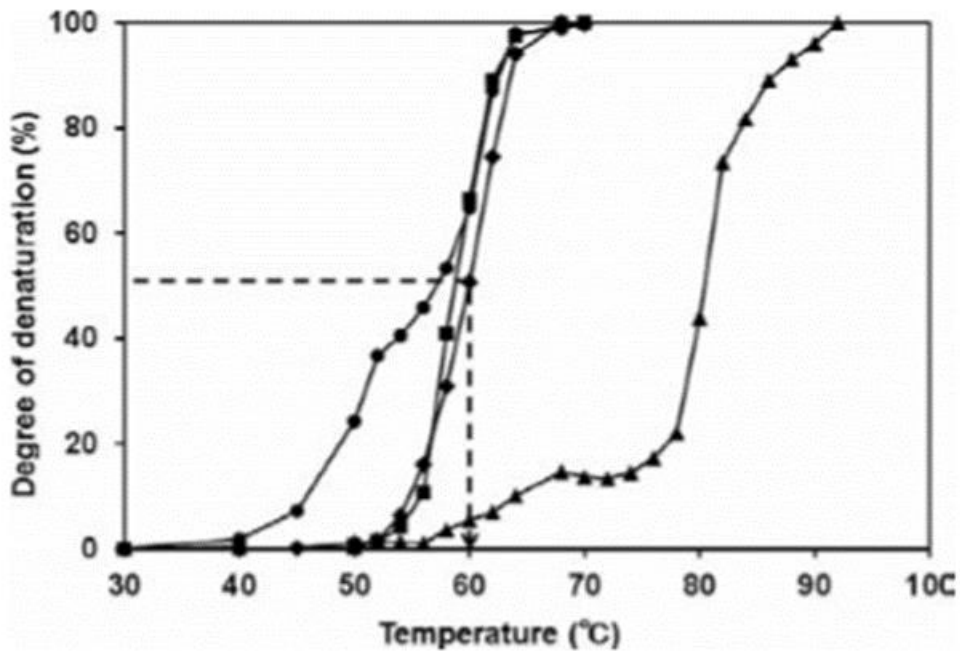


Fig. III-8 rEndoPGIVの熱変性曲線

◆, rEndoPG IV₀; ■, rEndoPG IV₁; ▲, rEndoPG IV₂; ●, EndoPG IV(大腸菌宿主、[39])

Fig. I-7と同様の方法で熱変性曲線を作成した。大腸菌を宿主とした EndoPG IVでは、ジスルフィド結合の不完全体が含まれる際の特徴である 2 段階の変性が見られる。T_m値は、IV₀:60°C、IV₁:59°Cで、Native とほぼ同じ数値であった。IV₂については、正確な測定が難しい状態であった。

IV、プロエンドポリガラクトナーゼ I の持つ

C 末端 44 残基の機能解析

IV-1 序論

cDNA クローニングの情報から、EndoPG I のアミノ酸配列の全長は 403 残基であり、N 末端 24 残基がシグナル配列であることが明らかにされている。また *S. purpureum* の培養ろ液から精製された EndoPG I と、クローニングにより明らかとなったアミノ酸配列を比較したところ、精製標品では C 末端に 44 アミノ酸残基の欠失があることが明らかとなっている[9, 10]。第 1 章 - IV では、この欠失した C 末端 44 残基に注目して行った研究について述べる。

S. purpureum は等電点の異なる 4 種の EndoPG I、II、III、IV を生産する。I は宮入ら[10, 11]、II、III は宇藤ら[AB549214, AB549215]、IV は著者ら[48]によりクローニングが行われ、それぞれアミノ酸配列が明らかにされているが、このような C 末端領域の欠失は EndoPG I にのみ見られる。また他の糸状菌由来の EndoPG について、mature 配列部分でおよそ 40~50% の相同性がある酵素[49-51]と比較しても、C 末端領域について相同性のある配列は見られない(Fig. IV-1)。Williams ら[52]が *Chondrostereum (Stereum) purpureum* の他の菌株から取得した EndoPG では、C 末端領域アミノ酸配列の類似した EndoPG が報告されている(Fig. IV-2)。

蛋白質の C 末端領域は、蛋白質の全体構造の安定化、生理活性の制御、細胞内および分泌など輸送に関係しているものなど様々な報告がなされており[53-55]、C 末端 44 残基に関する検討は EndoPG I の詳細な性質を明らかにする上で重要であると考えられた。また EndoPG I はリンゴ銀葉病菌の病徴発現物質として単離された経緯があり、本菌特有の C 末端配列は、植物病理的な視点からも興味深い。

本項では、C 末端 44 残基を持つ Pro-EndoPG I を、大腸菌を宿主とした発現系で取得し、その諸性質を調べた。

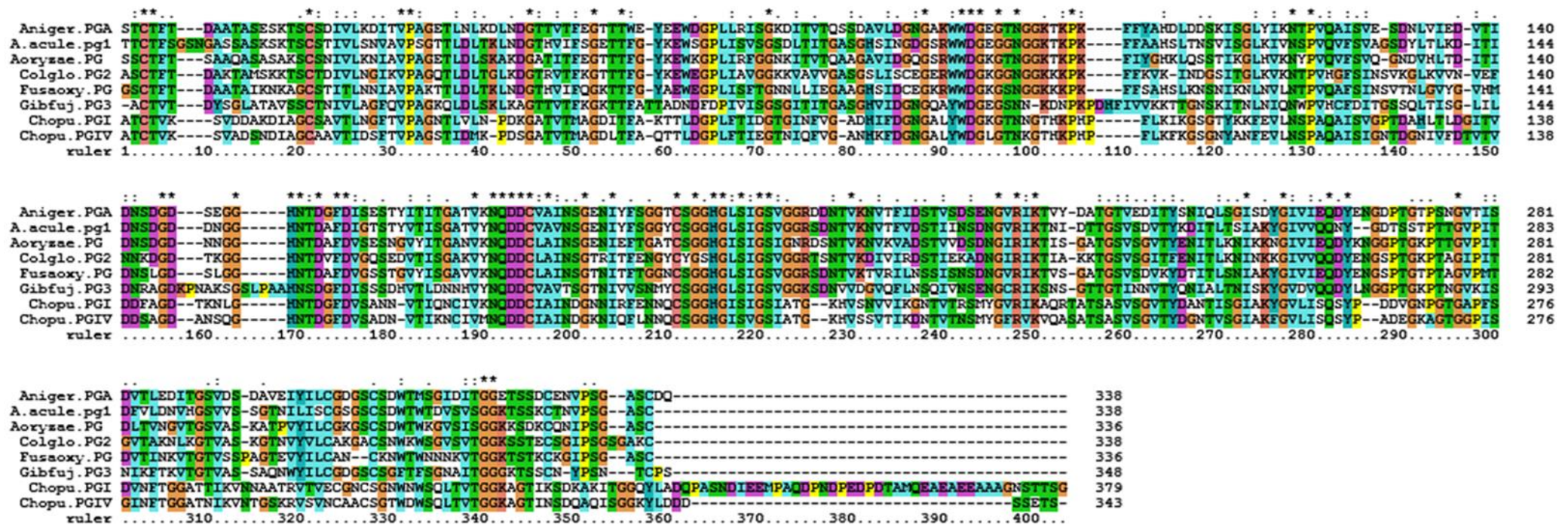


Fig. IV-1 糸状菌由来 EndoPG のアミノ酸配列比較

Aniger.PGA: *Aspergillus niger* 由来 [49], A.acule.PG1: *Aspergillus aculeatus* 由来[O74213], Aoryzae.PG: *Aspergillus oryzae* 由来 [Q2UHL4], Colglo.PG2: *Colletotrichum gloeosporioides* 由来[50], Fusaoxy.PG: *Fusarium oxysporum* 由来 [51], Gibfji: *Gibberella fujikuroi* 由来 [CAG27851], Chopu.PGI: *Chondrostereum purpureum* EndoPG I [10, 11], Chopu.PGIV: *Chondrostereum purpureum* EndoPG IV [48]. 他起源の EndoPG および同起源の EndoPG IV のアミノ酸配列を比較した。 *Stereum purpureum* EndoPG I でのみ、C 末端領域が長くなっている。

```

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
EndoPG44 ATCTVKSVDDAKDIAGCSAVILNGFTVPAGNLLVLPDKGATVMAGDIIFAKTLLDGPLFTIDGTGINFVGADHIFDGNALYWDGKGTNNGTHKPHPLKIKSGTYKKFEVLNSPAQAI SVGPTDAHLILDGIIVDDFAGDTKNLGH 150
C_PG ATCTVKSVDDAKDIAGCSAVILNAFTVPAGKLLVLPDKGATVMAGDIIFAKTLLDGPLFTIDGTSINFGADHKFDGNALYWDGLGTNNGTHKPHPLKIKSGTYKKFEVLNSPAQAI SVGPTDAHLIFDGIIVDDFAGDTKNLGH 150
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
EndoPG44 NTDGFDVSAANNVTIQNCIVKNQDDCIAINDGNNIRFENNQCSGGHGIIIGSIATGKHVSNVVIKGNVTIRSMYGVRIKARATASAVSGVTYDANTISGIKYGVLISQSYDDVGNPGTGAPFSDVNFTGGATTIKVNNAAIRVTVEC 300
C_PG NTDGFDVSAANDVTIQNCIVKNQDDCIAINDGKIRFENNQCSGGHGIIIGSIATGKHVSNVVIKGNVTIRSMYGIRIKARRKATSASVSGVTYDNTISGIKYGVLISQSYDDVGTPTGAPFSDVNFTGGATTIKVNTAAKRVTVEC 300
ruler .....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

*****:***:*****:*****:***** ** ** ..:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
EndoPG44 GNCSEGNWNSQLIVTGGKAGTIKSDKAKITGGQYLAI--LP--ANDIEEMPAQDPNDPEDPTAMQEAHAEHAAAGNSTTSG 379
C_PG GNCSEGNWNSKLVITGGKAGTIKSDKAKITGGTYLEDMDQPDGGEVPEEMPAQDPNDPEDPTA-QEAHAEHAAAGDPTPD 383
ruler .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....

