



低温酵素(フォスファターゼ)の分子特性に関する研究

鶴田, 宏樹

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Date of Publication)

2009-04-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1997

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3156399>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001997>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

低温酵素（フォスファターゼ）の
分子特性に関する研究

平成11年3月

神戸大学大学院自然科学研究科

鶴田宏樹

目次

第1章	序論	1
第2章	低温フォスファターゼの分離精製	4
第1節	緒言	4
第2節	実験材料	4
第3節	好冷菌 (<i>Shewanella</i> sp.) の培養	5
第4節	フォスファターゼの活性測定	6
第5節	低温フォスファターゼの分離精製	7
第6節	小括	22
第3章	フォスファターゼ I 及び II の酵素的性質	23
第1節	緒言	23
第2節	実験材料	23
第3節	実験方法	24
第4節	フォスファターゼ I の酵素的性質	30
第5節	フォスファターゼ II の酵素的性質	44
第6節	小括	51
第4章	精製フォスファターゼ I の理化学的性質	53
第1節	緒言	53
第2節	実験材料	53
第3節	実験方法	54

第4節	精製フォスファターゼIのアミノ酸組成	57
第5節	N末端領域及び内部アミノ酸部分配列の決定	58
第6節	小括	61
第5章	フォスファターゼI遺伝子のクローニング及びその塩基配列の決定と大腸菌による組み換えタンパク質の発現	62
第1節	緒言	62
第2節	実験材料及び試薬	62
第3節	実験方法	64
第4節	制限酵素地図の作成	71
第5節	inverse PCR法を用いたフォスファターゼI遺伝子のクローニング及びその塩基配列の決定	72
第6節	GST-フォスファターゼI融合タンパク質の発現と精製	74
第7節	融合タンパク質が有するフォスファターゼ活性の温度依存性	75
第8節	小括	78
第6章	総括及び考察	79
第7章	要約	85
参考文献		87
謝辞		92

本論文では、以下の略号を使用した。

ADP ; adenosine 5'-triphosphate
3'-AMP ; adenosine 3'-monophosphate
5'-AMP ; adenosine 5'-monophosphate
BAP ; Bacterial alkaline phosphatase
BSA ; bovine serum albumin
CBB ; coomassie brilliant blue
CM- ; carboxymethylated-
CTP ; cytidine 5'-triphosphate
DACM ; *N*-(7-dimethylamino-4-methyl-coumarinyl)maleimide
DEAE- ; diethylaminoethyl-
DEPC ; diethylpyrocarbonate
DFP ; diisopropylfluorophosphate
DTT ; dithiothreitol
EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA ; ethyleneglycol bis(2-aminoethyl-ether)tetraacetic acid
FPLC ; Fast Protein Liquid Chromatography
GST ; glutathione-S-transferase
GTP ; guanosine 5'-triphosphate
Hepes ; *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HPLC ; High Performance Liquid Chromatography
IPTG ; isopropyl-1-thio- β -D-galactoside
MALDI-TOF ; Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MBP ; myelin basic protein
MES ; 2-morpholinoethanesulfonic acid
MIAA ; mono iodoacetic acid
MIAM ; mono iodoacetamide
NEM ; *N*-ethylmaleimide
PAGE ; polyacrylamide gel electrophoresis
PCMB ; *p*-chloromercuribenzoic acid
PCMPS ; *p*-chloromercuriphenylsulfonic acid
PCR ; polymerase chain reaction
PKA ; protein kinase A
PMSF ; phenylmethanesulfonyl fluoride
pNP ; *p*-nitrophenol
pNPP ; *p*-nitrophenylphosphate
polyEY ; poly(Glu₄, Tyr₁)
PTK ; protein-tyrosine-kinase
PTPase ; protein-tyrosine-phosphatase
PVDF ; polyvinylidene fluoride
SDS ; sodium dodecyl sulfate
SH ; sulfydryl-
TCA ; trichloroacetic acid
TFA ; trifluoroacetic acid

第1章 序論

近年、タンパク質化学分野の研究対象は、「構造と機能の相関性」と「高次構造の形成」に集約されている。「構造と機能の相関性」に関しては、さまざまな環境条件（温度、pH、圧力、塩濃度等）下において機能するタンパク質が対象となっている。特に、中温域（20～45℃）から高温域（45℃以上）で機能するタンパク質についての研究例は、数多く認められる。その中でも、高温域で機能するタンパク質である耐熱酵素は、工業的利用価値の高さから研究者の興味を喚起し、さまざまな研究が進められ、その構造と機能の相関性について多くの知見が蓄積されている。1991年に、Jaenickeらにより、耐熱酵素は、高温による変性を防ぐために、その強固な立体構造を導く構造的要因を有していることが報告されている¹⁾。その要因として、 α -ヘリックス間やプロリンによるループ中における非共有結合的相互作用（塩橋、疎水性相互作用、弱い極性相互作用、水素結合等）と共有結合（ジスルフィド結合）の単独、あるいは複数の組み合わせが挙げられる。

それに対して、低温域（0～15℃）で機能する酵素タンパク質である低温酵素は、常温域で不安定であることから単離が困難であり、その構造と機能の相関性についての研究は、未だ立ち遅れているのが現状である。低温酵素は、その低温域での活性の高さと常温における熱不安定性から、多くの実験手法及び工業的利用におけるツールとしての利用価値を秘めている。例えば、実験手法には、低温での酵素反応後に常温において、速やかにその活性を消失したい場合、また、工業的生産過程においては、低温条件下での効率のよい触媒反応が必要な場合に、その有効利用が期待される。したがって、低温酵素の構造と機能の相関性を解明することは、耐熱酵素についての研究と同様に大きな意義を持つものである。

この低温酵素については、現在までにいくつかの遺伝子がクローニングされ、組み換えタンパク質を *Escherichia coli* 等により発現させた後、それらの特性が調べられている。その例として、好冷菌 *Bacillus TA41* の低温ズブチリシン（EC

3.4.21.14)、*Psychrobacter immobilis* B10の低温トリオースリン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.1)、*Moraxella* TA137の低温リパーゼ (EC 3.1.1.3) 等が挙げられる。これらの温度に対する酵素的性質を基にして、現在、低温酵素は、i) 低温で高い活性を示す、ii) 反応最適温度が、対照酵素 (アミノ酸配列及び高次構造が類似で同様の活性を示す酵素) のそれと比較して低温側にシフトしているといった特性により定義づけられている²⁾。このうち、低温ズブチリシンについての知見から、低温酵素の構造は、熱変性に耐えられる強固な立体構造を有する耐熱酵素とは異なり、柔軟性に富む立体構造を有し、それ故、低温条件においても安定して機能を発揮できると推測されている³⁾。

しかし、低温酵素に関する研究例は、多く認められていないため、低温酵素の特性を導き出す分子機構についての情報は、断片的なものとなり、普遍的基盤としては不十分である。そこで、全ての低温酵素に普遍的な分子機構を解明するためには、低温酵素についてのより多くの知見を蓄積することが必要となる。

本研究では、この低温酵素の構造と機能の相関性に関する有用な知見を、さらに蓄積するために、低温酵素の分子特性を詳細に解析することを目的とした。

南極に生育する巻貝から単離した好冷菌 (*Shewanella* sp.) の生育温度は0~15°Cであるので、低温酵素の単離源として適していると考え、下記の理由から好冷菌 (*Shewanella* sp.) の有するフォスファターゼに着目した。

脱リン酸化酵素であるフォスファターゼは、さまざまなリン酸化合物の脱リン酸化能を通じて、細胞周期⁴⁾、細胞内情報伝達⁵⁾、糖代謝⁶⁾、脂質代謝⁷⁾、リン酸の供給経路⁸⁾等において重要な役割を担っている。このことから、好冷菌のフォスファターゼもそのような役割を担っており、それ故に、この酵素が低温環境に十分適応していると考えられる。また、この酵素の活性測定法が簡便であること、*Escherichia coli*のアルカリフォスファターゼ⁹⁾をはじめ、プロテインフォスファターゼ等多くの分子種について、その一次構造、立体構造に関する情報が蓄積されており、好冷菌のもつフォスファターゼについての知見と比較検討することができるといった根拠から、本研究の遂行にあたり、適した

酵素タンパク質であると判断できる。

以下、第2章では、低温フォスファターゼの分離精製法の確立を、第3章で精製酵素の酵素的性質、第4章で、フォスファターゼIの理化学的性質について、また、第5章では、フォスファターゼIの遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定、及び大腸菌による組み換えタンパク質の発現について記述するとともに、第6章に総括と総合的考察を加えた。

第2章 低温フォスファターゼの分離精製^{10,11)}

第1節 緒言

第1章、序論においても述べたように、低温酵素は、非常に熱に対して不安定である。そのため、好冷菌菌内からの分離精製法についてはあまり報告されておらず、専ら、その遺伝子クローニング及び大腸菌での大量発現による組み換えタンパク質として低温酵素を得ているのが現状である。

しかし、本研究においては、組み換えタンパク質としてではなく、実際に生体内で機能している酵素を実験材料とすることで、低温酵素について、より正確且つ有用な知見が得られるものと判断した。故に、低温酵素を均一な標品として得ることが、本研究の遂行において、最初で且つ必須のステップとなる。

そこで、本章においては、南極で生育する巻貝より単離した好冷菌(*Shewanella* sp.)の培養法とフォスファターゼ活性測定法を記述し、各種クロマトグラフィーを用いた低温フォスファターゼの分離精製法の確立を試みた。

第2節 実験材料

好冷菌 (*Shewanella* sp.) は、佐賀大学農学部応用生物科学科 渡辺啓一助教授より御恵与頂いた。本好冷菌の生育最適温度は、10～15℃でダブリングタイムは、約6時間である。

Aquamarine は、八洲薬品(株)より購入した。Polypeptone は日本製薬(株)から、Bacto-yeast extract、Proteose peptone No.3、Bacto-soytone は、Difco Laboratory社より購入した。Iron (III) citrate *n* hydrate、sorbitol は、Nacalai Tesque社の一級試薬を用いた。フォスファターゼの基質である pNPP と検量線作成に用いた pNP、銀染色キットは和光純薬工業(株)より購入した。DEAE-Cellulofine A-500m、butyl-Cellulofine s-m は、生化学工業(株)社製、hydroxylapatite は、三井東圧化

学社製のものを用い、HiTrap™ Desalting、Hi prep. Sephacryl S-100 HR 16/60、Mono-Q HR 5/5 カラムは、Pharmacia LKB 社より購入した。遠心濃縮器は、Amicon 社の Centricon 10 (10,000 MW cut) を用いた。その他の試薬については、特級試薬を使用した。

第3節 好冷菌 (*Shewanella* sp.) の培養

第1項 培地組成

好冷菌の培養に際しては、Table 2-1 に示すような液体培地を調製し、三角フラスコ (500 ml 容) に 170 ml 分注した後、フラスコの口をアルミホイルで蓋をし、1.2 気圧、120°C で 20 分間、オートクレーブ滅菌を行った。

Table 2-1. Component of culture medium.

