

学位論文題名

Studies on Hybrid Proteins Constructed from
RTEM-1 and *Proteus vulgaris* β -Lactamases

(RTEM-1 及び *Proteus vulgaris* の β -ラクタマーゼから作製した
ハイブリッド蛋白質に関する研究)

学位論文内容の要旨

β -ラクタマーゼは、ペニシリン系、セファロスポリン系など β -ラクタム環抗生物質を加水分解する酵素であり、加水分解によってその抗生物質の抗菌作用はなくなる。

β -ラクタマーゼは、アミノ酸配列に基づいて A、B、C、D の 4 つのクラスに分類されている。クラス B は活性に必須な Zn^{2+} を含む金属酵素である。クラス A、C、D はいずれも活性中心にセリン残基が存在し、反応中間体として、アシル化されたセリン残基が介在する。しかし、クラス間のアミノ酸配列には、 $-Ser-X-X-Lys-$ 以外の相同性は存在しない。ともにクラス A に属する RTEM-1 と *P. vulgaris* の β -ラクタマーゼの間でハイブリッド蛋白質を、組換え DNA 技術によって作製し、その酵素活性の強度、基質特異性の変化、その他蛋白質の諸性質を解析して、酵素の構造と機能に関する興味ある知見を得ることができた。

RTEM β -ラクタマーゼ遺伝子はグラム陰性菌のプラスミド上のトランスポゾン中に存在しており、グラム陰性菌の耐性の原因の大部分を占めている。この遺伝子発現は構成的である。RTEM-1 β -ラクタマーゼは基質としてペニシリン系をよく加水分解する。一方、*P. vulgaris* の β -ラクタマーゼ遺伝子は染色体上に存在しており、その発現は加えた β -ラクタム環化合物によって誘導される。この酵素の基質特異性は他の酵素とは著しく異なり、ペニシリン系、セファロスポリン系を共によい基質とすると共に、多くの β -ラクタマーゼが分解できないセファロキシムをも加水分解することができるという特徴がある。

クラス A の β -ラクタマーゼに属する RTEM-1、*Staphylococcus aureus* PC1、*Streptomyces albus* G、*Bacillus licheniformis* 749/C の酵素については、X-線回折に

よる構造解析がなされており、酵素活性を詳細な高次構造レベルで検討が可能となっている。また、グラム陰性菌では β -ラクタマーゼは、細胞質で前駆体のポリペプチド鎖が合成された後、内膜を通過するときN末端部分のシグナルペプチドが切断されて、内膜と外膜との間のペリプラズムに成熟酵素が蓄積される。このことは酵素の精製を容易にしている。また、酵素は1本のポリペプチド鎖から成っておりサブユニット構造をとらない。蛋白質変性剤による処理後も、ポリペプチド鎖の正常な折りたたみによって容易に酵素活性の回復を観察することもできる。

ハイブリッド遺伝子の作製を次のように行った。成熟酵素で、RTEM-1 酵素は263アミノ酸残基、*P. vulgaris* の酵素は271アミノ酸残基からなり、37%の相同性を有している。プラスミドベクターに、それぞれの遺伝子を挿入し、転写はLacプロモーターに依った。まず、化学合成したプライマーを用いた変異作製法によって、両遺伝子に共通する制限酵素切断点を7箇所新たに挿入した。これらの制限酵素部位の1箇所を組換えてハイブリッド遺伝子をつくった。*E. coli* で発現させたが、すべてのハイブリッドで薬剤耐性を全く示さなかった。例えば、N末端17残基部分の組換えの場合、相同なアミノ酸残基は1個のみあるが、耐性は全くなかった。分子進化において、一般的に機能にとって重要なアミノ酸残基ほど保存的であり、機能に関係しない残基は非保存的であると考えられている。 β -ラクタマーゼのN末端部で保存性が低いのは、この部分は酵素活性に無関係であろうと推測できるが、実験の結果では活性は完全になくなっており、この部分も活性に重要な機能を有していることになる。次に制限酵素部位2箇所での組換えで、アミノ酸20-45残基置換したハイブリッド蛋白質を11個作製した。この結果、6種類はやはり活性がなかったが、種々の活性を持つハイブリッド酵素が5種類得られた。どの部分のハイブリッドが活性があるのかを、まだ統一的に説明できてはいない。