```

Fig. IV-2 同起源 EndoPG とのアミノ酸配列比較

上段:Pro-EndoPG I のアミノ酸配列、下段:Williams らの報告[52]による PG 配列。両者では C 末端領域も合わせて高い相同性(94%)を示した。

IV-2 実験方法

IV-2-1 菌株、プラスミド、培養条件、プライマー

プラスミドの構築および増幅には *E. coli* JM109 株を使用し、培養には LB 培地を用いた。*E. coli* Origami 株は蛋白質発現の宿主として使用し、同じく LB 培地にて培養した。発現用プラスミドには pET11b を用いた。この研究で使用したプライマーはすべて、北海道システムサイエンス株式会社より購入した。

IV-2-2 Pro-EndoPG I および欠失変異体発現用プラスミドの構築

Pro-EndoPG I の cDNA 配列を、以下のプライマーを使用して増幅した。5'-GGGAATTCCCATATGGCTACTTGCACAGTCAAG-3' (*Nde*I)、5'-ATTAGGATCCTCAGTGATGATGATGGTGCCCGGAAGTAGTGGAGTT-3' (*Bam*HI)。これらのプライマーにより *Nde* I、*Bam*HI の制限酵素サイト、および 3'-末端側に 6×His タグの配列を導入した。約 1,200 bp の PCR 産物を *Nde*I、*Bam*HI で処理し、同じ両制限酵素で処理した pET11b とライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは、*E. coli* JM109 株に導入した。目的のプラスミドを持つコロニーは、アンピシリンを含む LB プレート上で選択した。作製したプラスミドの塩基配列は ABI PRISM 310 DNA sequencer (Applied Biosystems 社)により確認した。

mature-EndoPG I + C-terminal 38 residues (C-terminal 38 mutant; CT38)、CT34、CT32、CT29 の 4 種は、前述した *Nde*I サイトを持つプライマーと Table. IV-1 に示した各変異体に対応するプライマーを使用して同様に作成した。さらに、CT31、CT30、CT28 発現プラスミドは、CT32 プラスミドをテンプレートとして、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社)を使用して作成した。変異体作製に使用したプライマーは、Table. IV-1 にまとめた。

Table. IV-1 変異体作製に用いたプライマー

Mutant	プライマー名	プライマー配列 (5' ⇒ 3')
CT38	CT38-R	ATTAGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCCCTGCAGCAGCCTCTTC
CT34	CT34-R	ATTAGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCTCTTCTGCCTCAGCCTC
CT32	CT32-R	ATTAGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGTGCCTCAGCCTCTTGCAT
CT29	CT29-R	ATTAGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCTCTTGCATAGCAGTATC
CT31	CT31-F	GCTATGCAAGAGGCTGAGCATCATCATCATCAT
	CT31-R	ATGATGATGATGATGATGCTCAGCCTCTTGCATAGC
CT30	CT30-F	ACTGCTATGCAAGAGGCTCATCATCATCATCAT
	CT30-R	ATGATGATGATGATGATGAGCCTCTTGCATAGCAGT
CT28	CT28-F	CCAGATACTGCTATGCAACATCATCATCATCAT
	CT28-R	ATGATGATGATGATGATGTTGCATAGCAGTATCTGG

IV-2-3 Pro-EndoPG I の発現

E. coli Origami 株を発現用プラスミドにより形質転換した。形質転換体は、50 µg/mL のアンピシリンを含む LB プレートにより選択した。良好な生育が見られたコロニーを 50 µg/mL のアンピシリンを含む 10 mL の LB 培地を用い 37°C、130 rpm で一晩前培養した。2 mL の前培養液を新しい 100 mL の LB 培地に接種し、37°C、130 rpm の条件で振とう培養した。OD_{600nm} が 0.7 に達した時点で、終濃度 0.4 mM の IPTG を加えて発現を誘導し、培養温度を 20°C に下げた。

発現誘導して 25 時間培養後、遠心分離により菌体を回収した。菌体ペレットは、Lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) に懸濁し超音波破碎した後、20,000 g、10 min、4°C の遠心分離により、不溶性画分と可溶性画分に分離した。遠心分離により得られた可溶性画分について PG 活性を測定した。

IV-2-4 PG 活性測定、および蛋白量測定

I-2-5 記載の方法で行った。

IV-2-5 Pro-EndoPG I の精製

粗酵素液を Lysis buffer により平衡化した Ni-NTA カラム(φ 8 mm × 15 mm, Qiagen 社)に添加した。5 mL の Wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)を流してカラムを洗ったあと、4 mL の Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) により Pro-EndoPG I を溶出した。得られた PG サンプルは脱塩および凍結乾燥を行った後、-20°C で保存した。

IV-2-6 SDS-PAGE とウエスタンブロット

I-2-6 記載の方法で行った。SDS-PAGE には Promega 社の分子量マーカーを使用した。ウエスタンブロットでは 1 次抗体として抗 EndoPG I ポリクロナール抗体[10]または抗 His-tag 抗体 (Roche 社)を使用し、2 次抗体として Anti-rabbit-IgG (Vector 社)または Anti-mouse-IgG (Vector 社)を使用した。

IV-2-7 プロテアーゼによる活性化試験

V8 プロテアーゼ[56]およびカルボキシペプチダーゼ Y(CPaseY, [57])を使用して実験を行った。脱塩処理した精製後の不活性型 EndoPG I サンプル (50 µg) を 50 µL の蒸留水に溶解した。そこに 50 µL の 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) および 4 U の V8 プロテアーゼを加え、25°C にてインキュベートした。インキュベート開始から 5 時間後にサンプリングし、PG 活性の変化を調べた。CPaseY は、0.1 M 酢酸ナトリウム buffer (pH 5.0) 中で、30 °C、5 時間反応させた。

IV-2-8 MALDI-TOF-MS 分析

I-2-7 記載の方法で行った。

IV-2-9 リンゴ苗木への注入実験

Brooks らの方法を参考とし、一部を改変して実験を行った[2]。リンゴの苗木 (品種：ふじ) の幹にドリルで直径 4 mm の穴を開けた。そこに同じ径のガラス管を差し込んで固定した。そのガラス管内に精製後の Pro-EndoPG I (50 µg/mL 蒸留水) を 1 mL 流し込み、苗木に注入した。注入後、2 週間観察した。

IV-3 実験結果

IV-3-1 Pro-EndoPG I の発現と精製

S. purpureum 由来 EndoPG I を C 末端 44 残基を含む Pro-EndoPG I の状態で大腸菌を宿主に発現させた。培養した大腸菌を遠心分離により集菌し、超音波破碎による抽出処理を行って粗酵素液を取得した。粗酵素液に見られた PG 活性は非常に微弱で、培養液 1 mL あたりに換算すると 0.25 unit であった。Pro-EndoPG I に付加した 6×His タグを利用し、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。その結果、Pro-EndoPG I は電気泳動的に均一に精製され、その分子量は mature-EndoPG I よりも明らかに大きいことが分かった(Fig. IV-3)。SDS-PAGE で使用している mature-EndoPG I は、以前までの研究で大腸菌を宿主として発現・精製したもので、His タグは付加されていない[16]。また、抗 His-tag 抗体および抗 EndoPG 抗体を使用したウェスタンブロットングでは、Pro-EndoPG I は両方の抗体に反応する結果となった(Fig. IV-3)。6×His タグは、Pro-EndoPG I の C 末端側に付加されるように設計しているため、Pro-EndoPG I は C 末端 44 残基を保持した状態で得られたと判断した。

次に、精製された Pro-EndoPG I について活性測定を行ったが、PG 活性は確認されなかった。しかしながら、精製操作前の粗酵素液には確かに PG 活性が検出されている。このことから、精製前の粗酵素液についてウェスタンブロット分析を行った。その結果、抗 EndoPG 抗体を使用した場合で、抗 His-tag 抗体を使用した場合では検出されないバンドが確認された。このバンドは、Pro-EndoPG I よりも低分子量側に位置しており、また抗 His-tag 抗体に反応しないことから C 末端側で何らかの分解を受けて、分子量が低下していると考えられた(Fig. IV-4)。

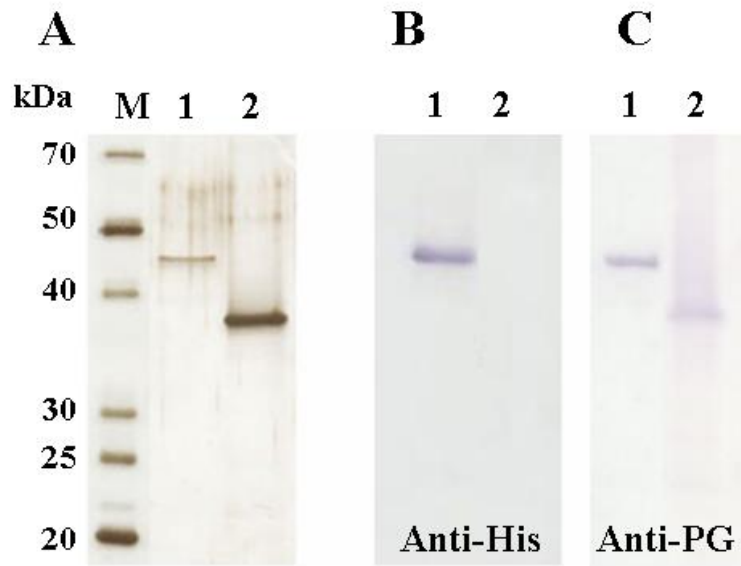


Fig. IV-3 Pro-EndoPG I の Ni アフィニティ-カラムによる精製
M, 分子量マーカー、1, 精製 Pro-EndoPG I、2, mature-EndoPG I
(A)SDS-PAGE 分析、(B)一次抗体に抗 His-tag 抗体を使用したウエスタンブロット、
(C)一次抗体に抗 EndoPG 抗体を使用したウエスタンブロット。

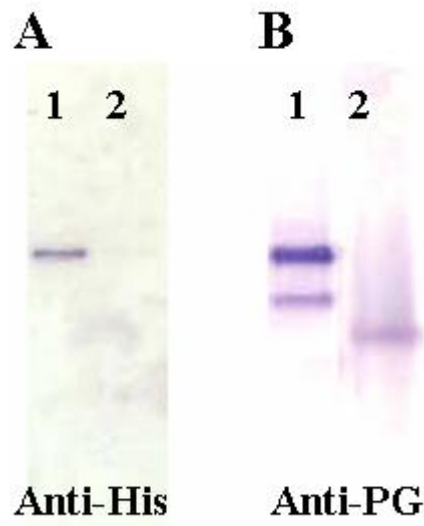


Fig. IV-4 粗酵素液のウエスタンブロッティング分析
M, 分子量マーカー、1, 粗酵素液、2, mature-EndoPG I
(A)一次抗体に抗 His-tag 抗体を使用したウエスタンブロット
(B)一次抗体に抗 EndoPG 抗体を使用したウエスタンブロット

IV-3-2 プロテアーゼを使用した Pro-EndoPG I の活性化

IV-3-1の結果から、Pro-EndoPG IはC末端領域で何らかの分解を受けて分子量が低下し、かつPG活性を示した可能性が考えられた。そのため、市販のプロテアーゼであるV8プロテアーゼおよびCPaseYを使用し、Pro-EndoPG Iの活性化を試みた。

まずV8プロテアーゼを作用させた場合では、Pro-EndoPG Iの活性化が確認された。この時の蛋白質比活性は380 U/mgであった。V8プロテアーゼ処理後のサンプルについて、同様にSDS-PAGEおよびウエスタンブロットニングにより分析した結果、抗EndoPG抗体を使用した場合で、抗His-tag抗体には反応しない2本のバンドが検出された(Fig. IV-5)。これらバンドは、いずれもPro-EndoPG Iよりも低分子量側に見られた。以上の結果から、Pro-EndoPG Iは自己のC末端配列により不活性化されており、その配列をプロテアーゼで分解することで活性化することが示された。