Polypeptone	2.0 g
Bacto yeast extract	1.0 g
Bacto proteose peptone No.3	1.0 g
Bacto soytone	1.0 g
Iron(III)citrate <i>n</i> hydrate	0.1 g
Aquamarine	A(liquid): 36.5 g B(solid) : 22.5 ml
	per 1 liter pH 7.5

第2項 培養法

(1) 前培養

15%(w/v)の glycerol を含む培地中で-80°Cのフリーザーに保存しておいた菌体溶液を、オートクレーブ滅菌した爪楊枝を用いて、200 ml 容の三角フラスコ中の新鮮な培地 90 ml に植菌し、7°Cで4日間振盪培養した。

(2) 本培養

前培養によって得られた培養液 1.7 ml をクリーンベンチ内で 500 ml 容の三角フラスコ中の新鮮な培地 170 ml に加えることによって植菌し、7°C で 3 日間振盪培養した。なお、2 回目以降の植え継ぎでは、菌体収穫後の三角フラスコに新鮮な培地を 170 ml 加えることで植菌した。

第 3 項 菌体の収穫

培養液を回収し、1,000×g で 5 分間遠心分離し、沈澱として得られた菌体を少量の Aquamarine 溶液で 2 回洗浄し、液体窒素で凍結後、実験に供するまで、-30°C のフリーザー中で保存した。

第 4 節 フォスファターゼの活性測定

分離精製過程におけるフォスファターゼ活性は、以下の方法で測定した。

活性の定量のために予め反応産物である pNP の 410 nm の吸収に基づき、検量線を作成した。酵素反応系は、終濃度 25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、2.5 mM MgCl₂、0.5 M sorbitol、1 mM pNPP 及び、適当量の酵素液からなる全容量 20 µl と設定した。反応は、25°C で 1 分間プレインキュベートしておいた反応液に酵素液を加えることによって開始した。さらに、同温度で 15 分間インキュベートした後に、0.1 N NaOH を 200 µl 加えることにより反応を停止した。停止した反応液の 410 nm の吸収を測定し、反応産物を検量線より定量した。ここで、酵素液を加える前に 0.1 N NaOH を加え、同様に測定したものをコントロールとし、フォスファターゼ 1 unit は、1 分間に 1 µmol の pNP を産生する量とした。

第5節 低温フォスファターゼの分離精製

本節以降では、特に記述しない限り全ての操作は、0~4℃で行った。また、下記の各種緩衝液を調製し、実験に供した。

緩衝液 A : 25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol、
2 mg/ml Pepstatin A

緩衝液 B : 25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol、
2 mg/ml Pepstatin A、1 mM PMSF

緩衝液 C : 25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol

緩衝液 D : 25 mM sodium phosphate (pH 6.8)、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol

緩衝液 E : 300 mM sodium phosphate (pH 6.8)、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol

以上の緩衝液中の MgCl₂ 及び sorbitol は、それぞれ、2.5~5 mM、0.2~1.0 M の濃度で 4~25℃における低温酵素の安定化に関わるため、精製過程に使用する緩衝液に共存させた。

本節で記述する低温フォスファターゼの精製過程についてのフローチャートを Figure 2-1 に示す。

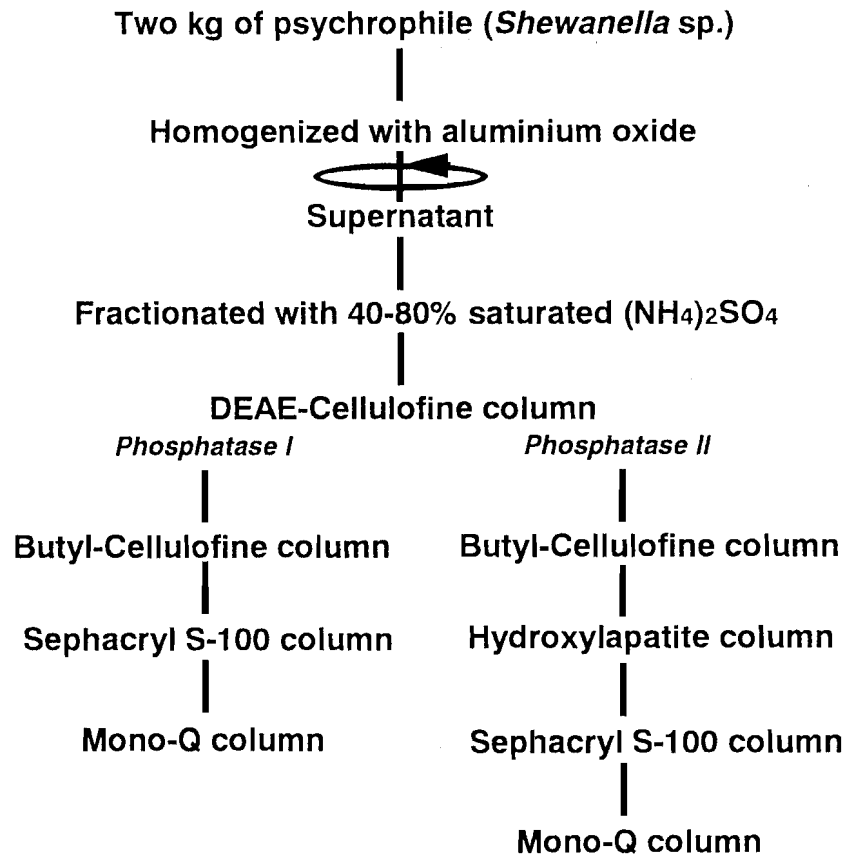


Figure 2-1. Purification procedure of psychrophilic phosphatases.

第1項 好冷菌菌体からのタンパク質の抽出

-30℃で凍結保存しておいた菌体 2 kg (湿重量) を 2 リットルの緩衝液 A に懸濁し、菌体と同重量の酸化アルミナを加えて乳鉢と乳棒で磨砕した。その懸濁物を 110×g で 10 分間遠心分離し、酸化アルミナを含む沈澱を除去し、さらに、1,500×g で 20 分間遠心分離後、得られた上清をタンパク質抽出画分 (Crude extract) とした。さらに、ここで得られた沈澱については、同様の操作で 2 回タンパク質を抽出し、得られた上清をタンパク質抽出画分に加えた。

第2項 硫酸塩析による分画

前項で得られたタンパク質抽出画分に、固体の ammonium sulfate を 40%飽和となるように加え、1,500×g で 20 分間遠心分離することにより上清を得た。この上清に、80%飽和となるように固体の ammonium sulfate をさらに加え、沈澱を回収した。

この沈澱物を少量の緩衝液 B に懸濁させ、同緩衝液に対して一晩透析することにより、ammonium sulfate を取り除いた。

以上の操作により、得られた透析内液を 40-80%飽和硫酸画分 [40-80% (NH₄)₂SO₄ fraction] とした。

第3項 DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

前項で得られた 40-80%飽和硫酸画分を予め緩衝液 C で平衡化しておいた DEAE-Cellulofine A-500m カラム (φ 2.2×62 cm) を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。非吸着画分を同緩衝液で溶出した後、吸着したタンパク質を 0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.5 M NaCl を含む緩衝液 C を用いて段階的に溶出し、溶出液を 17 ml ずつ分画した。この分画した各溶出液の 280 nm における吸光度とフォスファターゼ活性を、Figure 2-2 に示した。

この DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィーにより、フォスファターゼ活性は、0.05 M NaCl を含む緩衝液 C と 0.1 M NaCl を含む緩衝液 C による溶出画分に認められた。それぞれの画分に含まれるフォスファターゼを便宜上、フォスファターゼ I とフォスファターゼ II と命名し、それぞれ独立して精製を進めた。

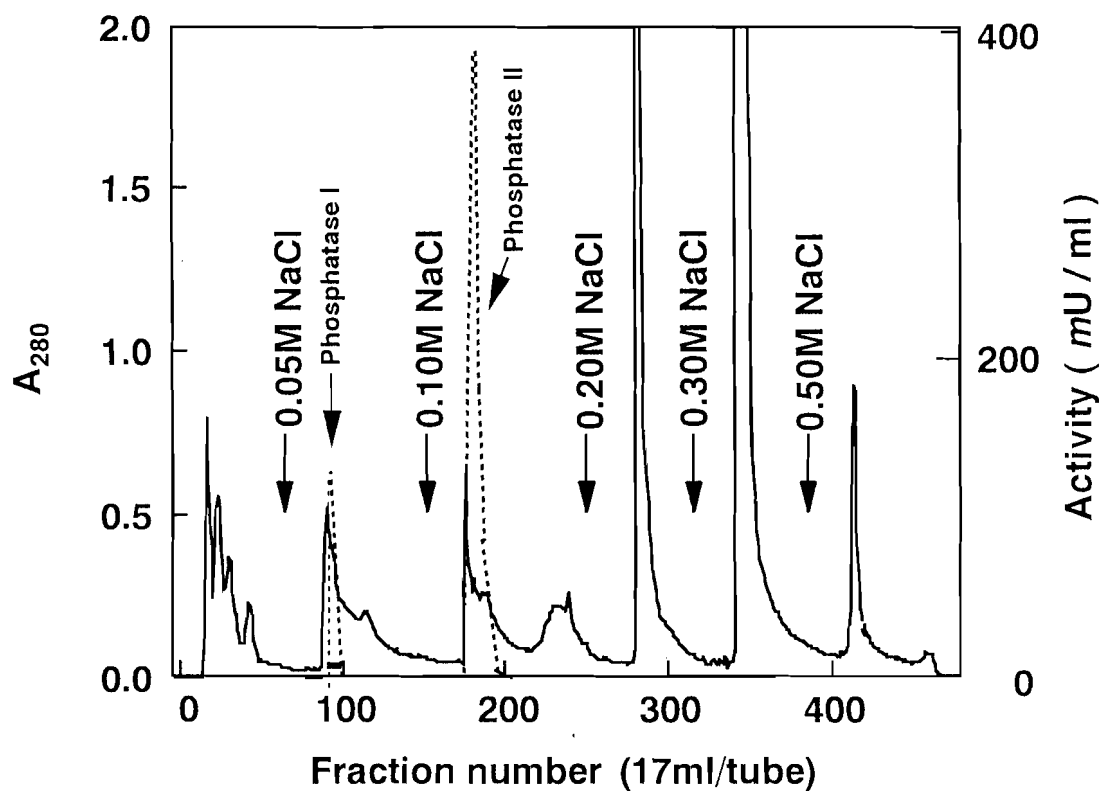


Figure 2-2. DEAE-Cellulofine column chromatography.

The crude enzyme preparation was applied to a column of DEAE-Cellulofine (ϕ 2.2 x 62 cm), and then adsorbed proteins were eluted stepwisely with NaCl. The flow rate was 1.5 ml/min.

Solid line, absorbance profile at 280 nm. *Dotted line*, phosphatase activity.