活性のないハイブリッド遺伝子を持つプラスミドを、高温では突然変異をおこす頻度が高い*E. coli dna Q* 変異株に入れて、1個のアミノ酸置換によって活性の回復した変異株を得ることができたハイブリッドがあった。このうちで*P. vulgaris* の β -ラクタマーゼの残基番号146-184の38残基をRTEM-1 β -ラクタマーゼの対応する部分で置換したハイブリッドの場合について特に興味ある結果が得られた。アンピシリンに対する耐性が野生株の25% (200 μ g/ml) に回復した置換変異が3種類得られたが、それ以上の変異株は得られず、活性を回復する置換は、L148V、M182T、Y247Hの3種類に限定されたとの結論に達した。148V、182Tは組換えた領域に含まれており、クラスAのコンセンサスアミノ酸残基への変換であった。247HはクラスAに属する酵素では例のないアミノ酸残基である。1つの置換を持つ変異体を再び*E. coli*

dnaQ 株にもどして選択したり、組換えDNAによって、2つの置換を持つ変異体3種を作製したが、そのアンピシリン耐性はいずれも $500\mu\text{g/ml}$ であった。3つの置換を持つ変異体は $1500\mu\text{g/ml}$ の耐性を示し、両親株よりも耐性が高くなった。即ち、3残基での変異はそれぞれが、酵素活性に対してほぼ等しい相乗効果を示した。これらの酵素のセファロリジンに対する K_m 値を求めると、親の *P. vulgaris* の β -ラクタマーゼが $60\mu\text{M}$ 、RTEM-1 が $430\mu\text{M}$ であるのに対して、ハイブリッド酵素は活性の強さは様々であるが K_m 値はいずれも $10\mu\text{M}$ という低い値を示した。また、セフロキシムの加水分解の時間経過を見ると、これらのハイブリッド酵素では、初速度よりも、10-40分後に、最大の加水分解速度を示すことがわかった。これは基質に合わせて、酵素が高次構造を変化させることによると考えられる。

組換えDNAにより、*E. coli* で蛋白質を大量産生させると、本来可溶性の蛋白質も不溶性の凝集体を形成する場合があることが知られている。野生株では全く凝集体が形成されないが、ハイブリッド蛋白質の多くは可溶性部分も存在するが、凝集体形成が認められた。凝集した蛋白質の分子量は、成熟蛋白質の分子量に等しいので、シグナル配列は有しておらず、ペリプラズムでの凝集体形成であった。勿論、いずれの場合も可溶画分が存在するので、不活性を凝集体形成のためとすることはできない。しかし、凝集体形成の程度は、酵素活性の有無と対応関係が見られる。これは、活性のある酵素はポリペプチド鎖の折りたたみが正常に進み、凝集体形成に至らず、折りたたみの遅い蛋白質は凝集体を形成しやすいとの考えに合っている。

酵素反応は、 $E + S \rightleftharpoons E \cdot S \rightarrow E \cdot A \rightarrow E + P$ (E : 酵素、S : 基質、 $E \cdot A$: アシル化酵素中間体、P : 産物) のように進む。 ^{14}C -ペニシリンを用いてアシル化酵素中間体の検出を試みた。野生型酵素では脱アシル化反応が速く進行するのでこの中間体は検出できないが、全く活性のないハイブリッド蛋白質や弱い活性を示すハイブリッド酵素には、アシル中間体が検出できるものが存在する。これは、アシル化反応は進行するが、脱アシル化反応が起こらない蛋白質や、アシル化反応よりも脱アシル化反応が相対的に遅い酵素が存在することによる。