続いて、V8プロテアーゼ処理後に見られた2本のバンドについて、MALDI-TOF-MSにより分子量を調べた結果、それぞれm/z 35,787、m/z 37,770のシグナルが検出された(Fig. IV-6)。この分析で得られた分子量値は、Pro-EndoPG IのE346およびE364の位置で分解を受けた際の分子量に相当する。これは、44残基のうちそれぞれ33残基および15残基分をV8プロテアーゼ処理により除去したことになる。

一方、CPaseYを用いた試験では、Pro-EndoPG Iの活性化は見られなかった。SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析を行った結果、CPaseY処理後では抗His-tag抗体で検出されないことから、C末端側で分解を受けてHisタグを失っていることが分かった。しかしながら、抗EndoPG抗体で検出されたバンドは、V8プロテアーゼ処理の結果とは異なり、分子量の顕著な低下は見られなかった(Fig. IV-7)。

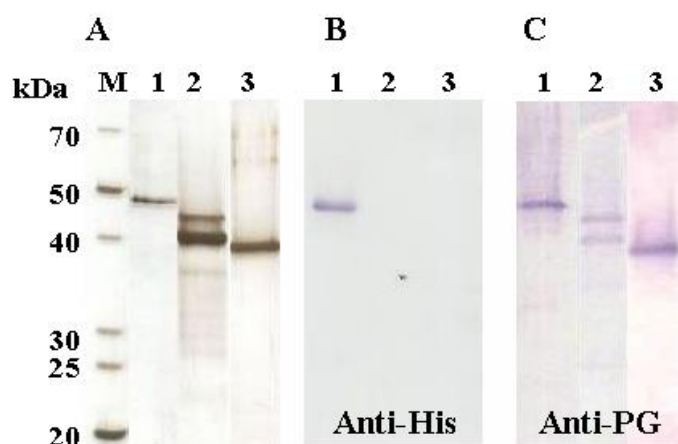


Fig. IV-5 V8 プロテアーゼ処理後 Pro-EndoPG I の分析

M, 分子量マーカー、1, Pro-EndoPG I、2, V8 プロテアーゼ処理後、
3, mature-EndoPG I

(A)SDS-PAGE 分析、(B)一次抗体に抗 His-tag 抗体を使用したウエスタン
ブロット、(C)一次抗体に抗 EndoPG 抗体を使用したウエスタンブロット

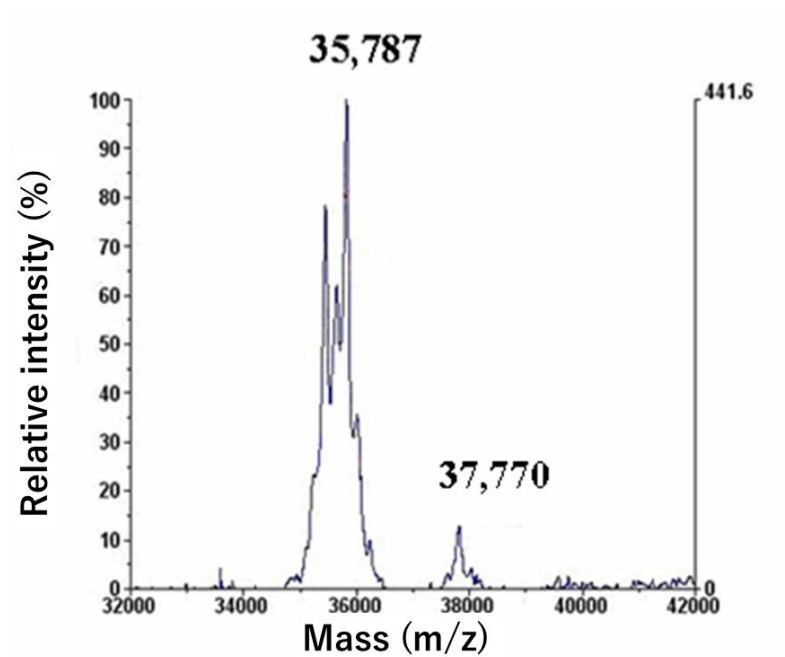


Fig. IV-6 V8 プロテアーゼ処理後 Pro-EndoPG I の MALDI-TOF-MS 分析
マトリクスとしてシナピン酸を用いた。キャリブレーションにはアポミオグロビンとアルド
ラーゼを使用した。

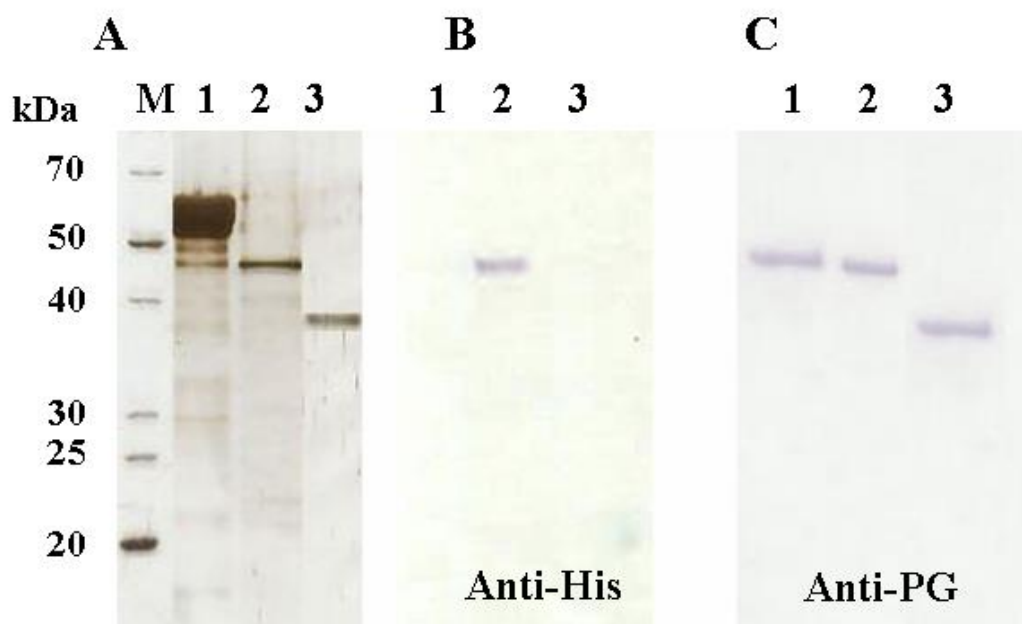


Fig. IV-7 CPaseY 処理後 Pro-EndoPG I の分析

M, 分子量マーカー、1, CPaseY 処理後、2, Pro-EndoPG I、3, mature-EndoPG I
 (A)SDS-PAGE 分析、(B)一次抗体に抗 His-tag 抗体を使用したウエスタンブロット、
 (C)一次抗体に抗 EndoPG 抗体を使用したウエスタンブロット。

IV-3-3 自己不活性化に関連するアミノ酸残基の特定

C末端44残基の中で、自己不活性化に重要な役割を果たすアミノ酸残基を特定するため、C末端に付加する配列を短くした変異体を作製した。変異体は、Pro-EndoPG IのC末端44残基のうち、38残基を有するもの(CT38)、CT34、CT32、CT31、CT30、CT29、CT28の7種類を作製し、それぞれNiアフィニティーカラムにより精製を行った後、酵素の比活性を調べた(Fig. IV-8)。

その結果、CT38、CT34、CT32ではPG活性は見られなかったが、CT31、CT30、CT29、CT28ではPG活性が確認された。CT31に見られた活性は非常に微弱であったがCT30、CT29の比活性はおよそ40 U/mgであった。また、CT28ではさらに強い活性が見られ、比活性は155 U/mgであった(Table. IV-2)。

活性の大きな向上が見られたCT31からCT30の変化ではE366を、またCT29からCT28ではE364を欠失している。以上の結果から、E366およびE364は不活性化に重要な役割を果たすアミノ酸残基であることが分かった。

IV-3-4 Pro-EndoPG Iによる銀葉症状誘導

精製したPro-EndoPG Iを、リンゴの苗木に注入する試験を行った。注入してから約2週間後に観察した結果、mature-EndoPG Iを注入した際と同様の銀葉症状が確認された。症状は上側の葉でより強く発現した(Fig. IV-9)。

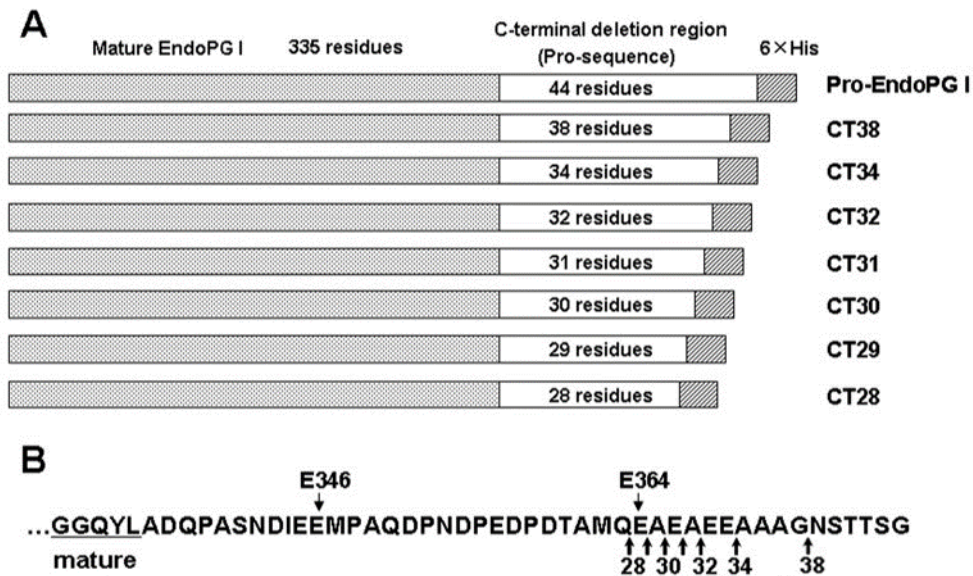


Fig. IV-8 Pro-EndoPG I の C 末端欠失変異体の作製

(A) C 末端欠失変異体の模式図。CT(C-terminal)28~38 の値は、C 末端 44 残基のうち何残基を有しているかを示している。(B) C 末端 44 アミノ酸残基配列。作製した変異体の C 末端位置を矢印と数値で示した。また、V8 プロテアーゼ処理後の質量分析で重要と考えられた E346 と E364 の位置を示した。下線部は mature 部分の C 末端 5 残基配列を示した。

Table. IV-2 C 末端配列欠失変異体の比活性

酵素	比活性 (U/mg)
Pro-EndoPG I	N.D.
CT38	N.D.
CT34	N.D.
CT32	N.D.
CT31	2.5
CT30	42
CT29	38
CT28	155
mature-EndoPG I	450