第4項 Butyl-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

本項以降のクロマトグラフィーにおいては、特に記述のない限り、試料の供与及び溶出は、Pharmacia LKB 社製の FPLC システムを用いて行った。溶出液の 280 nm における吸光度を日立 L-4000 型 UV 検出器を用いて測定し、日本電気科学社製の U228 型記録計により記録した。前節で得られたフォスファターゼ I 及び II 活性画分のそれぞれの画分に、スターラーで攪拌しながら、終濃度 0.92 M となるように固体の ammonium sulfate を加え、2,500×g で 10 分間遠心分離した。それぞれの上清を 0.92 M ammonium sulfate を含む緩衝液 C で予め平衡化した butyl-Cellulofine s-m カラム (φ 1.5×46 cm) を用いたクロマトグラフィーに供与した。非吸着画分を同緩衝液で溶出させた後、吸着物を ammonium sulfate 濃度 0.92 M から 0 M までの直線濃度勾配法により溶出した。その溶出パターンとフォスファターゼ活性を Figure 2-3 に示した。

その結果、フォスファターゼ I の活性は、ammonium sulfate 濃度 0.35 M から 0 M の間に、フォスファターゼ II の活性は、0.46 M から 0.3 M の間に溶出された。

さらに、フォスファターゼ I を含む活性画分は Sephacryl S-100 HR 16/60 を用いたゲル濾過に、フォスファターゼ II を含む活性画分は、Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィーに供した。

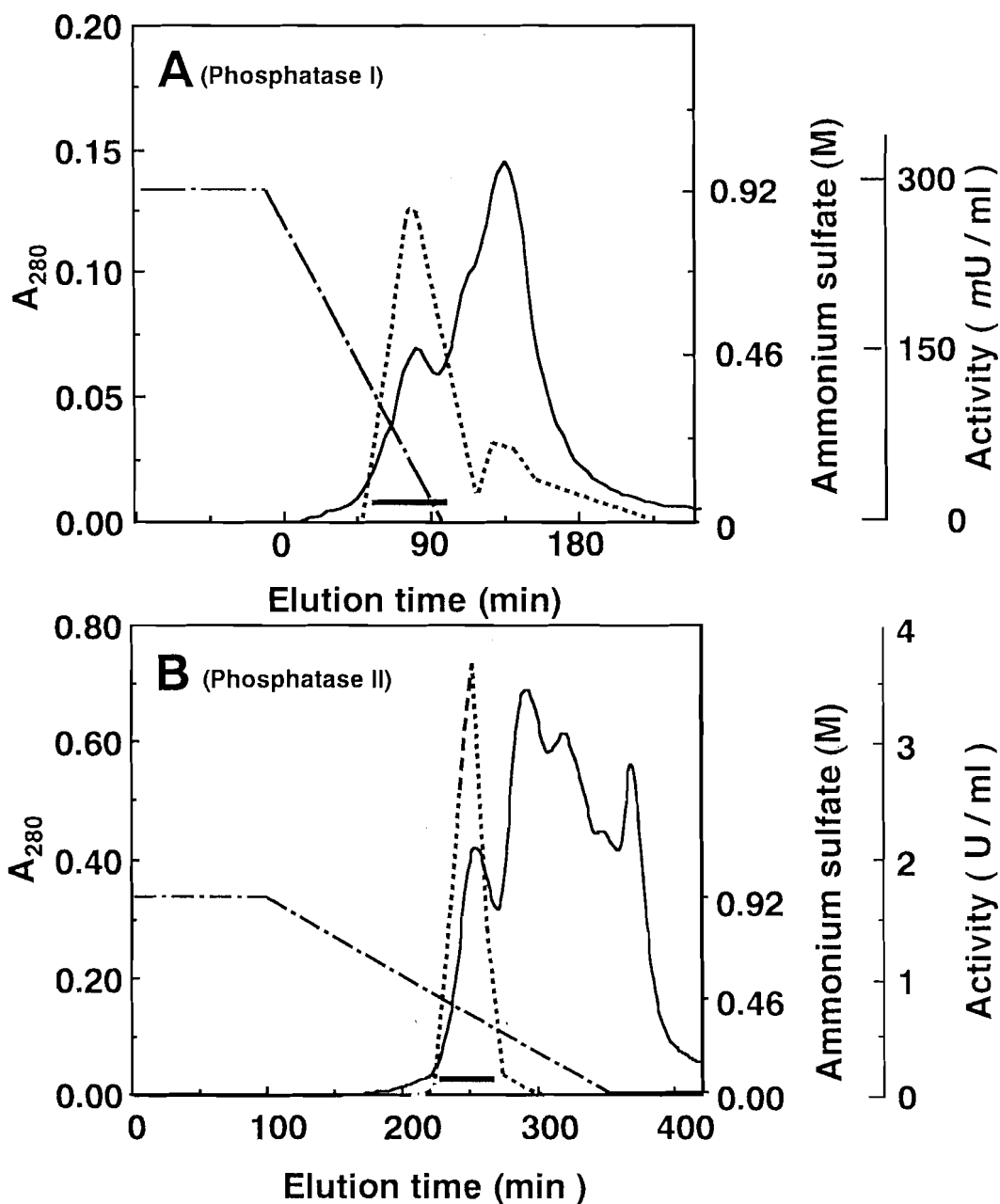


Figure 2-3. Butyl-Cellulofine column chromatography.

The active fractions (0.05 M, 0.1 M NaCl-eluates) on DEAE-Cellulofine column chromatography, containing phosphatase I and II, respectively, were applied to a column of Butyl-Cellulofine (ϕ 1.5 x 46 cm) equilibrated with 0.92 M ammonium sulfate in buffer C and then adsorbed proteins were eluted with an inverse linear gradient of 0.92 M to 0 M ammonium sulfate.

The flow rate was 0.5 ml/min. *Solid, dashed and dotted line*, absorbance profile at 280 nm, elution gradient of ammonium sulfate and phosphatase activity, respectively. A: Phosphatase I, B: Phosphatase II.

第5項 Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィー

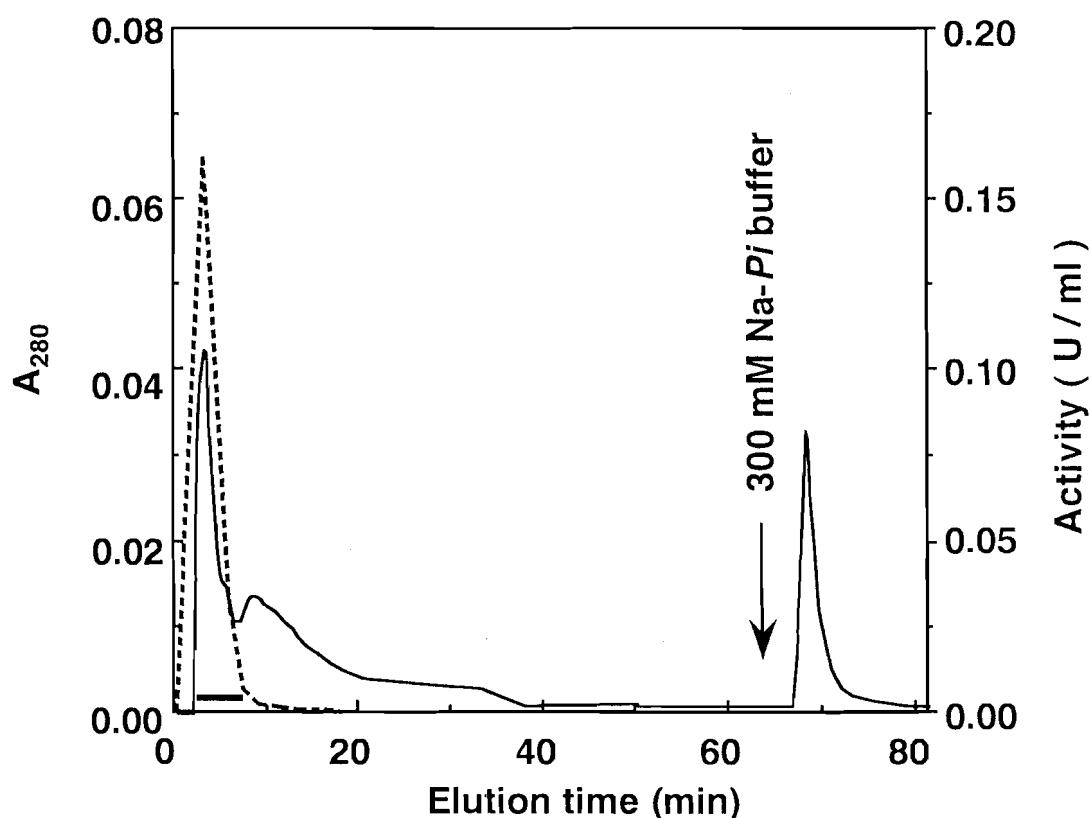


Figure 2-4. Hydroxylapatite column chromatography.

The active fractions on Butyl-Cellulofine column chromatography, containing Phosphatase II, were applied to a column of hydroxylapatite column (ϕ 1.0 x 10 cm) equilibrated with buffer D and adsorbed proteins were eluted with buffer E. The flow rate was 0.5 ml/min.

Solid and dotted line represent absorbance profile at 280 nm and phosphatase activity, respectively.

前項で得られたフォスファターゼ II を含む活性画分を遠心濃縮器により、約 3 ml まで濃縮し、7,000×g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を緩衝液 D で予め平衡化しておいた脱塩カラム (HiTrap™ Desalting カラム、カラム体積 5ml) に供与し、活性画分の緩衝液を C から D に交換した。

これにより得られた画分を緩衝液 D で予め平衡化しておいた Hydroxylapatite カラム (φ 1.0×10 cm) に供与した。非吸着画分を同緩衝液で溶出した後に、吸着タンパク質を緩衝液 E で溶出した。その溶出像とフォスファターゼ活性の測定結果を Figure 2-4 に示した。フォスファターゼ II の活性は、非吸着画分に検出された。次に、この活性画分を Sephacryl S-100 HR 16/60 カラムを用いたゲル濾過に供した。

第 6 項 Sephacryl S-100 HR 16/60 カラムによるゲル濾過

前々項及び前項で得られたフォスファターゼ I 及び II の活性画分をそれぞれ、遠心濃縮器により、約 2 ml まで濃縮し、2,500×g で 10 分間遠心分離した。それぞれの上清を予め緩衝液 C で平衡化しておいた Sephacryl S-100 HR 16/60 カラム (φ 1.6×60 cm) に供与した。その溶出像とフォスファターゼ活性測定の結果を Figure 2-5 に示した。

フォスファターゼ I の活性は、溶出時間およそ 97 分から 120 分間に検出され (パネル A)、フォスファターゼ II の活性は、95 分から 115 分間に検出された (パネル B)。

