

## 677 協同作用による新規ケラチン分解機構

○山村昌平, 森田資隆, 民谷栄一 (北陸先端大・材料)

【目的】不溶性タンパク質であるケラチンは、ジスルフィド結合などの架橋構造をとるため、非常に硬い構造をもっており、通常のプロテアーゼでは分解が困難であることが知られている。しかし、ケラチン分解酵素に関する報告は少なく、ケラチンの分解機構は未だ解明されていないのが現状である。そこで、本研究では新たにケラチン分解菌をスクリーニングし、産生されたケラチン分解酵素の特性について調べた。

【方法および結果】シカの体毛を含んだ土壌から、ケラチン分解活性の高い D-1 株を単離した。D-1 株は、16S rDNA の解析から *Stenotrophomonas nitritireducens* と最も高い相同性を示した。精製によって得られた酵素は、2 種類の新規な酵素であり、それぞれジスルフィドレダクターゼとプロテアーゼであった。これらの酵素は、単独ではケラチン分解活性を示さないが、混合した際に高いケラチン分解活性を示した。さらに、得られた新規プロテアーゼは、ジスルフィドレダクターゼ存在下で、ケラチンに対して Proteinase K の 2 倍の活性を示した。また、ジチオスレイトールの存在下においても同様の結果を示したことから、還元作用を受けたケラチンを分解するのに適した酵素であることがわかった。一方、ジスルフィドレダクターゼは、細菌由来では報告例のない酵素であり、ケラチンのようなタンパク質からグルタチオンやシスチンといったペプチドのジスルフィド結合も切断することから、広い基質特異性を示した。また、この酵素がケラチンに作用した際に、他のプロテアーゼにおいても活性の上昇が見られたことから、ジスルフィドレダクターゼもケラチン分解に適した酵素であることが示された。したがって、2 種類の酵素が協同的な作用によりケラチンを分解していることがわかった。

## Mechanism of keratin degradation by a cooperative action of two enzymes from a new bacterium

○ Shohei Yamamura, Yasutaka Morita, Eiichi Tamiya (Sch. Materials Sci., JAIST)

**Key words** Keratin, Keratinolytic enzyme, Protease, Disulfide reductase

## 679 超好熱始原菌由来サチライシンの Pro 配列の役割

○田中志帆<sup>1</sup>, 斎藤健<sup>2</sup>, 春木 満<sup>2</sup>, 森川正章<sup>1</sup>, 金谷茂則<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 阪大院・工・物生, <sup>2</sup> 阪大院・工・物生, 現 日大・工・物化)

【目的】超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来サチライシン (*Tk*-subtilisin) は、422 アミノ酸からなる。バクテリア由来サチライシン (subtilisin) の一次構造と比較することにより、*Tk*-subtilisin も Pre 配列 (Met<sup>24</sup>-Ala<sup>1</sup>)、Pro 配列 (Gly<sup>1</sup>-Pro<sup>82</sup>)、成熟体 (Ala<sup>83</sup>-Gly<sup>398</sup>) からなることが予想される。しかし、Pro 配列が切断されて活性型になるバクテリア由来サチライシンと異なり、*Tk*-subtilisin は Pro 配列を保持したままで活性を示すことが明らかになっている。よって、本研究ではこの *Tk*-subtilisin の Pro 配列の役割を解析することを目的とした。

【方法と結果】*Tk*-subtilisin の Pro 体 (Gly<sup>1</sup>-Gly<sup>398</sup>) および成熟体 (Ala<sup>83</sup>-Gly<sup>398</sup>) と予想される蛋白質を大腸菌において生産させたところ、いずれもインクルージョンボディとなった。そこで蛋白質変性剤による可溶化と透析による再構成を試みた結果、Pro 体、成熟体ともに活性を示した。しかし、成熟体の活性は Pro 体の活性より大きく低下していた。現在、Pro 配列の役割を調べるために、この二つの蛋白質の精製および酵素学的諸性質の解析を進めている。また、*Tk*-subtilisin が KOD1 株から Pro 体として分泌されるのか成熟体として分泌されるのかを調べるために、抗体の作製を行っている。

## Role of a putative pro-sequence of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon

○ Shihori Tanaka<sup>1</sup>, Kenji Saito<sup>1</sup>, Mitsuru Haruki<sup>2</sup>, Masaaki Morikawa<sup>1</sup>, Shigenori Kanaya<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Dept. Material & Life Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup> Dept. Material Life Sci., Osaka Univ.; present address, Nihon Univ.)