N.D. :not detected

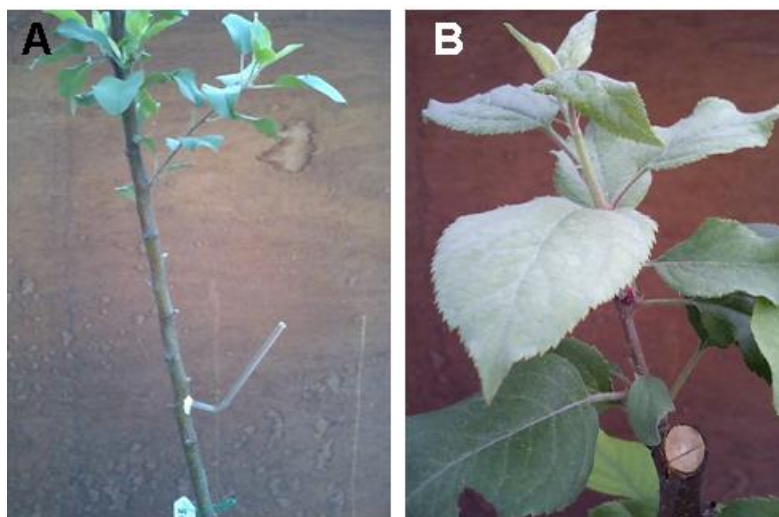


Fig. IV-9 Pro-EndoPG I による銀葉症状の発現

(A) リンゴの苗木の幹にドリルで直径 4 mm の穴を開けガラス管を差し込んで固定し、そこからサンプルを注入した。(B) 苗木上部で、より顕著な銀葉症状が確認された。

IV-4 考察

S. purpureum 由来 EndoPG I を、C 末端配列 44 残基を含む Pro-EndoPG I の状態で大腸菌を宿主として発現させた。粗酵素液に見られた PG 活性は、培養液 1 mL 当りに換算すると 0.25 U であった。mature-EndoPG I を同様に発現させると培養液 1 mL 当たり最大 3.7 U の活性が得られる。この結果と比較するとおよそ 15 分の 1 の値であり、微弱な活性値であると言える。

次に、Ni アフィニティーカラムにより Pro-EndoPG I を電気泳動的に均一な状態に精製した(Fig. IV-3)。この精製 Pro-EndoPG I には PG 活性が認められなかった。このことから、C 末端 44 残基の影響で、酵素が不活性化されていることが示唆された。一方で、精製操作前の粗酵素液には PG 活性が検出されていることから、ウエスタンブロットにより粗酵素液の分析を行った(Fig. IV-4)。その結果、抗 EndoPG 抗体に反応する蛋白質が 2 本のバンドとして検出された。このうち、低分子側の蛋白質は抗 His-tag 抗体には反応しなかった。この結果から、C 末端側において菌体内に存在するプロテアーゼなどの分解作用を受け、分子量が低下していると推察された。

粗酵素液に見られた弱い PG 活性は、この分子量の低下した EndoPG によるものだと予想し、市販プロテアーゼによる活性化試験を行った。44 残基部分に酸性アミノ酸が多く存在している(13 残基)ことから、まず V8 プロテアーゼを選択した。Pro-EndoPG I に V8 プロテアーゼを作用させた後に活性測定を行った結果、PG 活性が確認された。この時の比活性は 380 U/mg であり、これは mature-EndoPG I (450 U/mg)と比較すると 85%程度の値であったが、V8 プロテアーゼを加えた状態での測定であるため、正確な比較はできない。このことから、活性化には特殊なプロテアーゼによる分解は必要なく、市販のプロテアーゼで容易に活性化が可能であった。また SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析の結果から、Pro-EndoPG I の C 末端領域により酵素が不活性化されていることが示された(Fig. IV-5)。

V8 プロテアーゼ処理後のサンプルについて MALDI-TOF-MS 分析を行った結果、 m/z 35,787 および m/z 37,770 という 2 つのスペクトルが得られた(Fig. IV-6)。この結果は、V8 プロテアーゼがほぼ一定の位置で作用していることを示

しており、構造的に V8 プロテアーゼの作用を受けやすい箇所があると考えられた。一方、CPaseY を使用した試験では、His タグ部分の分解は確認されたが、PG 活性を確認することはできなかった(Fig. IV-7)。V8 プロテアーゼがある程度定まった位置に作用している点と考え合わせると、C 末端領域は特定の構造を持っており、立体的な理由からプロテアーゼ分解に対する耐性に差があるものと考えられる。

V8 プロテアーゼ処理後の 2 つの蛋白質について正確な量比は不明であるが、比活性から考えると、両方の蛋白質が活性を有していると推察される。従って、C 末端領域 44 残基の中でも E364 より C 末端側の領域が不活性化に関与していると考えられた。そのため C 末端領域を徐々に欠失させた変異酵素を発現させ、酵素の不活性化に関わるアミノ酸残基の特定を試みた。Fig. IV-8 に示した 7 種類の変異体を発現・精製して比活性を測定した結果、E364、E366 の 2 残基が PG の不活性化において特に重要な残基であると結論した (Fig. IV-8、Table. IV-2)。

CT28 変異体の比活性は、mature-EndoPG I に比べて 30%程度と低い値であった。よって、特に重要なグルタミン酸 2 残基の他にも、PG 活性を抑制する要因が C 末端領域に存在していることが予想される。C 末端プロ配列等により活性が阻害される現象は、プロテアーゼなどでは良く知られている [58-60]。しかし本研究で取り上げた、エンドポリガラクトナーゼを始めとした糖質加水分解酵素で、このような現象について報告はない。

最後に、不活性である Pro-EndoPG I をリンゴの苗木に注入する実験を行った結果、mature-EndoPG I を注入した際と同様の銀葉症状が確認された(Fig. IV-9)。この結果から、Pro-EndoPG I は植物体内で活性化され、病徴を発現したのと考えられる。これは本実験で示した V8 プロテアーゼ処理による活性化と類似して、植物体内に存在する何らかのプロテアーゼにより活性化が起こったものと予想される。植物体内で mature-EndoPG I と同等の比活性を示す状態に活性化されたかは不明であるが、銀葉症状を発現するには十分な分解(活性化)を受けたと推察できる。自然界において、銀葉病菌(*Stereum purpureum*)が EndoPG I を不活性化することに、どのような利点があるのかなど、微生物の進化や植物病理的な視点も含め、非常に興味深い情報を得ることができた。

第 2 章

Geobacillus thermoglucosidasius 由来

Oligo-1,6-glucosidase に関する研究

2-1 緒言

澱粉からグルコースを製造する糖化工業では、副産物としてイソマルトースが産生されることが知られている。この工程でグルコースは 97%以上の純度で得られるが、残りの数%は副産物として除去されるため、これがグルコースの収率が低下する原因の一つとされている。数値としては少なく見えるが、年間に数百トン、数千トンを製造していく上では、無視できない目減りであり、このロスを抑えることは産業的に価値がある。

oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10)は、 α -1,6-グルコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素で、GH ファミリー13 に分類されている。oligo-1,6-glucosidase はイソマルターゼとしても知られており、糖化工業で生じる副産物のイソマルトースを回収し、分解・再利用することでグルコースの収率を改善できる可能性がある。

しかしながら、イソマルターゼを糖化工業に利用するためには、いくつかの課題が考えられた。第一に、糖化工程は 60°C付近の比較的高温行われるため、耐熱性が優れていることが望ましい。また第二に、イソマルターゼはその反応生成物であるグルコースにより阻害を受ける[61, 62]ことから、効率的な酵素活性を得るために高いグルコース耐性を有することが必要であると考えられた。近年、 β -グルコシダーゼについては、バイオエタノール関連の研究に付随してグルコース耐性に関する報告も多く見られる[63, 64]が、 α -グルコシダーゼについての情報はほとんど見られない。

イソマルターゼについて報告されている情報として、*Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase では、詳細な立体構造が明らかとなっている[65, 66]。また、酵母由来のイソマルターゼについても詳細な立体構造、基質認識機構が明らかとなっている[67, 68]。

本研究では、耐熱性イソマルターゼとして報告されている *Geobacillus themoglucosidasius* 由来イソマルターゼ (GTAGL, [69, 70])に注目し、本酵素に部位特異的変異を導入して、グルコース耐性の向上を試みた。

2-2 実験方法

2-2-1 菌株、プラスミド、培養条件

GTAGL の遺伝子は *G. themoglucosidasius* DSM2524 よりゲノムを抽出し、PCR により増幅することで取得した。プラスミド構築と増幅には *E. coli* DH5 α 株を使用した。大腸菌は LB 培地で培養を行った。組換え GTAGL 発現の宿主には *Bacillus subtilis* ISW1214 株(タカラバイオ社)を使用した。この菌株は、LB 培地または 2xL-Mal 培地[71]を使用した。組換え酵素発現用のプラスミドには、pHY300PLK (タカラバイオ社)を使用した。またプライマーは理科研(株)DNA 合成サービス(StarOligo)を利用して取得した。

2-2-2 GTAGL 発現用プラスミドの構築および変異体の作製

GTAGL 発現用ベクター pHY300PLK/*gtagl* は以下のように調製した。*G. themoglucosidasius* DSM2524 よりゲノムを抽出し、これを鋳型とした PCR により *gtagl* 遺伝子を増幅した。プライマーには、5'-ATATGAGCTCTTGTGATGGTTTAAATGTAAGCGTGGAGGTGAGAAACATGGAAAGAGTATGGTGGAAA-3' (*Sac* I) と 5'-ATATTCTAGATTAGTGATGATGATGATGGTGTGGCAAACGGATTTTATA-3' (*Xba* I)を使用した。この PCR により、*gtagl* 遺伝子の 5'側に、*B. subtilis* のアミラーゼプロモーターおよび *gtagl* の SD 配列を導入している。また 3'側には、6 \times His タグの配列を導入した。

同様に pHY300PLK の必要部分を PCR により増幅した。プライマーには、5'-ATATTCTAGAAGCTTCAACTTTGCACTT-3' (*Xba* I)と 5'-ATATGAGCTCTATCAAACAACCTTGAATTCTGGTCGGACAAACAC-3' (*Sac* I)を使用した。PCR により増幅した約 1,700bp の *gtagl*配列と pHY300PLK を *Sac* I と *Xba* I で処理後ライゲーションを行い、目的のプラスミドを作製した。

部位特定的変異導入は、pHY300PLK/*gtagl* を鋳型とした PCR 法により行った。この PCR 反応には、PrimeStar mutagenesis Kit (タカラバイオ社)を使用した。また、使用したプライマーは Table. 2-1 にまとめた。