それぞれのフォスファターゼをさらに精製を進めるために、Mono-Q HR 5/5 を用いたカラムクロマトグラフィーに供した。

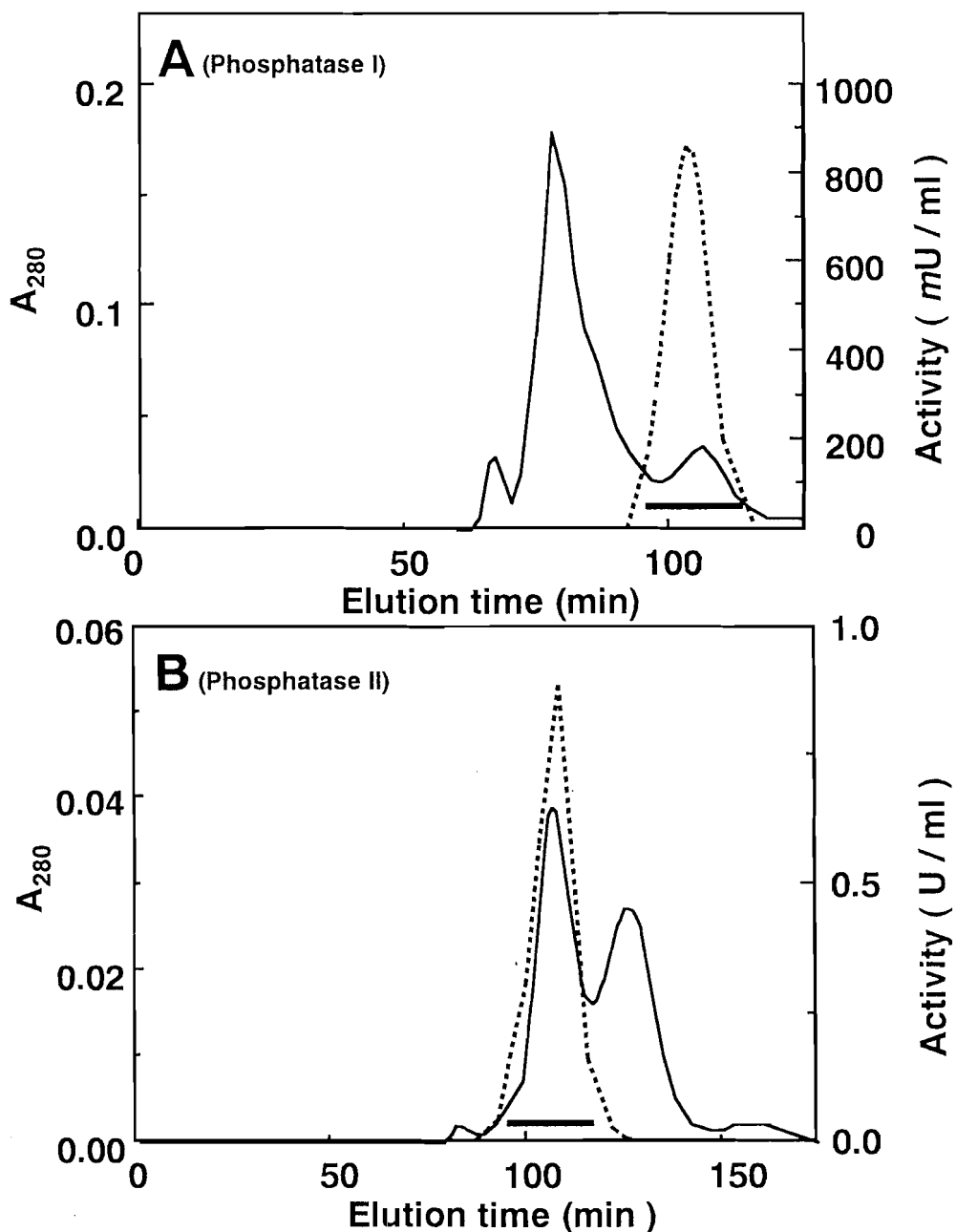


Figure 2-5. Gel filtration on a Sephacryl S-100 HR 16/60 column.

The active fractions on Butyl-Cellulofine and Hydroxylapatite column chromatography, containing Phosphatase I and II, respectively, were applied to a column of Sephacryl S-100 HR 16/60 (ϕ 1.6 x 60 cm).

The flow rate was 0.5 ml/min. *Solid*, and *dotted line* represent absorbance profile at 280 nm and phosphatase activity, respectively. A: Phosphatase I, B: Phosphatase II.

第7項 Mono-Q HR 5/5 カラムクロマトグラフィー

前節で得られた2種のフォスファターゼ活性画分をそれぞれ、緩衝液Cで予め平衡化しておいた Mono-Q HR 5/5 カラム (ϕ 0.5×5 cm) を用いたカラムクロマトグラフィーに供与した。非吸着画分を同緩衝液で溶出し、吸着タンパク質を NaCl 濃度 0 M から 0.3 M までの直線濃度勾配法により溶出した。

その溶出像とフォスファターゼ I 及び II の活性は、それぞれ、NaCl 濃度 0.05 M から 0.08 M の間 (Figure 2-6) と 0.1 M から 0.12 M の間に溶出された (Figure 2-7)。さらに、それぞれのフォスファターゼ活性画分を緩衝液 C で 4 倍希釈して、再び Mono-Q HR 5/5 カラムに供与した。そのリクロマトグラフィーの結果をフォスファターゼ I については、Figure 2-6 の挿入部分、II については、Figure 2-7B に示した。その結果、両フォスファターゼは、単一のピークとして溶出された。

以上のフォスファターゼ I、II の精製表を、それぞれ、Table 2-2、2-3 に示した。

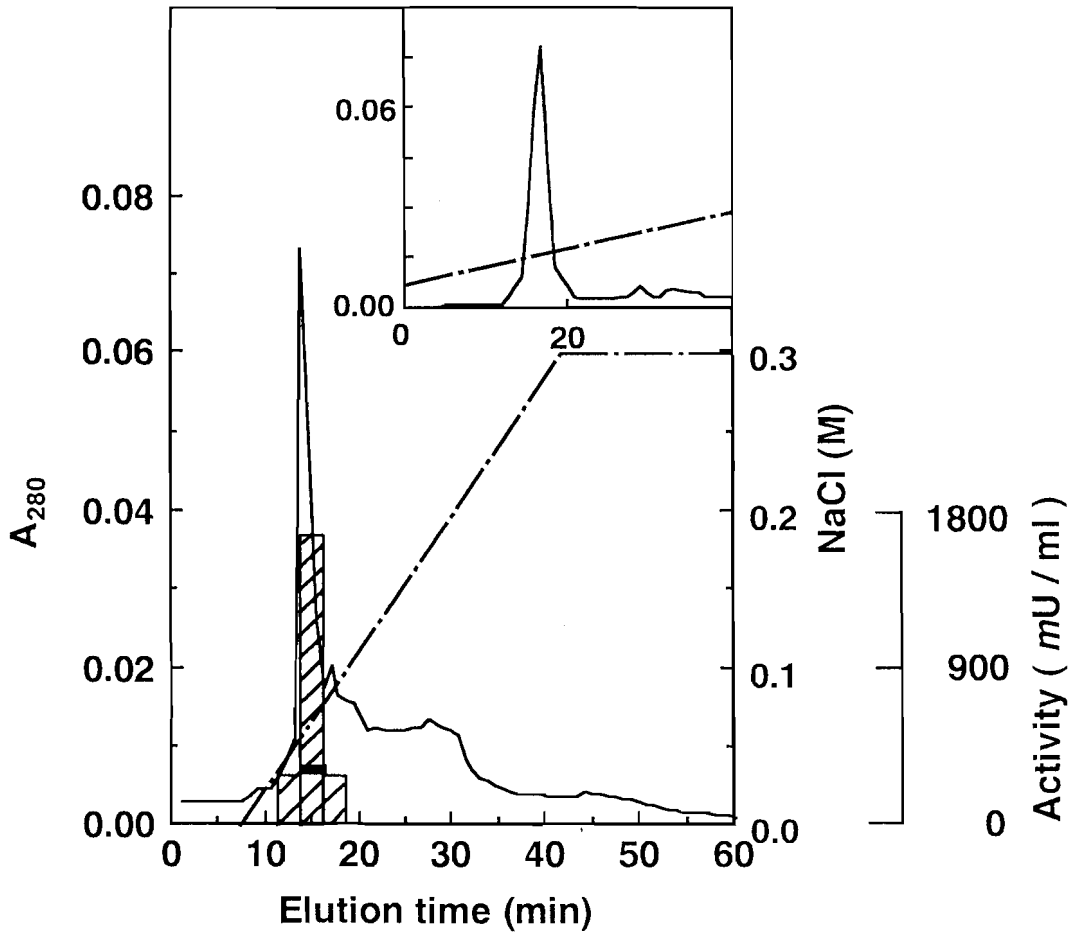


Figure 2-6. Mono-Q HR 5/5 column chromatography (Phosphatase I).

The active fractions on Sephacryl S-100 column, containing Phosphatase I, were applied to a column of Mono-Q HR 5/5 (ϕ 0.5 x 5 cm) and then adsorbed proteins were eluted with a 20-ml-linear gradient of 0 M to 0.3 M NaCl.

Solid and *dashed line* represent absorbance profile at 280 nm and elution gradient of NaCl, respectively. *Striped column* was phosphatase activity.

The inset represents the elution profile on rechromatography of the active fractions on Mono-Q HR 5/5 column.