**Key words** subtilisin, serine protease, pro-sequence, hyperthermophilic archaeon, inclusion body

678 *Alicyclobacillus sendainensis* 由来好熱好酸性コラーゲン分解酵素の配列解析と基質特異性解析○鶴岡直樹<sup>1</sup>, 芦田理子<sup>1</sup>, 南方宏之<sup>2</sup>, 中山 亨<sup>1</sup>, 西野徳三<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 東北大院・工・生工, <sup>2</sup> サントリー・生物有機科学研)

【目的】*Alicyclobacillus sendainensis* の生産するプロテアーゼ (ASCP) はコラーゲンに高い特異性を持ち、好熱好酸性を示すコラーゲン分解酵素である。ASCP は各種代表的なプロテアーゼ阻害剤で阻害されず、既知のコラーゲナーゼの基質ペプチドに対して分解活性を示さないなどのユニークな性質を持ち、その触媒機構や認識配列については不明であった。そこで本酵素遺伝子をクローニングし、配列決定を行って触媒機構を推測した。またコラーゲンの内部配列から設計したペプチド基質を使用して基質特異性解析を行い、その認識配列を推定した。

【方法及び結果】配列解析の結果、本酵素は N 末端側の約 20 kDa の prepro 領域と 37 kDa の成熟体領域で構成され、成熟体配列を用いた相同性解析により、family S53 に属する新規なセリン・カルボキシルプロテアーゼ群と 30% 以上の配列同一性を持つことが明らかとなった。また、family S53 プロテアーゼの保存配列である Gly-Xaa-Ser モチーフや、触媒残基とされている Glu, Asp, Ser などとも保存されており、ASCP も同様の触媒機構を持つと推測された。

本酵素によるコラーゲン消化産物の配列解析からコラーゲン分子中の切断部位を推定して基質ペプチドを設計し、ASCP の速度論解析を行った。さらに最も高い分解活性を示した Met-Gly-Pro-Ala-Gly-Phe-Pro-Gly-Ser (\*: 切断部位) を基に切断部位周辺のアミノ酸を置換したペプチドを作製し詳細な特異性解析を行った。

Sequence and substrate specificity analyses of thermoacidophilic collagenolytic enzyme from *Alicyclobacillus sendainensis*○ Naoki Tsuruoka<sup>1</sup>, Masako Ashida<sup>1</sup>, Hiroyuki Minakata<sup>2</sup>, Toru Nakayama<sup>1</sup>, Tokuzo Nishino<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Grad. Sch. Engin., Tohoku Univ., <sup>2</sup> SUNBOR)

**Key words** serine-carboxyl proteinase, collagenolytic, thermoacidophilic

680 Mn<sup>2+</sup> 存在下における大腸菌 RNase HI の触媒機構に関する研究○津中康央<sup>1</sup>, 春木 満<sup>2</sup>, 大島玄久<sup>3</sup>, 森川正章<sup>1</sup>, 金谷茂則<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 阪大院・工・物生, <sup>2</sup> 阪大院・工・物生, 現 日大・工・物化, <sup>3</sup> 名城大・理工・建築)

【目的】リボヌクレアーゼ H (Rnase H) は DNA/RNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを分解する酵素である。エイズの原因ウイルスである、HIV-1 の増殖には Rnase H が必要であり、その触媒機構の理解はエイズ治療薬設計に役立つと期待されている。大腸菌 RNase HI は活性に Mn<sup>2+</sup> または Mg<sup>2+</sup> イオンを必要とし、これまでの研究から、本酵素の Mn<sup>2+</sup> 存在下における触媒機構は Mg<sup>2+</sup> 存在下におけるものとは異なることが示唆されている。しかし、これまで活性部位変異体の活性はほとんど Mg<sup>2+</sup> 存在下でのみ解析されている。そこで本研究では、これら活性部位変異体の Mn<sup>2+</sup> 存在下での活性を調べると共に、これらの変異体の Mn<sup>2+</sup> の結合様式を解析することを目的とした。

【結果】活性に不可欠と考えられてきた Asp10, Glu48, Asp70 のうち、Glu48 の変異体 (E48A, E48Q) だけが Mn<sup>2+</sup> 存在下でも活性を示すことを見出した。この変異体や野生型酵素による Mn<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> 存在下での基質切断部位を比較したところ、ほとんど変化がなかった。カロリメトリ測定や原子吸光分析を行うことにより、D10A には Mn<sup>2+</sup> が結合しないが、E48A には Mn<sup>2+</sup> が一原子結合していることを明らかにした。

Studies on the catalytic mechanism of *Escherichia coli* RNase HI in the presence of Mn<sup>2+</sup>○ Yasuo Tsunaka<sup>1</sup>, Mitsuru Haruki<sup>2</sup>, Motohisa Oobatake<sup>3</sup>, Masaaki Morikawa<sup>1</sup>, Shigenori Kanaya<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Dept. Material Life Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup> Dept. Material Life Sci., Osaka Univ.; present address, Nihon Univ., <sup>3</sup> Dept. Architect., Meijo Univ.)

**Key words** Ribonuclease H, catalytic mechanism, metal binding