Table. 2-1 部位特異的変異導入に用いたプライマー

変異	プライマー名	プライマー配列(5' ⇒ 3')
M203W	M203W-F	ATTAATTGGATTTCCAAAGTGCCGGAA
	M203W-R	GGAAATCCAATTAATGACATCCATGCG
Q216E	Q216E-F	GAGCCGGAAAGCGGGAAAAAATACGCG
	Q216E-R	CCCGCTTTCCGGCTCACCATCCGGCAA
G259E	G259E-F	ACGCCGGAGGTCACACCAAAGAGGGA
	G259E-R	TGTGACCTCCGGCGTTTCTCCAACCGT
G259R	G259R-F	ACGCCGCGTGTACACCAAAGAGGGA
	G259R-R	TGTGACACGCGGCGTTTCTCCAACCGT
G292E	G292E-F	GGGCCTGAGGGAAAATGGGATATT
	G292E-R	TTTTCCCTCAGGCCCTGAATCCAAATC
G292I	G292I-F	GGGCCTATCGGAAAATGGGATATT
	G292I-R	TTTTCCGATAGGCCCTGAATCCAAATC
R298E	R298E-F	GATATTGAGCCATGGTCGTTGGCAGAT
	R298E-R	CCATGGCTCAATATCCCATTTTCCGCC
R298I	R298I-F	GATATTATTCCATGGTCGTTGGCAGAT
	R298I-R	CCATGGAATAATATCCCATTTTCCGCC

2-2-3 GTAGL の発現と精製

宿主の *B. subtilis* ISW1214 株に pHY300PLK/*gtagl* をエレクトロポレーション法により導入して形質転換を行った。形質転換体は 15 µg/mL のテトラサイクリンを含む LB プレート上で選択した。生育の良いコロニーを 2xL-Mal 液体培地[71]で、30°C、210 rpm の条件で、3 日間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、100 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)に懸濁した。懸濁液を超音波処理することで菌体を破碎し、次いで遠心分離により可溶性画分の酵素を回収した。

組換え GTAGL は C 末端に 6×His タグが付加された状態であるため、第 1 章 IV-2-5 記載の方法に従い、Ni アフィニティーカラムを使用した精製を行った。

2-2-4 SDS-PAGE 分析

I-2-6 記載の方法に従って行った。ATTO 製の 15%ゲルおよびタカラバイオ社製の分子量マーカーを使用した。また CBB 染色を行い、蛋白質を可視化した。

2-2-5 GTAGL 活性測定および蛋白質量測定

活性測定は、100 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)中で 2.5% イソマルトースと酵素を含む反応液(20 µL)を調製し、60°Cで一定時間反応させ、基質を分解して遊離したグルコースを Glucose CII Test Kit (和光純薬社)で検出する方法で測定した。1 U は、1 分間に 1 µmol のグルコースを生じさせる酵素活性と定義した。蛋白質濃度は、BSA を標準蛋白質とした Lowry 法[72]により測定した。

2-2-6 GTAGL および変異体のグルコース耐性試験

基質を 1% イソマルトースとし、2% グルコース存在下で酵素反応を行った。反応には終濃度 0.5 U/mL の酵素を使用した。この反応液を 60°Cに保温し、継続的にサンプリングして CRBOsep CHO-620 カラム(Transgenomic 社)を使用した HPLC 分析を行った。サンプリングと分析は、酵素反応が停止するまで行った。グルコース耐性は、酵素反応がそれ以上進まなくなった時のグルコース濃

度と定義した。例えば 0.1%のイソマルトースのみを分解して反応が停止した場合、反応系に初めから加えられていた 2%のグルコースと合計し、グルコース耐性は 2.1%とした。

2-2-7 基質特異性の確認

2%のグルコース、マルトース、イソマルトース、それぞれを基質として、60°Cで 8 時間反応させ、TLC 分析を行った。シリカゲルプレート(メルク社)を使用し、展開溶媒には 2-プロパノール：*n*-ブタノール：水=10：5：4 (v/v/v)を用いた。展開を終了したプレートを乾燥させた後、アンスロン・硫酸試薬[73]を吹きかけ、100°Cでおよそ 15 分間加熱した。

2-2-8 GTAGL および qGTAGL の反応速度論的比較

基質濃度を 2.5%、1.25%、0.25%、0.125%、0.025%とした条件で活性測定を行い、縦軸を $1/v$ 、横軸を $1/[S]$ としたラインウェーバー・バークプロットのグラフを作成した。グラフから、 K_m 、 V_{max} を求め、 K_{cat}/K_m の値を算出した。

2-3 実験結果

2-3-1 組換え GTAGL の発現と精製

形質転換した *B. subtilis* の菌体破砕液について、予備的に AGL 活性を調べたところ、目的とする酵素活性が確認されたことから、Ni アフィニティーカラムを使用した GTAGL の精製を行った。精製の結果、GTAGL は電気泳動的に均一に精製され、その分子量は SDS-PAGE にて約 67 kDa と示された(Fig. 2-1)。これはアミノ酸配列から求めた理論値とほぼ等しい値である。また精製酵素の比活性は 86 U/mg であった(Table. 2-2)。

2-3-2 組換え GTAGL の耐熱性、最適温度、グルコース耐性

精製された組換え GTAGL について、耐熱性および最適温度を調べた(Fig. 2-2)。耐熱性は、60°Cまで 90%程度の活性を維持し、その後 80°C処理でほとんどの活性を失う結果となった。また最適温度は 60°Cを示した。これらの結果は、以前に報告されている Native の GTAGL(元菌が生産する酵素)の性質とほぼ同じであった[69]。

また、GTAGL のグルコース耐性を調べた結果、反応系に 2.2%のグルコースが存在する時に反応が強く阻害されることが分かり、グルコース耐性は 2.2%と求められた。



Fig. 2-1 精製 GTAGL および qGTAGL の SDS-PAGE 分析
M, 分子量マーカー、1, 精製 GTAGL、2, 精製 qGTAGL

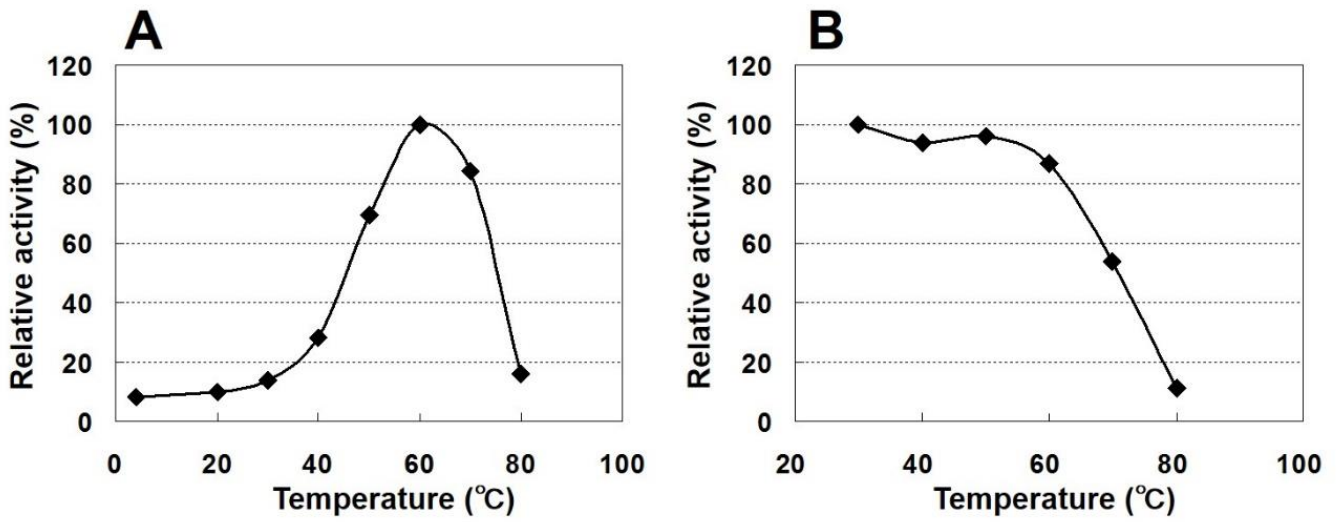


Fig. 2-2 組換え GTAGL の最適温度および耐熱性

(A)最適温度：4°C～80°Cで活性測定をを行い、最大の活性を示した 60°Cでの値を 100%とした相対活性のグラフを作成した。(B)耐熱性：30、40、50、60、70、80°Cで 10 分間処理後に 60°Cにて活性測定を行い、30°Cでの値を 100%とした場合の相対値としてグラフに示した。

2-3-3 変異 GTAGL の作製とグルコース耐性分析

変異体作製にあたり、Swiss-model を利用した GTAGL の立体構造予測を行った[74]。モデリングのテンプレートには *B. cereus* oligo-1,6-glucosidase (PDB code: 1UOK) を選択した(Fig. 2-3)。

予測された構造をもとに、M203W、Q216E、G259E、G259R、G292E、G292I、R298E、R298I、以上 8 種の変異体を作製した。この中で、有用な効果が見られた変異体のグルコース耐性を Table.2-2 にまとめた。変異を導入したアミノ酸の位置は、Fig. 2-3 に示した。効果が見られた変異である M203W、Q216E、G259E、R298I のグルコース耐性は、それぞれ 2.3%、2.4%、2.5%、2.5%であった。基質結合ポケットの内側に変異導入した M203W では、ごく僅かなグルコース耐性向上が見られた。他の 3 変異は基質結合ポケットの入り口付近に導入した変異であるが、M203W に比べて効果が高かった。一方、効果が見られなかった変異体について、G292E、G292I、G259R では性質の変化は見られなかった。また、R298E については、R298I と類似したグルコース耐性の向上は見られたが耐熱性が著しく低下する結果となった。

2-3-4 GTAGL 多重変異体の作製

グルコース耐性が向上した変異を組み合わせ、多重変異体を作製する検討を行った。まず、2 重変異体(dGTAGL: G259E/R298I)および 3 重変異体(tGTAGL: M203W/G259E/R298I)を作製し、そのグルコース耐性を調べた結果、それぞれ 2.6%、2.5%であり多重変異による効果は低かった。さらに、4 重変異体(qGTAGL: M203W/Q216E/G259E/R298I)を作製し分析を行った結果、グルコース耐性は 2.7%に向上していることが分かった(Table. 2-2)。

次に qGTAGL については Ni アフィニティーカラムを使用して精製を行い(Fig. 2-1)、詳細にその性質を調べた。まず蛋白質比活性は 81 U/mg であり、Wild タイプとほぼ同じ数値であった(Table. 2-2)。また、耐熱性および最適温度にも大きな変化は見られなかった(Fig. 2-4)。

さらに、反応速度論的比較(Table. 2-3)や、TLC 分析により簡易に基質特異性を分析した結果(Fig. 2-5)でも、大きな性質の変化は認められなかった。