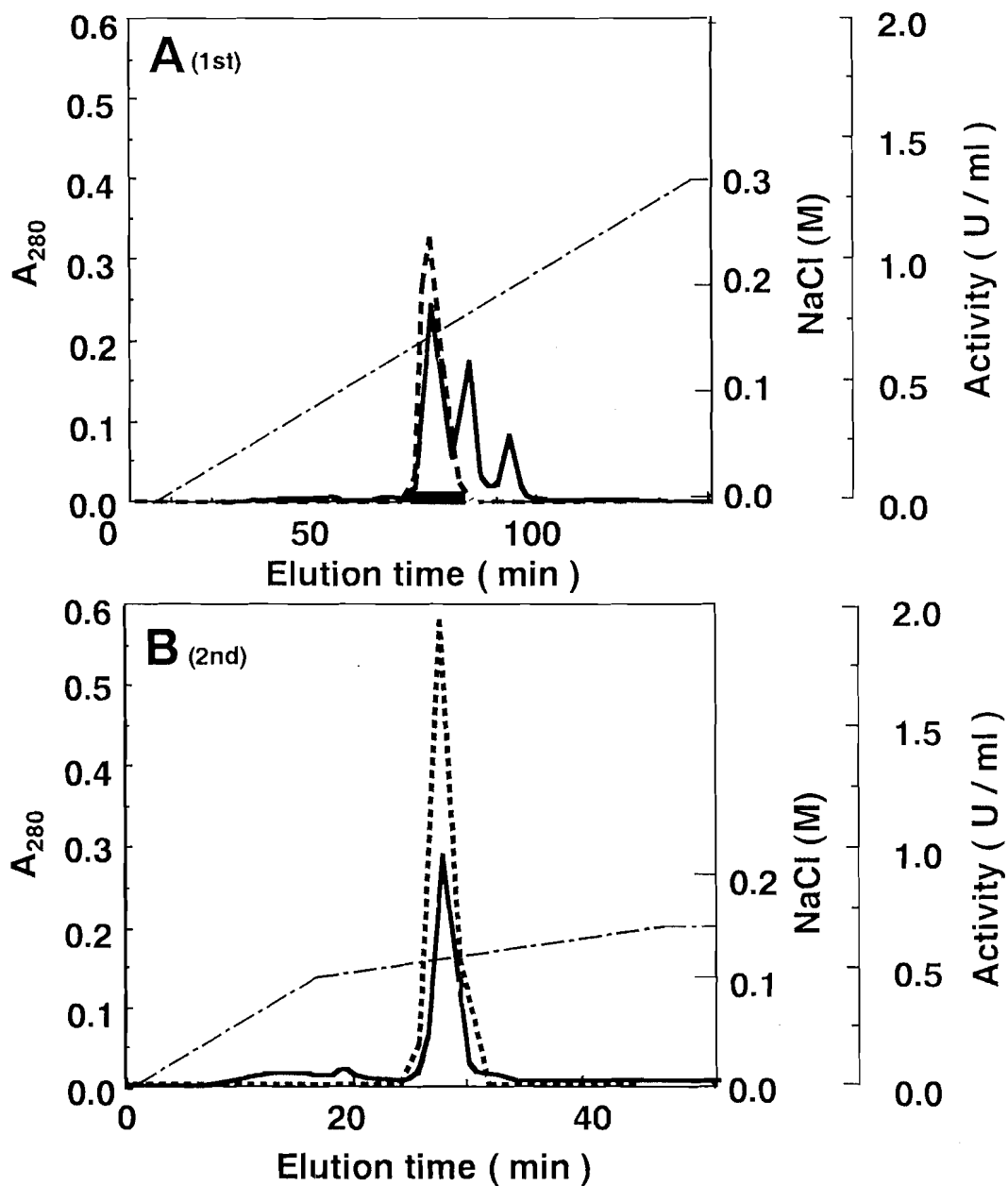


Figure 2-7. Mono-Q HR 5/5 column chromatography (Phosphatase II).

Panel A, Proteins in the active fraction on Sephacryl S-100 column, containing Phosphatase II, were applied to a column of Mono-Q HR 5/5 (ϕ 0.5 x 5 cm) and then adsorbed proteins were eluted with a 20 ml-linear gradient of 0 M to 0.3 M NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min.

Panel B, The elution profile of rechromatography of the active fractions on a Mono-Q HR 5/5 column.

Solid, dashed and dotted line represent absorbance profile at 280 nm, elution gradient with NaCl and phosphatase activity, respectively.

Table 2-2. Purification of phosphatase I from a psychrophile.

Steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	65,800	822	0.013	100	1.00
40-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	16,400	393	0.024	47.8	1.92
DEAE-Cellulofine	208	36.1	0.174	4.39	13.9
Butyl-Cellulofine	15.8	26.4	1.67	3.21	133
Sephacryl S-100	1.44	25.9	18.1	3.15	1440
Mono-Q	0.260	15.1	58.0	1.83	4650

Table 2-3. Purification of phosphatase II from a psychrophile.

Steps	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	65,800	822	0.013	100	1.00
40-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	16,400	393	0.024	47.8	1.92
DEAE-Cellulofine	664	270	0.41	32.8	32.8
Butyl-Cellulofine	28.5	245	8.60	29.8	688
Hydroxylapatite	10.2	186	18.2	22.6	1456
Sephacryl S-100	6.61	144	21.8	17.5	1744
1st Mono-Q	1.78	121	68.0	14.7	5440
2nd Mono-Q	1.04	108	104	13.1	8320

第8項 精製フォスファターゼ I 及び II の均一性の検討

前項までの精製ステップより得られたフォスファターゼ I 及び II の活性画分を、SDS-PAGE¹²⁾ と pH 8.8 の分離ゲルを用いた Native-PAGE¹³⁾ に供することにより、それぞれの精製フォスファターゼの均一性を検討した。

その結果、Figure 2-8 に示すように、SDS-PAGE、Native-PAGE に供し、銀染色法¹⁴⁾ によりタンパク質を染色したところ、フォスファターゼ I、II 共に、単一なバンドとして得られた。このことから、最終精製標品は、電気泳動的に均一であることが示された。特に、SDS-PAGE においては、フォスファターゼ I が 38.4 kD、フォスファターゼ II が 41 kD の分子量を有すること、また、還元剤である 2-mercaptoethanol の存在下、非存在下のどちらの条件においても、両フォスファターゼの泳動パターンに変化はないことから（データ示さず）、両酵素がモノマーであることが同時に示された。

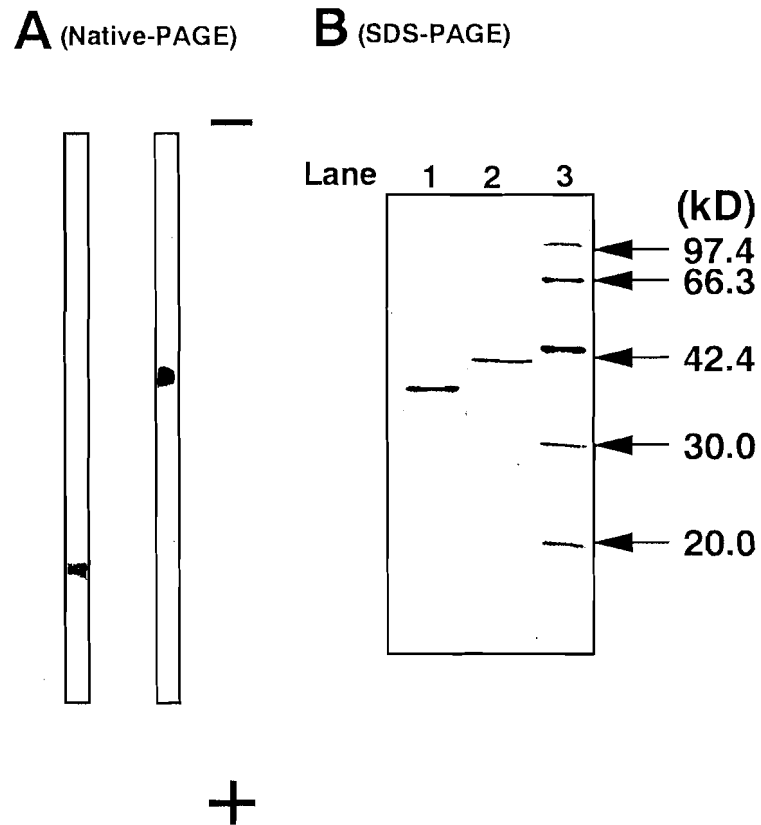


Figure 2-8. Homogeneity of purified phosphatases from a psychrophile.

Panel A, Native-PAGE (pH 8.8).

Left disc: Phosphatase I (180 ng), *right disc*: Phosphatase II (180 ng).

Panel B: SDS-PAGE.

Lane 1: Phosphatase I(180 ng), *Lane 2*, Phosphatase II (200 ng),

Lane 3: molecular weight markers containing rabbit phosphorylase b (97,400), bovine serum albumin (66,300), rabbit aldolase (42,400), bovine carbonic anhydrase (30,000), and soybean trypsin inhibitor (20,100).

第6節 小括

本章においては、第1節 緒論において述べたように、好冷菌に内在するフォスファターゼの分離精製を目的として実験を行った。その結果、好冷菌菌体を磨砕、硫酸分画、さらに DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィーに供することにより、フォスファターゼ活性は、0.05 M NaCl、0.1 M NaCl を含む溶出画分に分画され、それぞれの画分に含まれるフォスファターゼをフォスファターゼ I、II と命名した。次いで、さらに、精製を進めるために、それぞれの活性画分を Butyl-Cellulofine、Hydroxylapatite、Sephacryl S-100、Mono-Q カラムを用いたクロマトグラフィーに順次供与した。

Table 2-2、2-3 に要約しているように、フォスファターゼ I は、58 units/mg の比活性を示し、38.4 kD の分子量を有するタンパク質として、活性収率 1.83 %、精製倍率 4650 倍に精製され、フォスファターゼ II は、104 units/mg の比活性を示し、41 kD の分子量を示すタンパク質として、活性収率 13.1 %、精製倍率 8320 倍に分離精製された。本実験において、フォスファターゼの安定化のために、5 mM MgCl₂、1 M sorbitol を含んだ緩衝液を精製過程に使用したことが、熱に対して不安定である低温酵素の分離精製を可能にしたと考えられる。

また、精製酵素の均一性の検討を行った際に、両フォスファターゼ共に還元剤の存在下、非存在下に関わらず、電気泳動において単一なバンドとして泳動されたことから、両酵素とも、好冷菌菌体内においてモノマーとして機能していることが示唆された。

以上、好冷菌 (*Shewanella* sp.) より、各種クロマトグラフィーを用いた2分子種のフォスファターゼの分離精製法を確立した。

第3章 フォスファターゼ I 及び II の酵素的性質^{10,11,15)}

第1節 緒言

前章までに、低温酵素の分子特性の解明のための実験材料として、2種のフォスファターゼを得た。

現在までに、フォスファターゼは、さまざまな生物種から分離精製されており、その酵素的性質である反応至適 pH から酸性フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼという大きな二つのカテゴリーに分類され、特性化されている。

本章では、これら2種のフォスファターゼの機能を検討する上で重要である、pH安定性、pH依存性、また、低温酵素として特徴的であると考えられる熱安定性、温度依存性、さらに、金属要求性、基質特異性などの酵素的性質を検討した。また、フォスファターゼ I に対する各種阻害剤の影響及びこの酵素の活性中心アミノ酸残基の決定を行った。

第2節 実験材料

第1項 試薬及び実験動物

フォスファターゼ活性測定に用いた pNPP、pNP、PTK の部分精製に用いた DEAE-Cellulofine A-500m については、第2章 第2節に記述した。O-phospho-L-tyrosine、O-phospho-L-serine、O-phospho-L-threonine とその他のリン酸化合物、Protein kinase A catalytic subunit (166 units/mg)、PCMB、PCMPS、NEM、DEPC、MIAM は、Nacalai Tesque 社より、*Escherichia coli* C75 由来のアルカリフォスファターゼ (BAP C75、191 units/mg) は、和光純薬工業より購入した。平均分子量 37kD の polyEY、脱リン酸化済 Casein、MBP、phosphorylase b、phosphorylase kinase

(240 units/mg)は、Sigma Chemical社製のものを、bovine histone H1は、GIBCO BRL, Life Technologies社製のものを使用した。[1-¹⁴C] MIAA (10 mCi/mmol)は、American Radiolabeled Chemicals社、[γ -³²P] ATP (4500 Ci/mmol)は、ICN Biomedicals社、ラット (Male WistarST、SPF、7週齢)は、日本 SLC社より購入した。シリカゲルプレート (20×20 cm、250 μ m厚)は、Whatman社のものを使用した。その他の試薬は、特級のものを使用した。

第2項 タンパク質の定量

本節でのフォスファターゼ I 及び II の量は、それぞれの分子吸光係数^{10,11)}から算出した。また、プロテインフォスファターゼ活性測定の際に使用した各タンパク質の重量は、それぞれ精密天秤で精秤した。