このような様々な現象をどのように説明することができるのだろうか。クラスAに属する酵素は、基質と直接相互作用（主に水素結合）するアミノ酸残基はよく保存されており、したがって、RTEM-1 と *P. vulgaris* の酵素由来のいずれのハイブリッド蛋白質や、それに置換が加わった変異体も、これらの残基は共通に有している。現在、活性の有無や強弱は、基質と酵素のアミノ酸残基の側鎖との相互作用の適合性、特に水素結合に関与する原子の配置の直線性に依存しているのではないかという仮説に従って検討を進めている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

Studies on Hybrid Proteins Constructed from RTEM-1 and *Proteus vulgaris* β -Lactamases

(RTEM-1 及び *Proteus vulgaris* の β -ラクタマーゼから作製した
ハイブリッド蛋白質に関する研究)

組換えDNAの技術は、酵素のアミノ酸配列を変換することによって、その構造と機能との関係を解明する有力な手段となっている。しかし、その多くは酵素の活性中心となるアミノ酸残基の置換に伴う活性への影響を調べることによっている。それは、数百のアミノ酸残基のうち、いずれのアミノ酸残基を置換することによって、活性変化が現れるかの予測は不可能であり、また全ての残基の置換は、その組合せが膨大になってしまうからである。

本論文では、同じクラスAに属し、アミノ酸配列の相同性が37%である RTEM-1 及び *P. vulgaris* の β -ラクタマーゼの遺伝子間で極めて多数の組換え体を作製した。それを大腸菌で発現させて、ハイブリッド酵素を得た。遺伝子内の7個所の制限酵素切断部位のうち1個所で組換えた場合には、全てにおいて蛋白質は存在するが酵素活性は全く検出されなかった。アミノ末端とカルボキシル末端の近傍では相同性が低く、アミノ酸の置換は活性に影響することは少ないと予想されていたが、この予想に反して活性は全くなっていた。即ち、保存性の低いアミノ酸残基の配列も活性に重要な役割を担っているという発見があった。続いて制限酵素部位の2個所で組換えて、20-45残基のアミノ酸残基を置換した場合には、約半数でやはり全く不活性であったが、強弱はあったが活性が認められるハイブリッド酵素も得られた。比較的相同性が高い部分の組換え体が活性を有しているが、活性の有無がどの部分によるかを明確に説明できていないが、今後の構造解析のための大きな課題を与えた。

E. coli の *dnaQ* 温度感受性株が、高温で突然変異を起こす頻度が高くなることを利用して、活性のないハイブリッド蛋白質を産生する遺伝子に1つの塩基置換を起こさせて、活性のある酵素に変換するようなアミノ酸置換変異を分離することができた。アミノ酸残基番号146-184のハイブリッドからは、3つの残基に限定した活性のある変異体を得て、詳しく解析した。そのうちのY274H変異は、クラスAに属する酵素では例のないアミノ酸残基への置換であり、この変異で活性が回復するとは全く予測することができず、*dnaQ* 株の利用の有用性を示した結果といえる。3つのハイブリッド酵素は基質であるセファロリジンに対して、両親の β -ラクタマーゼより極めて低いKm値を示し、基質に対して親和性を増していると考えられる。この3つの変異を同時に2つ、あるいは3つ有する変異酵素を作製すると、相乗効果を与えて酵

素活性が強力になるという極めて興味ある結果を得ている。

さらに、*E. coli* で蛋白質を産生させたとき、不溶性の凝集体を形成するが、ハイブリッドによってその程度に差があり、蛋白質の構造との関係を示唆している。また、反応中間体であるアシル化酵素の存在などについても、それぞれのハイブリッド酵素について解析している。

以上の結果は、 β -ラクタマーゼを用いて、酵素の構造と活性との相関について、新しい方法論と重要な新知見を与えたものである。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。