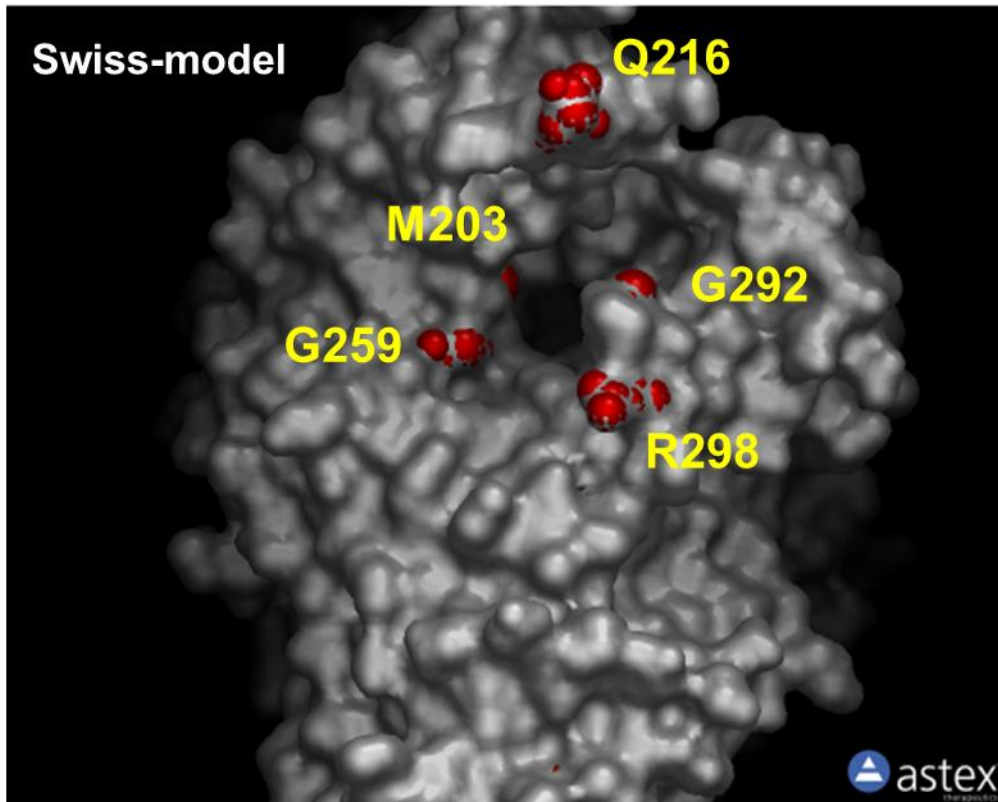


Fig. 2-3 GTAGL の立体構造予測 (Swiss-model, Surface representation)
M203 は基質結合ポケット内部に位置し、Q216、G259、G292、R298 は基質結合ポケットの入り口付近に位置している。

Table. 2-2 変異体のグルコース耐性

酵素	イソマルトース分解量(%)	グルコース耐性(%)	比活性 (U/mg)
GTAGL	0.2	2.2	86
M203W	0.3	2.3	-
Q216E	0.4	2.4	-
G259E	0.5	2.5	-
R298I	0.5	2.5	-
dGTAGL	0.6	2.6	-
tGTAGL	0.5	2.5	-
qGTAGL	0.7	2.7	81

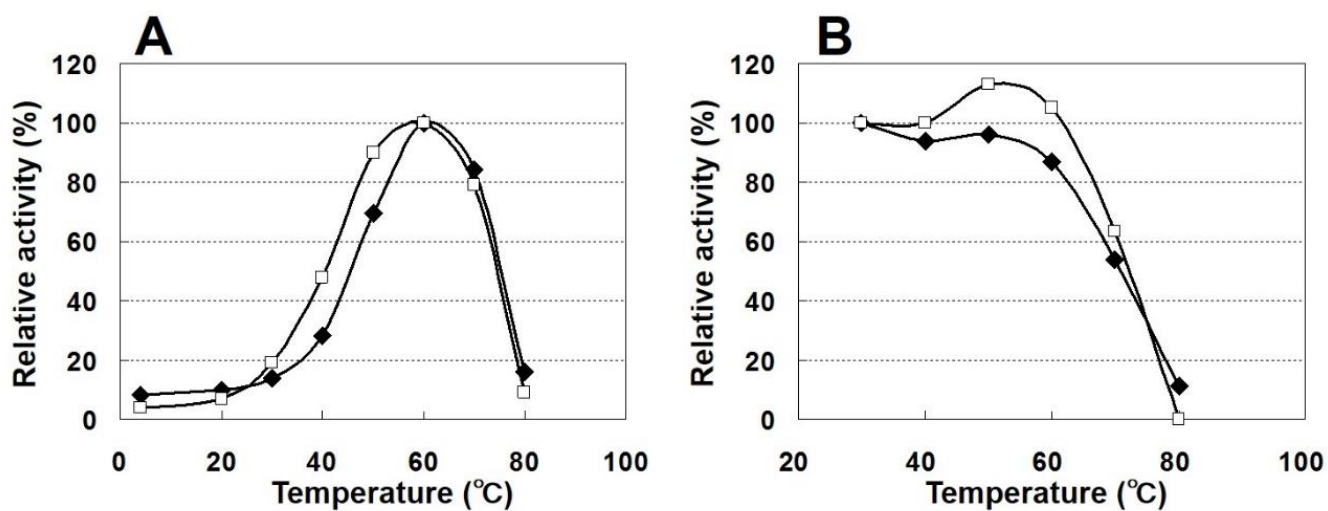


Fig. 2-4 qGTAGL の最適温度(A)、耐熱性(B)

◆, GTAGL、□, qGTAGL。 Fig. 2-2 と同様の方法でグラフを作成した。

Table. 2-3 GTAGL および qGTAGL の反応速度論的比較

	K_m (M)	K_{cat}/K_m ($S^{-1} \cdot M^{-1}$)
GTAGL	15.52×10^{-3}	1.6×10^3
qGTAGL	15.48×10^{-3}	1.4×10^3

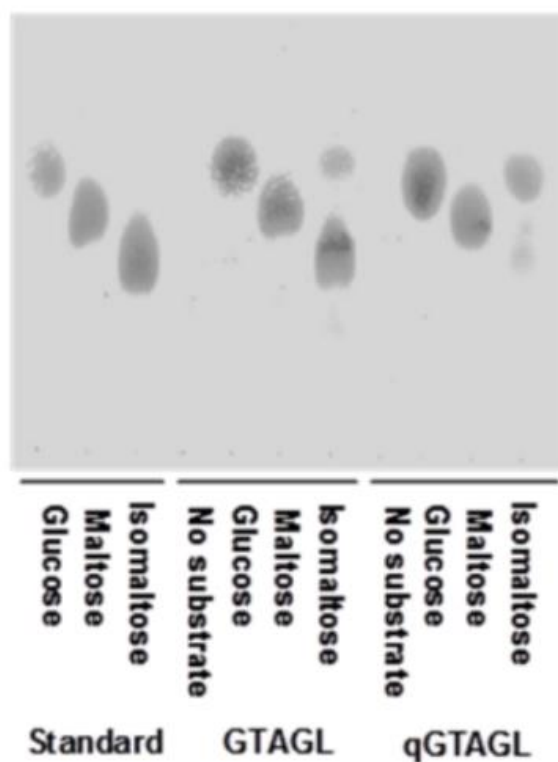


Fig. 2-5 TLC 分析による基質特異性の確認

基質として 2% のグルコース、マルトース、イソマルトースを使用して酵素反応を行い、TLC により分析した。TLC はシリカゲルプレート(メルク社)を使用した。展開溶媒には、2-プロパノール/n-ブタノール/水 = 10:5:4 (v/v/v)を使用した。展開終了後、十分に乾燥してからアンスロン・硫酸試薬[73]を噴霧し、100°C、15 分加温することで糖を可視化した。

2-4 考察

形質転換した *B. subtilis* の菌体破砕液中に AGL 活性が確認された。宿主である *B. subtilis* も α -1,6-グルコシド結合に作用する酵素を持っているが、耐熱性酵素ではなく 60°C では失活することを確認している。そのため、ここで確認された AGL 活性は組換え GTAGL 由来のものであると言える。また精製した GTAGL の耐熱性および最適温度は元株が生産する Native の酵素とほぼ同じであったため、組換え GTAGL は Native の性質を保持した状態で得られたと考えられる。また、本組換え酵素は *B. subtilis* を宿主として発現しており、GTAGL は *Geobacillus* 由来であることから、Codon usage などの面で宿主との相性も良い条件であったと推察した。

次に変異体作製のため、GTAGL の立体構造予測を行った。モデリングのテンプレートには、*B. cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase を使用した。この酵素と GTAGL とのアミノ酸配列の相同性は 72% であり、またその耐熱性は 44.5°C であると報告されている [75]。 *B. cereus* 由来 oligo-1,6-glycosidase は 19 残基のプロリン残基を有しているのに対し GTAGL では 32 残基を有している。プロリン残基は蛋白質の構造をリジットにすることで安定性を高めることが知られているが、この多数のプロリン残基が GTAGL の耐熱性に寄与していると考えられる。また GTAGL はシステイン残基を有しておらず、ジスルフィド結合は形成しない。

変異を導入した M203 は保存領域 II (GFRMDVINMIS:下線部が M203) 近傍で、基質結合ポケットの内側に位置している。M203W の変異により、わずかなグルコース耐性の向上が見られたが、これは基質結合ポケットが空間的に狭くなった影響であると考えられる。また、Q216、G259、R298 は、基質結合ポケットの入り口近傍に位置しており、これらを酸性アミノ酸(グルタミン酸)や、疎水性アミノ酸(イソロイシン)に変異させた場合にグルコース耐性の向上が見られた。酸性アミノ酸の電荷やイソロイシンの疎水性効果が、基質の取り込みや排出に影響を与え、グルコース耐性が向上したものと考えられる。

一方、同じくポケット入り口付近に位置している G292 については、G292E、G292I 変異体のいずれも、グルコース耐性の向上は見られなかった。また、R298I

で効果が見られことから、R298E についてもグルコース耐性の向上を期待して検討を行った。その結果、R298I と同等のグルコース耐性向上は見られたが、熱安定性が著しく低下する結果となった。このことから、グルコース耐性には酵素全体の構造バランスや基質結合部位との距離などが複雑に関係していると考えられた。宿主由来の α -1,6-グルコシダーゼは測定条件の 60°C で失活することを確認しているため、この実験では各変異体の精製は行わずにグルコース耐性を測定している。また各変異により、比活性が若干変化している可能性も考えられるが、反応時間を長くして酵素反応の停止を確認しているため、グルコース耐性の比較は可能であると判断した。

さらに 2 重~4 重変異体を作製し分析を進めた結果、4 重変異体である qGTAGL ではグルコース耐性が 2.7% まで向上した。qGTAGL について精製し、詳細な分析を行ったところ、比活性、耐熱性、最適温度などの基本的な性質に変化は見られなかった。また、基質特異性の変化や K_m 、 V_{max} などの値にも大きな変化は見られなかった。これらの結果から、本研究では酵素の基本的な性質を変化させることなく、グルコース耐性のみを向上させた多重アミノ酸変異体の作製に成功したと言える。また、 α -グルコシダーゼのグルコース耐性について新たな知見を得ることができたと考えられる。