第3節 実験方法

第1項 Rat Protein Tyrosine Kinase の調製

PTKは、Brunatiらの方法¹⁶⁾に基づき、次のように部分精製した。5匹のラットから摘出した脾臓 (約 15 g) を 70 % ethanol で消毒したハサミで細かく切断し、30 ml の破碎用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、2 mM MgCl₂、1mM EDTA]中に懸濁させた。この懸濁物を、ヒスコトンホモジナイザー (ニチオン理科器製作所製) を用いて、1 分間破碎し、1,000×g で、10 分間遠心分離した。この遠心分離により、核画分と未破碎の細胞が沈澱として取り除かれた。さらに、その上清を 30,000×g で 30 分間遠心分離した。得られた沈澱を 10 ml のタンパク質抽出用緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10%(w/v) glycerol、1 mM EDTA、10 mM 2-mercaptoethanol、1%(v/v) NP-40、0.1 mM PMSF]に再懸濁し、この懸濁物

を、ヒスコトロンホモジナイザーを用いて、1分間破碎し、 $30,000 \times g$ で30分間遠心分離した。これにより得られた上清を膜タンパク質抽出画分として、クロマトグラフィー用緩衝液 [25 mM Hepes-NaOH (pH 7.0)、10% (w/v) glycerol、0.1 % (v/v) NP-40、1 mM EDTA、10 mM 2-mercaptoethanol、0.1 mM PMSF] に対して一晩透析した。この透析内液を、予めクロマトグラフィー用緩衝液で平衡化しておいた DEAE-Cellulofine A-500m (ϕ 1.0 \times 10 cm) カラムに供与した。非吸着画分を溶出後、吸着タンパク質を 0.1 M NaCl、0.3 M NaCl、0.5 M NaCl を含む同緩衝液で順次、溶出した。

DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィーの溶出画分の PTK の活性は、以下の方法¹⁷⁾ で測定した。

50 mM Tris-HCl (pH 7.8)、50 mM $MgCl_2$ 、10 μ M vanadate、60 μ M [γ -³²P] ATP (1000 cpm/pmol)、1 mM polyEY と適当量の酵素を含む全容量 50 μ l の反応系で、30°C、20分間インキュベートした。次いで、20 mg/ml の BSA 溶液を 10 μ l、20% (w/v) の TCA を 60 μ l 加えることにより反応を停止した。この TCA により生じた沈澱を 10% (w/v) TCA で3回洗浄し、液体シンチレーションカウンターに供した。その放射活性から polyEY に取り込まれたリン酸のモル数を定量した。

その結果、0.3 M NaCl を含むクロマトグラフィー用緩衝液による溶出画分に PTK の活性が認められた。この活性画分には、PTKII 及び III の2分子種の PTK が含まれ¹⁷⁾、PTPase 活性は認められなかった。

この方法により、比活性 849 units/mg の PTK 部分精製標品を得ることができ、以下の実験に使用した。

第2項 プロテインフォスファターゼ活性測定に用いる基質の調製

polyEY、MBP のチロシン残基のリン酸化は、次のように行った。0.4 mg の polyEY または、MBP と 169 units の PTK を 0.5 ml の 50 mM MgCl₂、10 mM sodium vanadate、60 μM ATP、0.88 nM [γ-³²P] ATP (2.1×10⁷ cpm)を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)中で 30℃、2 時間反応させた。次いで、その反応液を、0.1 mM sodium vanadate を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、さらに、25 mM MES-NaOH (pH 6.0)に対して、順次透析した。

histone H1、Casein のセリンまたは、スレオニン残基のリン酸化については、0.3 mg の bovine histone H1 あるいは、0.5 mg の Casein と 1.3 units の PKA catalytic subunit を、0.5 ml の 0.1 mM EGTA、10%(v/v) glycerol、0.1%(v/v) 2-mercaptoethanol、10 mM magnesium acetate、100 μM ATP、1.46 nM [γ-³²P] ATP (3.5×10⁷ cpm)を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)中で 30℃、16 時間反応させた。また、phosphorylase a は、0.5 mg の phosphorylase b を 1.2 units の phosphorylase kinase と 0.5 ml の 16 mM magnesium acetate、16 mM CaCl₂、100 μM ATP、1.46 nM [γ-³²P] ATP (3.5×10⁷ cpm)を含む 66 mM sodium glycerophosphate (pH 8.6)中で 30℃、10 分間インキュベートすることにより調製した。これらの反応液は、リン酸化 polyEY の調製と同様に透析した。

この操作により、1 mol の polyEY、MBP、histone H1、及び phosphorylase a に、それぞれ 0.44、0.37、0.61、1.0 mol、さらに 1 mg の Casein に 14.7 nmol の [³²P] リン酸が取り込まれた。

第3項 フォスファターゼ活性測定系

(1) フォスファターゼの pH 安定性、熱安定性を検討した際の残存活性は、次のように測定した。

フォスファターゼ I は、1 mM pNPP と 2.5 mM MgCl₂ を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で、20°C、30 分間インキュベートし、フォスファターゼ II は、1 mM pNPP と 2.5 mM MgCl₂ を含む 250 mM ethanolamine-HCl (pH 9.8) 中で、40°C、5 分間、また、BAP は、1 mM pNPP と 2.5 mM MgCl₂ を含む 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で、25°C、5 分間インキュベートした。それぞれ、0.1 N NaOH を加えることにより反応を停止し、生じた pNP の量を、予め作成しておいた検量線より算出し、残存活性を定量した。なお、この反応時間においては、フォスファターゼ I、II、BAP の反応は、直線的に進んだ。

(2) 精製酵素の活性の至適 pH を検討する際には、2.5 mM MgCl₂ と 1 mM pNPP を含む各 pH の緩衝液中で、フォスファターゼ I に関しては、20°C で 6 分間、フォスファターゼ II では、25°C、5 分間インキュベートし、0.1 N NaOH を加えることによって反応を停止した。

(3) 活性の最適温度の検討の際には、フォスファターゼ I の場合、2.5 mM MgCl₂ と 1 mM pNPP を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で、各温度で 6 分間インキュベートし、フォスファターゼ II、BAP は、それぞれ、2.5 mM MgCl₂ と 1 mM pNPP を含む 50 mM ethanolamine-HCl (pH 9.8)、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で、各温度で 5 分間インキュベートした。反応は、0.1 N NaOH を加えることにより停止し、検量線から生じた pNP のモル数を算出した。

(4) 精製酵素の活性に及ぼす金属の影響については、次の方法で調べた。

酵素液に含まれる金属イオンを除去するために、EDTA を最終濃度 10 mM になるように加えた後に、フォスファターゼ I では、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) に、フォスファターゼ II では、蒸留水に対して 2 日間、4°C で透析した。ここで得られた酵素溶液を用い、各々の金属イオンの存在下で、活性を測定した。ここで反応条件は、フォスファターゼ I については、25 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で、

30°C、30 分間、II では、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)中で、25°C、10 分間とした。

(5) 精製フォスファターゼの基質特異性を検討する際には、以下の方法で活性を測定した。

使用した緩衝液は、フォスファターゼ I では、25 mM MES-NaOH (pH 6.0)、II では、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)とした。

6.0 ng のフォスファターゼ I あるいは、24.0 ng のフォスファターゼ II を、2.5 mM MgCl₂ と最終濃度 4 mM 以下のさまざまなリン酸化合物を含む 40 μl の各緩衝液中において、フォスファターゼ I では、30°C、5 分間、フォスファターゼ II では、25°C、10 分間インキュベートした。8 μl の 40%(w/v) TCA を加えることにより、酵素反応を停止し、Kimelberg らの方法¹⁸⁾に基づき、産生された無機リン酸のモル数を定量した。

(6) フォスファターゼ I のプロテインフォスファターゼ活性の測定は、Hiraga らの方法¹⁹⁾を改良して行った。

6.0 ng (0.16 pmol) のフォスファターゼ I と、本節、第 2 項で調製した各基質タンパク質[22.5 pmol の ³²P-リン酸 (1.6×10⁴ cpm)を含む 2.0 μg のリン酸化 polyEY、または、30 pmol の ³²P-リン酸 (2.1×10⁴ cpm)を含む、0.9 μg のリン酸化 MBP、2.0 μg のリン酸化 Casein、1.0 μg のリン酸化 histone H1、2.9 μg の phosphorylase a]を、2 mM MgCl₂ と 15 μg の BSA を含む 15 μl の 25 mM MES-NaOH (pH 6.0)中で 30°C、0~60 分間反応させた。反応液に 160 μl の 10%(w/v) TCA を加えて、酵素反応を停止した後、15,000×g で 2 分間遠心分離した。得られた上清のうちの 150 μl に 25 μl の 5%(w/v) ammonium molybdate-4 N H₂SO₄、150 μl の isobutylalcohol-benzene(1v:1v)を加えた。遠心分離後、上層のうち 100 μl を LSC-5100 形液体シンチレーションカウンター (Aloka 社製)に供し、産生された無機リン酸のモル数をその放射活性から算出した。

(7) フォスファターゼ I への各種阻害剤の影響を調べる際には、その残存活性は、1 mM pNPP と 2 mM MgCl₂ を含む 25 mM MES-NaOH (pH 6.0)中で、30°C、5 分間インキュベートすることにより生じる pNP のモル数から算出した。

第4項 フォスファターゼ I の DEPC または、¹⁴C-MIAA による修飾

フォスファターゼ I は DEPC、¹⁴C-MIAA により次のように修飾した。

(1) DEPC による修飾：7.7 ng (0.2 pmol) のフォスファターゼ I を、各濃度の DEPC と 2 mM MgCl₂、2%(v/v) acetonitrile を含む 10 μl の 25 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で、15°C、0~10 分間インキュベートした。10 μl の 100 mM histidine (pH 7.0) を加えた後、前項に記載した方法により残存活性を測定した。

(2) ¹⁴C-MIAA による修飾：3 μg (80 pmol) のフォスファターゼ I と第 10 節において決定した、フォスファターゼ I の 5000 倍モル量である 400 nmol の ¹⁴C-MIAA を、2 mM MgCl₂ と 1 M sorbitol を含む 0.5 ml の 25 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で N₂ gas 存在下、15°C、2 時間、暗所でインキュベートした。その反応液から未反応の ¹⁴C-MIAA を除去するために、5%(v/v) acetic acid に対して透析した。その透析内液を凍結乾燥し、¹⁴C-MIAA でラベルされたタンパク質を、0.1%(v/v) phenol と 0.25%(v/v) 2-mercaptoethanol を含む 6 N HCl に溶解し、ガラス封管した試験管内で 110°C、25 時間加水分解した。

第5項 薄層電気泳動

前項(2)で得られた加水分解物を減圧下で乾燥し、50 μl の 20 mM HCl に溶解した。その溶解物を、等容量(25 μl)ずつに分け、一方は、CM-amino acid standard と共に、他方は単独で、silica gel plate 上にスポットした。電気泳動は、pyridine-acetic acid-water(100v:4v:900v)の緩衝液系 (pH 6.5) を用い、15°C、2 時間、6 mA の定電流で行った。電気泳動後、standard amino acid を、ninhydrin により発色させた。その後、プレートは、イメージング解析を行うために、Bio-imaging analyzer、BAS-1000 (Fuji Photo Film 社製) に供した。各 CM-histidine 誘導体は、Kleanthous らにより求められた²⁰⁾、pH 6.5 における相対的な移動度より同定した。

第4節 フォスファターゼ I の酵素的性質

第1項 pH 安定性

精製フォスファターゼ I の pH 安定性を調べるために、以下のように酵素を処理した。

6.0 ng (0.16 pmol) のフォスファターゼ I を、10 μ l の 5 mM $MgCl_2$ を含む各 pH の緩衝液 [50 mM sodium acetate-acetate (pH 4.0、5.0)、50 mM MES-NaOH (pH 6.0、7.0)、50 mM Tris-HCl (pH 8.0、9.0)] 中、20°C で 0~60 分間インキュベートした。

これらの処理による精製フォスファターゼ I の残存活性は、本章、第3節、第3項に記載した方法で測定した。

その結果、Figure 3-1 に示すように、フォスファターゼ I は、pH 6.0~8.0 の間で安定であった。

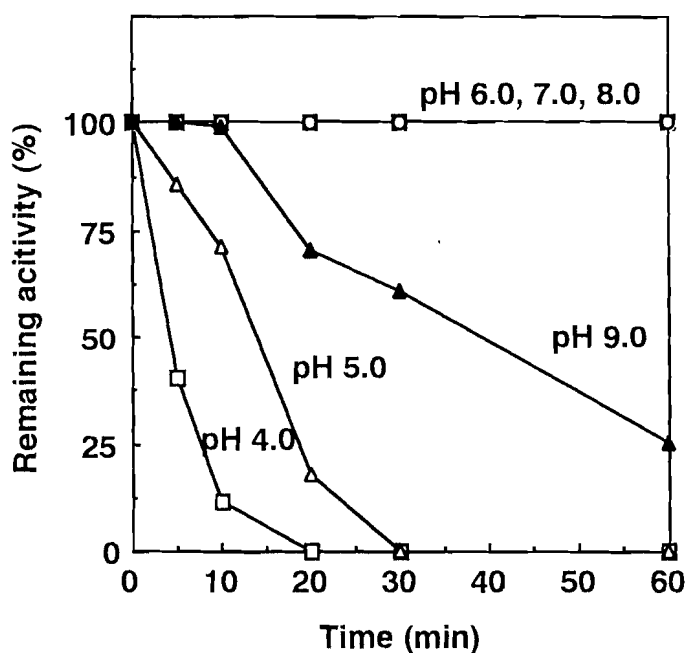


Figure 3-1. pH-stability of Phosphatase I.

The buffer solutions used were described in the text. The enzyme was incubated in individual buffer solutions containing 5 mM $MgCl_2$ for the indicated periods of time at 20°C, and the remaining activity was assayed as described in the text.

The value of 100% corresponds to 0.675 nmol pNP/min.

第2項 活性の至適 pH

フォスファターゼ I (6.0 ng、0.16 pmol) を、2.5 mM MgCl₂ を含む各 pH の緩衝液 (前項に記載) 中で、本章、第3節、第3項の方法に従い、活性を測定した。

その結果、Figure 3-2 に示すように、フォスファターゼ I の反応至適 pH は、pNPP を基質とした場合、pH 6.0 であり、中性付近で高い活性を示した。

この反応至適 pH から判断すると、フォスファターゼ I は、酸性、アルカリフォスファターゼのどちらにも分類されなかった。

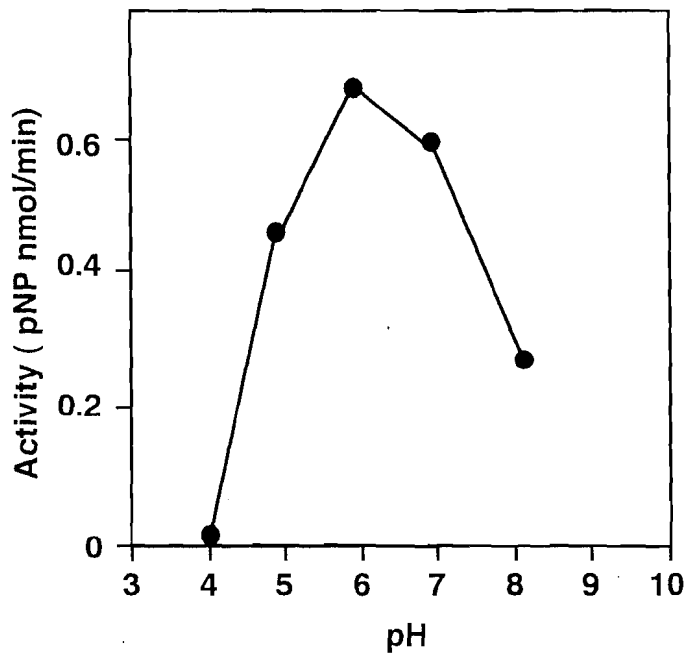


Figure 3-2. Dependence of activity of Phosphatase I on pH.

The reaction rates of Phosphatase I was determined as described in the text.

第3項 熱安定性

フォスファターゼ I の熱安定性を検討するために、精製酵素を次のように処理した。

6.0 ng (0.16 pmol) のフォスファターゼ I を、5 mM MgCl_2 を含む 10 μl の 50 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中、0~60°C の各温度で 0~60 分間インキュベートした。

これらの処理による精製フォスファターゼ I の残存活性は、本章、第3節、第3項に記載した方法で測定した。

その結果、フォスファターゼ I は、60 分のインキュベートの間において 20°C までは安定であるが、それ以上の温度では、その残存活性は経時的に減少した (Figure 3-3)。

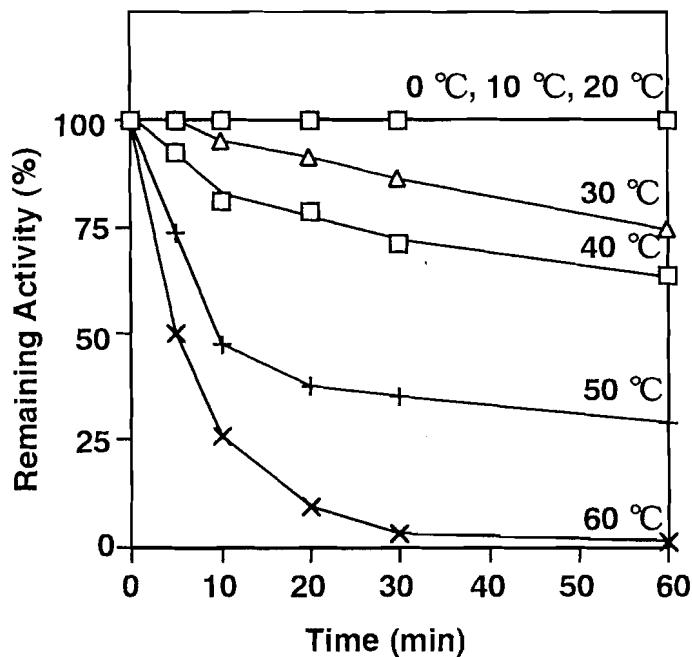


Figure 3-3. Thermo-stability of Phosphatase I.

Phosphatase I was incubated at individual temperatures and pH 6.0 for the indicated periods of time, and then the remaining activity was determined as described in the text.

The value of 100% corresponds to 0.675 nmol pNP/min.

第4項 活性の至適温度

精製フォスファターゼ I (7.9 ng、0.2 pmol) について、本章、第3節、第3項の方法に従い、各温度でのその活性を測定した。

その結果、フォスファターゼ I の至適温度は、pNPP を基質とした場合、30℃であり、低温域 (0~15℃) においても 30℃での活性の 27~38%の活性を示した (Figure 3-4)。

この精製フォスファターゼは、低温域においても高い活性を保持していることが示された。

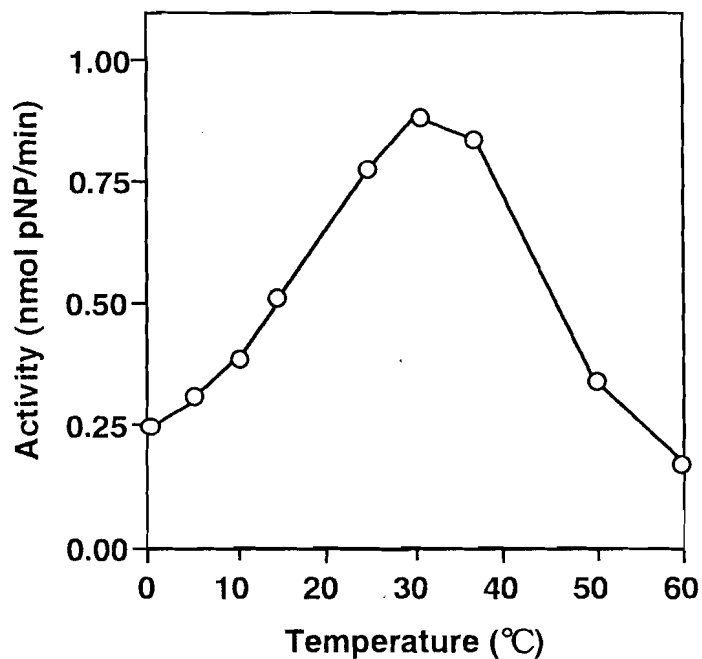


Figure 3-4. Dependence of activity of Phosphatase I on temperature.

The activity at indicated temperatures was determined as described in the text.

第5項 活性に及ぼす金属の影響

本章、第3節、第3項に記載した方法により、精製酵素を含む溶液中から、EDTA処理、それに次ぐ透析によって金属イオンを除去した後に、Table 3-1に示すような金属イオンの存在下でその活性を測定した。

その結果、Table 3-1に要約したように、フォスファターゼIの活性が、 Mg^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオンにより6.1倍、7.1倍に上昇することを確認した。それに対して、 Zn^{2+} イオンは、本酵素の活性を顕著に低下させた。

Table 3-1. Effects of divalent cations on Phosphatase I activity.

	Activity (units/mg)	Relative activity(%)
none	6.0	100
2.5 mM $MgCl_2$	36.5	607
2.5 mM $CaCl_2$	43.0	714
2.5 mM $MnCl_2$	13.6	225
2.5 mM $ZnCl_2$	3.1	52
2.5 mM $CoCl_2$	28.7	476

第6項 基質特異性

リン酸化合物に対する精製酵素のカイネティックパラメーターを Table 3-2 に示した。

フォスファターゼ I は、合成基質である pNPP の他には、*O*-phospho-*L*-tyrosine のみを脱リン酸化した。また、データには示していないが、本酵素は、*O*-phospho-*L*-serine、*O*-phospho-*DL*-threonine を脱リン酸化しなかった。このことから、フォスファターゼ I が、タンパク質中のリン酸化チロシン残基を脱リン酸化する可能性が認められた。

Table 3-2. Substrate specificity of Phosphatase I.