摘要

第 1 章

リング銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼに関する研究

I、エンドポリガラクトナーゼ I の酵母を宿主とした発現・精製・性質

S. purpureum 由来エンドポリガラクトナーゼ(EndoPG) I を、*P. pastoris* を宿主として発現し、CM52 カラムクロマトグラフィーにより糖鎖の数が 1~3 本である 3 種の組換え EndoPG I を純粋に精製した。組換え EndoPG I に付加された糖鎖は M8~M10 のハイマンノース型であった。LC-MS 解析の結果から EndoPG I は 4 箇所ある N 型糖鎖結合位置にランダムに糖鎖付加されていると考えられた。CD スペクトル解析により、組換え酵素の熱変性曲線を作成した結果、精製標品中に熱安定性について異なる組換え酵素が含まれていることが示唆された。そのため、LC-MS を使用したジスルフィド結合の解析を実施した結果、第二と第三のジスルフィド結合が形成されていないことを示すペプチドが検出された。これは *P. pastoris* を使用した組換え酵素の発現システムで、ジスルフィド結合形成が不完全な組換え蛋白質を確認した初めての報告である。[76]

II、エンドポリガラクトナーゼIVの精製とクローニング

S. purpureum の培養ろ液から、3 段階のカラムクロマトグラフィーにより EndoPG IVa、IVb を精製した。N 末端アミノ酸配列分析をしたところ、両酵素は同じ配列を示した。また ESI-MS 分析や EndoH 処理による分子量変化を調べた結果、EndoPG IVa、IVb の差異は N 結合型糖鎖の結合本数の差であると考えられた。EndoPG IV と I の耐熱性を熱変性曲線を作成することで比較した結果、I の T_m 値が 79.5°C であるのに対して、IV では 62°C であり、17.5 °C もの差があることが明らかとなった。また、蛋白比活性は IV と I でほぼ等しい値であった。N 末端アミノ酸配列の情報を基に RACE 法により EndoPG IV の cDNA をクローニングした結果、EndoPG IV と mature-EndoPG I のアミノ酸ホモロジーは 72% であった。EndoPG I の熱安定性について考察する上で有用な情報が得られた。[48]

Ⅲ、エンドポリガラクトナーゼⅣの *A. oryzae* を宿主とした発現と糖鎖解析

A. oryzae を宿主として、*S. purpureum* 由来 EndoPG Ⅳを発現し、*N* 結合型糖鎖の結合本数が異なる rEndoPG Ⅳ₂、Ⅳ₁、Ⅳ₀ の 3 種を精製した。糖鎖に注目して解析を進めた結果、組換え酵素に付加された *N* 結合型糖鎖は GlcNAc₂Hexose_{5~10} であること、またその糖組成分析を行った結果、ガラクトースとマンノースを含んでいることを明らかにした。また *O* 結合型糖鎖による修飾も合わせて受けていると考えられた。rEndoPG Ⅳの耐熱性を、熱変性曲線を作成することで比較した結果、Ⅳ₁ とⅣ₀ ではそれぞれ *T_m* 値が 60°C と 59°C となった。これは Native の EndoPG Ⅳとほぼ同じ数値であった。一方、Ⅳ₂ については糖鎖修飾の影響からか、正確な測定を行うことができなかった。Ⅳ₁ とⅣ₀ の熱変性曲線に 2 段階の変性が見られなかったことから、*A. oryzae* を宿主とした場合では、*P. pastoris* の場合とは異なり、組換え酵素にジスルフィド結合の不完全体は含まれていないのと考えられた。[77]

Ⅳ、プロエンドポリガラクトナーゼⅠの持つ C 末端 44 残基の機能解析

S. purpureum (リンゴ銀葉病菌) 由来プロ型エンドポリガラクトナーゼⅠ (Pro-EndoPG Ⅰ) は、他の PG は持たないユニークな C 末端配列を有している。*S. purpureum* の培養液から精製された mature-EndoPG Ⅰは、C 末端 44 残基のプロ配列を欠失した状態で得られる。そこで Pro-EndoPG Ⅰを大腸菌を宿主として発現させ、その酵素活性を調べた。その結果、得られた Pro-EndoPG Ⅰは活性を示さなかったが、プロ配列の一部を V8 プロテアーゼで分解することにより PG 活性が確認された。これらの結果は C 末端配列が酵素自身を不活性化していることを示している。このような現象は、他の糖質分解酵素では見られない。その後、アミノ酸変異体を作製して検討を行い、E364、E366 の 2 つのグルタミン酸残基が自己不活性化に関連していることを明らかにした。また、リンゴの幼木に Pro-EndoPG Ⅰを注入した試験では、mature-EndoPG Ⅰを注入した際と同様の銀葉症状が確認された。[78]

第 2 章

Geobacillus thermoglucosidasius 由来 Oligo-1,6-glucosidase に関する研究

G. thermoglucosidasius 由来 Oligo-1,6-glucosidase (GTAGL) のグルコース耐性(グルコース存在下における酵素の反応性)を、部位特異的変異導入により向上させた。本研究では、M203W/Q216E/G259E/R298I の 4 重変異体 qGTAGL を作製した。Wild タイプでは、2.2%のグルコースが反応系に存在すると酵素活性を失うが、qGTAGL では 2.7%まで反応可能であった。耐熱性や最適温度など、酵素の基本的性質は、変異導入による影響を受けなかった。特に、基質結合ポケットの入り口付近へのアミノ酸変異はグルコース耐性向上に対する効果が大きかった。 α -グルコシダーゼのグルコース耐性について新たな知見を得た。[79]

総括

本稿では、食品産業関連酵素を対象として蛋白質工学的手法により機能改善や性質解析を目的に行った研究について報告した。蛋白質工学的手法は研究ツールとしてだけでなく、遺伝子組換え酵素の製造などをはじめとした産業利用においても、その役割がさらに大きくなっている。

日本国内で食品用の遺伝子組換え酵素を産業的に製造・販売し、それが使用されるには、カルタヘナ法に従い遺伝子組換え微生物の拡散防止措置をとることや GILSP のガイドラインに準拠することなどが求められる。また組換え酵素について十分な情報収集を行い、安定性・安全性を担保すること、さらには消費者の安心に対して配慮することなども必要となる。

実際に組換え酵素が産業利用されている例として、*Bacillus* 属菌を宿主として生産される α -アミラーゼやプルラナーゼ、酵母 *Kluyveromyces lactis* を宿主として生産されるキモシンなどが挙げられる[80、81]。組換え酵素の生産系として最も研究が発展しているのは大腸菌を宿主とした手法であるが、消費者イメージの問題から実際に食品用酵素の生産に使用するのは難しい状況もある。これに対し *Bacillus* 属菌や酵母は、これまでの利用実績や食経験などから安全性が高いことが示されており、利用しやすい宿主であると言える。こうした背景から、第1章-I で使用した酵母 *P. pastoris* についても今後さらに利用価値が高まると考えられるが、本研究で得られた組換え酵素にはジスルフィド結合の不備が原因で耐熱性の低い組換え酵素が混在していることが明らかとなった。産業用酵素の安定性は特に重要であり、組換え酵素が正しくフォールディングされているか否かについては、常に注意を払う必要がある。その点では、第1章-III に示した *A. oryzae* を宿主とした EndoPG IV の発現検討で得られた組換え酵素には、ジスルフィド結合の不全体は含まれていないと考えられ、また *A. oryzae* は食経験等で高い安全性が示されていることから、産業利用上は有利であると言える。一方で、付加する糖鎖は酵母に比べて複雑であり、それにより生じる微小不均一性が組換え酵素に与える影響については考慮する必要がある。

有用な性質を持つ酵素でも、その生産量が低く工業レベルでの製造が難しい場合や、組換え酵素として産業利用することに何らかの障害がある場合、現状で

は突然変異による地道な育種作業により目的酵素の生産量を向上させ、工業化を目指すことになる。また、産業的に重要となる熱安定性の優れた酵素は、好熱菌が生産することが多く、例えば第 2 章で研究対象とした *G. thermoglucosidasius* は好熱菌であり、60°C などの高温で培養を行わないと良好な生育を示さない[82]。そのため、本菌を培養して天然型の酵素を工業的に大規模生産するのはエネルギーコスト的に不利である。それに対し、本稿で組換え発現の宿主として使用した大腸菌、酵母、*A. oryzae* および *B. subtilis* は、30~37°C のような負荷の低い温度での培養が可能であり、さらに地道な育種を必要とせずにある程度効率的な生産が望める点も、組換え酵素生産の利点であると言える。蛋白質工学的な手法で酵素に部位特異的変異を導入し、安定性の向上、基質特異性の変化など、組換え酵素の性質を変化させることは既に一般的な方法となっているが、実験室レベルで有用な変異を見出しても、人為的に得られた変異酵素の安全性を確認し、食品産業へ利用して行くには前述の通り多くのハードルがある。今後、ガイドライン面の整備や、本稿で取り上げたジスルフィド結合形成、糖鎖の微小不均一性など組換え酵素生産に関する様々な課題が解決されれば、産業利用できる酵素の種類は飛躍的に増加し、新たな機能性食品素材の開発など、さらなる技術発展に繋がると考えられる。

次に、第 1 章-IV では Pro-EndoPG I の C 末端配列が自己を不活性化していることを明らかにした。プロテアーゼでは自己のペプチド配列が、酵素活性を制御している例は多くみられるが、糖質関連酵素ではこのような事例は他に見られない。その後、木村らの報告で、同菌株由来の EndoPG IV に Pro-EndoPG I の C 末端配列を導入したキメラ酵素で同様の不活性化が確認された[83]。さらに、濱田らの研究により、この不活性化は pH 依存であり、 α -ヘリックス構造を形成すると考えられる C 末端配列ドメインが活性部位クレフトを形成するアミノ酸残基との間でイオン結合を形成することで、酵素の性質を変化させていることが示された[84]。この現象が他起源の PG や、その他の糖質加水分解酵素にも応用可能であれば、酵素活性を制御する新たな方法として、何らかの産業技術に応用していくことも可能かもしれない。そのためには、X 線結晶構造解析等を行い、Pro-EndoPG I の自己活性制御のメカニズムをより詳細に解析していくことが必要であると考えられた。

また、第 2 章ではイソマルターゼのグルコース耐性向上に成功した。本研究では酸性アミノ酸の電荷やイソロイシンの持つ疎水性効果が、基質の取り込みや排出に影響を与え、グルコース耐性が向上したことが示唆され、 α -グルコシダーゼについて新たな知見が得られた。酵素の反応性を変化させることを狙い、基質結合部位でサブサイト形成に関わるアミノ酸に対して変異を導入する例は多いが、基質結合ポケットの入り口に位置するアミノ酸に変異を加えるアプローチの例は他に見られず、新たな手法の提案にもつながった。今後、同様の変異導入を他の GH13 酵素に応用して、類似した効果が確認されるならば、さらに有用な情報となると考えられる。

参考文献

- [1] B. Henrissat: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309-316 (1991).
- [2] P. Biely *et al.*: Inversion of configuration during hydrolysis of alpha-1,4-galacturon linkage linkage by three *Aspergillus* polygalacturonases. *FEBS Lett.*, **382**, 249-255 (1996).
- [3] A. Collmer: The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 385-409 (1986).
- [4] K. Miyairi: Biochemical studies on the silver-leaf inducing substance of apple silver-leaf disease. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.*, **49** (1988).
- [5] K. Miyairi *et al.*: A toxic protein causative of silver-leaf disease symptoms on apple trees. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1897-1902 (1977).
- [6] K. Miyairi *et al.*: Purification and properties of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silver-leaf symptoms on apple trees. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 111-118 (1985).
- [7] K. Miyairi *et al.*: Pathogenic fungal pectolytic enzymes and their effects for the development of disease symptoms. *日本農芸化学会誌*, **64**, 1163-1166 (1990).
- [8] Y. Hasui *et al.*: Isolation, characterization, and sugar chain structure of endoPG, Ia, Ib and Ic from *Stereum purpureum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 852-857 (1998).

- [9] T. Shimizu *et al.*: Determination of glycosylation sites, disulfide bridges, and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2380-2388 (2000).
- [10] K. Miyairi *et al.*: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 655-659 (1997).
- [11] M. Senda *et al.*: Characterization of an endopolygalacturonase gene *cpgg1* from phytopathogenic fungus *Chondrostereum purpureum*. *J. Gen. Plant Pathol.*, **67**, 41-44 (2001).
- [12] T. Shimizu *et al.*: Crystallization and preliminary X-ray study of endopolygalacturonase from the pathogenic fungus *Stereum purpureum*. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**, 1171-1173 (2001).
- [13] T. Shimizu *et al.*: Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum*, revealed by crystal structure in native and ligand-bound forms, atomic resolution. *Biochemistry*. **41**, 6651-6659 (2002).
- [14] M.V. Semenova *et al.*: Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry*, **68**, 559-569 (2003).
- [15] M. Serrat *et al.*: Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **97**, 193-208 (2002).

- [16] T. Shimizu *et al.*: Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*. *Protein expr. purif.*, **44**, 130-135 (2005).
- [17] 新谷智行: 銀葉病菌エンドポリガラクトナーゼ I 遺伝子の大腸菌での発現および組換え酵素と変異酵素の解析 (2005 年度、弘前大学農学生命科学研究科 修士論文)
- [18] I. Benoit *et al.*: Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett.*, **580**, 5815-5821 (2006).
- [19] E. Rodriguez *et al.*: Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **382**, 105–112 (2000).
- [20] Y. Qin *et al.*: Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. *Protein Expr. Purif.*, **58**, 162-167 (2008).
- [21] S. Crognale *et al.*: Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 1230-1235 (2006).
- [22] T. Koseki *et al.*: An *Aspergillus oryzae* acetyl xylan esterase: Molecular cloning and characteristics of recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **121**, 381-389 (2006).

- [23] Y. Fan *et al.*: Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **56**, 93-99 (2007).
- [24] A. S. Pe´rez-Martı´nez *et al.*: Overexpression, purification and characterization of the *Trichoderma atroviride* endochitinase, Ech42, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **55**, 183-188 (2007).
- [25] M. J. Hoop *et al.*: Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.*, **291**, 299-302 (1991).
- [26] P. Blanco *et al.*: Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 187-191 (2002).
- [27] S. Macauley-Patrick *et al.*: Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, **22**, 249-270 (2005).
- [28] C. A. Scorer *et al.*: The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **136**, 111-119 (1993)
- [29] Y. Milner *et al.*: A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydrate. Res.*, **4**, 359-361 (1967).
- [30] M. M. Bradford: 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 (1976).
- [31] U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

- [32] L. Grinna *et al.*: Size distribution and general structural features of *N*-linked oligosacchhalides from methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, **5**, 107-115 (1989).
- [33] J. F. Tschopp *et al.*: High-level secretion of glycosylation invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **5**, 1305-1308 (1987).
- [34] P. V. den Steen *et al.*: Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 587-598 (1998).
- [35] C. E. White *et al.*: Expression of highly disulfide bonded protein in *Pichia pastoris*. *Structure*, **2**, 1003-1005 (1994).
- [36] M. G. Tyshenko *et al.*: Challenges in the expression of disulfide bonded, threonine-rich antifreeze proteins in bacteria and yeast. *Protein Expr. Purif.*, **47**, 152-161 (2006).
- [37] Y. Liu *et al.*: Expression, purification, and characterization of recombinant *Metarhizium anisopliae* acid trehalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **54**, 66-72 (2007).
- [38] H. C. Kester *et al.*: Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur. J. Biochem.*, **240**, 738-746 (1996).
- [39] 大木肇: 銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼIVの組換え酵素および変異体酵素による熱安定性の解析 (2007 年度、弘前大学農学生命科学研究科修士論文).

- [40] T. Ooi *et al.*: A unique post-translational processing of an exo-beta-1,3-glucanase of *Penicillium* sp. KH10 expressed in *Aspergillus oryzae*. *Protein Expr. Purif.*, **67**, 126-131 (2009).
- [41] S. Fujihira *et al.*: Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 853-860 (2009).
- [42] M. W. Rey *et al.*: Cloning, heterologous expression, and characterization of *Thielavia terrestris* glucoamylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **111**, 153-166 (2003).
- [43] B. Woosley *et al.*: Comprehensive glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase C. *Anal. Biochem.*, **354**, 43-53 (2005).
- [44] S. Bartling *et al.*: Expression of an *Erwinia* pectate lyase in three species of *Aspergillus*. *Curr. Genet.*, **29**, 474-481 (1996).
- [45] K. Ozeki *et al.*: Construction of a promoter probe vector autonomously maintained in *Aspergillus* and characterization of promoter region derived from *A. niger* and *A. oryzae* genomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 383-389 (1996).
- [46] K. Gomi *et al.*: Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549-2555 (1987).
- [47] K. Ozeki *et al.*: A method for the re-isolation of an autonomously replicating plasmid from *Aspergillus* transformants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1133-1134 (1995).

- [48] S. Ogawa *et al.*: Purification, characterization and amino acid sequence of Endopolygalacturonases IVa and IVb from fungus *Stereum purpureum*. *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 261-266 (2009).
- [49] L. Parenicová *et al.*: *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.*, **345**, 637-644 (2000).
- [50] J. Li *et al.*: Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*. *J. phytopathol.*, **150**, 213-219 (2002).
- [51] F. I. García-Maceira *et al.*: Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2191-2196 (2001).
- [52] H. L. Williams *et al.*: Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genet. Biol.*, **36**, 71-83 (2002).
- [53] M. Esther *et al.*: The C-terminal sequence from common bugle leaf galactan: galactan galactosyltransferase is a non-sequence-specific vacuolar sorting determinant. *FEBS Lett.*, **581**, 1811-1818 (2007).
- [54] S. Okuda *et al.*: A short helix in the C-terminal region of LolA is important for the specific membrane localization of lipoproteins. *FEBS Lett.*, **582**, 2247-2251 (2008).
- [55] Y. C. Lee *et al.*: Requirement of a COOH-terminal pro-sequence for the extracellular secretion of aqualysin I (a thermophilic subtilisin-type protease) in *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbial lett.*, **120**, 69-74 (1994).

- [56] R. Gaeriel *et al.*: Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 6720-6726 (1972).
- [57] R. Hayashi *et al.*: Carboxypeptidase from Yeast, large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptide and proteins. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2296-2302 (1973).
- [58] L. Stryer: *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 4th edition, (1995).
- [59] J. A. Wells *et al.*: Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7911-7925 (1983).
- [60] N. Ynagida *et al.*: Specific Excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **166**, 937-944 (1986).
- [61] Y. Suzuki *et al.*: Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glucosidase. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 77-83 (1986).
- [62] A. R. Plant *et al.*: A cell-associated oligo-1,6- α -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Thermoanaerobium* Tok6-B1. *Biochem. J.*, **255**, 865-868 (1988).
- [63] J. Pei *et al.*: *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol. Biofuels.*, **5**, 31 (2012).

- [64] C. A. Uchima *et al.*: Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an endogenous thermostable and high-glucose-tolerant β -glucosidase from the termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4288-93 (2012).
- [65] K. Watanabe *et al.*: The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.*, **269**, 142-53 (1997).
- [66] K. Watanabe *et al.*: Identification of catalytic and substrate-binding site residues in *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2058-64 (2001).
- [67] K. Yamamoto *et al.*: Val216 decides the substrate specificity of alpha-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3414-3420 (2004).
- [68] K. Yamamoto *et al.*: Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS J.*, **277**, 4205-14 (2010).
- [69] K. Watanabe *et al.*: Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24287-94 (1991).
- [70] K. Watanabe *et al.*: Cloning and expression in *Escherichia coli* of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase gene from *Bacillus thermoglucosidasius*. *J. Bacteriol.*, **171**, 1219-1222 (1989).

- [71] T. Morimoto *et al.*: Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Research*, **15**, 73-81, (2008).
- [72] O. H. Lowry *et al.*: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- [73] W. E. Trevelyan *et al.*: Determination of yeast carbohydrates with the anthrone reagent. *Nature*, **170**, 626-627 (1952).
- [74] K. Arnold *et al.*: The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**, 195-201, (2006).
- [75] K. Watanabe *et al.*: Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 277-83 (1994).
- [76] S. Ogawa *et al.*: Expression, purification, and analyses of glycosylation and disulfide bonds of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **65**, 15-22 (2009).
- [77] S. Ogawa *et al.*: Glycosylation status and conformational stability of recombinant *Stereum purpureum* Endopolygalacturonase IVs produced in an *Aspergillus oryzae* expression system. *J. Appl. Glycosci.*, **59**, 37-42 (2012).
- [78] S. Ogawa *et al.*: The pro-form of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I is inactivated by a pro-sequence in the C-terminal region. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 558-62 (2010).

[79] S. Ogawa *et al.*: Improvement of the glucose tolerance of Oligo-1,6-glucosidase from *Geobacillus thermoglucosidasius*. *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 21-24 (2015).

[80] 安全性審査の経路を経た旨の公表がなされた遺伝子組換え食品及び添加物一覧(厚生労働省, 平成 28 年 7 月 11 日版)

[81] J. A. van den Berg *et al.*: *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology*, **8**, 135-9 (1990).

[82] T. N. Nazina *et al.*: Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 433-46 (2001).

[83] T. Kimura *et al.*: Active suppression of EndoPG IV by ligation of the pro-sequence from *Stereum purpureum* Pro-EndoPG I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 196-8 (2012).

[84] S. Hamada *et al.*: Characterization of the effects of C-terminal pro-sequence on self-inactivation of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I. *FEMS Microbiol Lett.*, **362**, fmv134, (2015).

謝辞

第1章の研究を遂行するにあたり、終始一貫して適切なお指導、ご助言を頂きました、前・弘前大学農学生命科学部 教授 宮入 一夫 先生に厚く御礼申し上げます。

第2章の研究は、弘前大学農学生命科学部 教授 吉田 孝 先生と合同酒精(株) 酵素医薬品研究所との共同研究として行われました。また、本論文を纏めるにあたり、多くのご助言を頂きました。

先生にご指導いただき、研究や論文作成を進められましたことを深く感謝致します。