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (nmol <i>Pi</i> /min)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ /mM)
pNPP	0.95	0.50	112	118
Phosphotyrosine	1.42	0.75	16.8	11.8

上記の結果において、フォスファターゼ I が、タンパク質中のリン酸化チロシン残基を脱リン酸化する可能性を示した。本項では、その可能性を証明するために、チロシン残基を PTK によってリン酸化したチロシンとグルタミン酸のランダムポリマーである polyEY、MBP と、セリンまたはスレオニン残基を、PKA catalytic subunit でリン酸化した histone H1、Casein、また、phosphorylase kinase でリン酸化した phosphorylase a を基質として、フォスファターゼ I の脱リン酸化能を検討した。

その結果、Figure 3-5 に示すように、フォスファターゼ I は、チロシン残基をリン酸化した polyEY、MBP を脱リン酸化した。それに対して、本酵素は、その他のリン酸化タンパク質を基質としなかった。この結果により、フォスファターゼ I は、タンパク質中のリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸化する PTPase 活性を有することが示された。

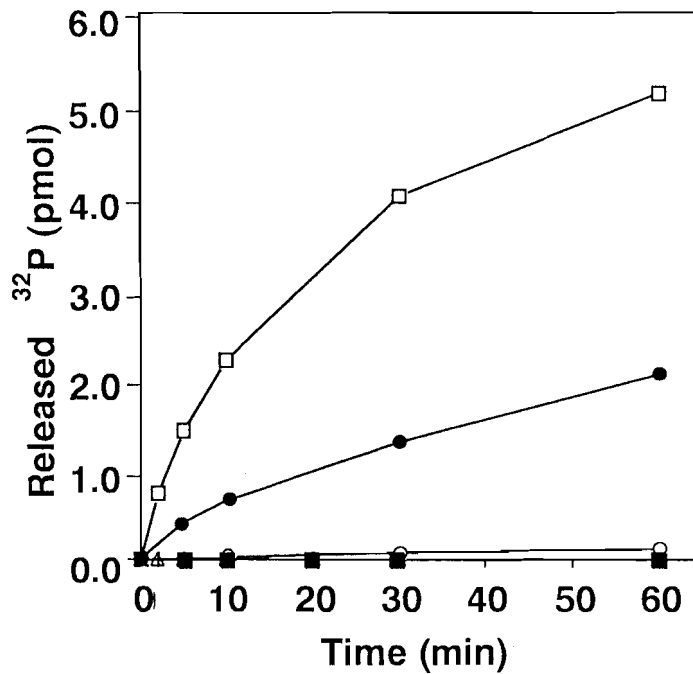


Figure 3-5. Time course of dephosphorylation of phosphorylated polypeptides with Phosphatase I.

Activities of Phosphatase I (6.0 ng, 0.16 pmol) for ^{32}P -polyEY (*open square*), ^{32}P -MBP (*closed circle*), ^{32}P -Casein (*open triangle*), ^{32}P -phosphorylase a (*closed square*) and ^{32}P -histone (*open circle*) were determined for indicated periods of time as described in the text. Activity is represented by the released inorganic phosphorus [^{32}P] as a function of time.

第7項 フォスファターゼ I に対する各種阻害剤の影響

前項において、フォスファターゼ I は PTPase 活性を有することを示した。本酵素の PTPase 活性は、2-mercaptoethanol や DTT などの還元剤の影響を受けなかった（データ示さず）。しかし、これまでに報告されている全ての PTPase は、システイン残基を活性中心触媒アミノ酸とする SH 酵素であり、活性の発現に還元剤を必要とすることが知られている²¹⁾。故に、フォスファターゼ I の活性中心触媒アミノ酸が、他の PTPase とは異なるアミノ酸であると考えられる。

そこで、フォスファターゼ I の活性中心アミノ酸残基を決定するために、Table 3-3 に示すような各種阻害剤を、適当な濃度でフォスファターゼ I と 15°C、1 時間、pH 6.0 で反応させた。反応後、pNPP を基質として残存活性を測定したところ、50 μ M DEPC で処理することにより、この酵素の活性は完全に消失した。

また、MIAA、MIAM で処理することでもその活性の低下が認められた。特に、8.0 μ M MIAA では、フォスファターゼ I の 83% が阻害を受けた。

Table 3-3. Effects of inhibitors on Phosphatase I activity.

Inhibitors	Concentration	Remaining activity(%)
none		100
PCMB	1.0 mM	82
PCMPS	1.0 mM	96
	4.0 mM	87
NEM	1.0 mM	97
	4.0 mM	83
MIAA	8.0 μ M	17
	16.0 μ M	6
MIAM	1.0 mM	2
DEPC	10.0 μ M	10
	50.0 μ M	0
	1.0 mM	0

Phosphatase I (6.0 ng, 0.16 pmol) was incubated with indicated concentrations of inhibitors in 10 μ l of 25 mM MES-NaOH, pH 6.0 containing 2 mM MgCl₂ at 15°C for 60 min. The remaining activity was determined as described in the text. The value of 100% corresponds to 0.45 nmol pNP per min.

また、データは示していないが、同様の処理を行った本酵素は、リン酸化 polyEY を基質とした場合でも同程度に阻害を受けることが認められた。

対照的に、PCMB、PCMPS、NEM は、その濃度を上昇させても本酵素の活性に対して顕著な効果は認められなかった。

ここで、MIAA と MIAM は、システイン残基の SH 基とヒスチジンのイミダゾール基を修飾し²²⁾、DEPC は、ヒスチジン残基に対する特異的な修飾試薬で²³⁾、有機水銀試薬である PCMB と PCMPS、二価性試薬である NEM は、SH 基に特異的に反応する^{24,25)}。

これらの試薬の性質を考慮すると、このフォスファターゼ I は、ヒスチジンの修飾により活性が消失すると考えられ、本酵素の活性中心アミノ酸がヒスチジン残基であることが示唆された。

第 8 項 DEPC により修飾されるアミノ酸数の算出

前節において、ヒスチジンの修飾試薬により、フォスファターゼ I が、阻害を受けることを示したが、この失活が活性中心以外の多数のヒスチジンの修飾に起因した立体構造の変化によるものである可能性は否定できない。そこで、この節では、DEPC により修飾されたアミノ酸残基数を Levy らの方法²⁶⁾に基づいて算出した。

第 3 節、第 2 項 (1) に記載した方法により、DEPC 処理したフォスファターゼ I の残存活性を測定し、0.2~2.0 mM の DEPC による残存活性の経時的変化を Figure 3-6 パネル A に示した。この残存活性の変化は、2.0 mM DEPC 処理で、残存活性が 50% になる時間 ($t_{1/2}$) を 3.3 分とする偽一次直線を示した。ここで得られた各濃度の DEPC 処理による $t_{1/2}$ の対数を DEPC 濃度の対数との関数としてプロットした (Figure 3-6 パネル B)。その結果、その関数は、絶対値 1.007 を傾きとする直線として得られた。この傾きは、DEPC によるフォスファターゼ I の失活を伴う修飾反応の次数に相当する²⁶⁾。従って、DEPC により修飾され、失活を伴うアミノ酸残基数は 1 個と算出された。

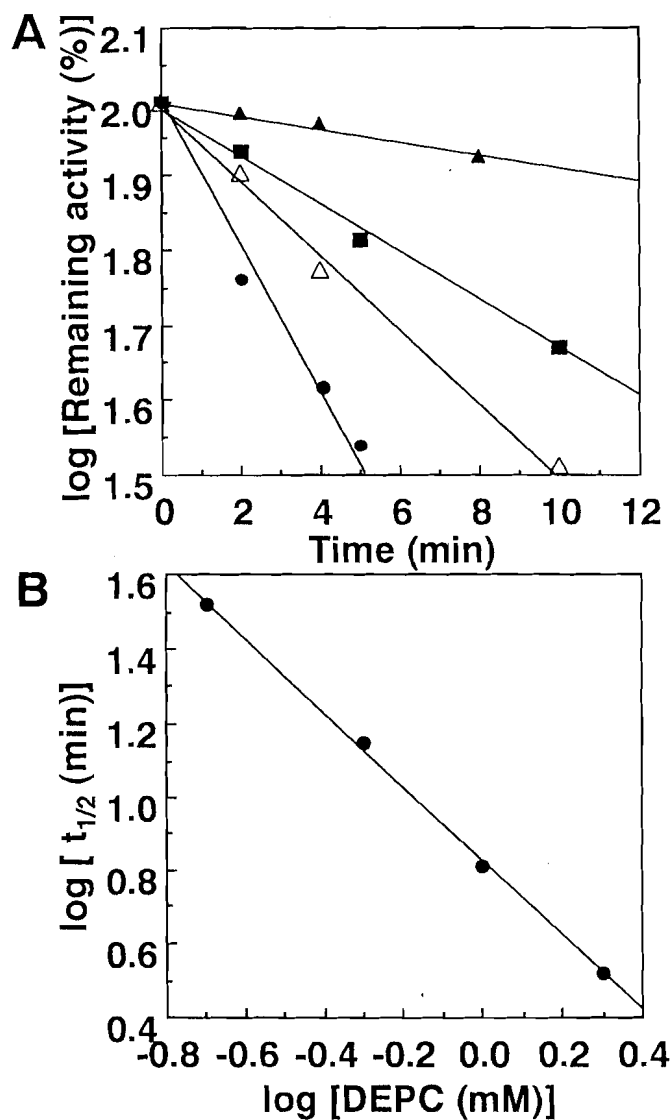


Figure 3-6. Estimation of the number of amino acid modified with DEPC.

A: Phosphatase I (7.7 ng, 0.2 pmol) was incubated with different concentrations of DEPC; 0.2 (*closed triangle*), 0.5 (*closed square*), 1.0 (*open triangle*), and 2.0 mM (*closed circle*). The remaining activity was determined using pNPP as substrate as described in the text. The value of 100% corresponds to 0.50 nmol pNP/min. The time required for 50% reduction of the activity, $t_{1/2}$, was calculated for each DEPC concentration.

B: A double-logarithmic plot of $t_{1/2}$ against DEPC concentration. The slope value is 1.007 with a regression coefficient of 0.999.

第9項 ^{14}C -MIAAにより修飾されたアミノ酸の同定と定量

前項までの Table 3-3、Figure 3-6 における実験結果から、フォスファターゼ I の活性中心は、ヒスチジン残基であることが示唆された。しかし、DEPC により修飾されたヒスチジン、即ち、carbethoxyhistidine は、pH が中性以外の範囲では非常に不安定である²³⁾ことから、アミノ酸分析等による実験方法では、その同定が困難である。故に、修飾された活性中心アミノ酸をヒスチジン残基であるとする直接的な証拠としては、不十分である。

そこで、本節では、薄層電気泳動を用いて、 ^{14}C -MIAA 処理により修飾されたアミノ酸の同定と定量を行い、本酵素の活性中心アミノ酸がヒスチジン残基であることを直接的に証明した。

その修飾反応において使用する ^{14}C -MIAA のモル量、その反応時間の設定を行った。

(1) ^{14}C -MIAA とフォスファターゼ I のモル比の決定

2.2 pmol のフォスファターゼ I と 1.0、5.0、12.0 nmol の ^{14}C -MIAA を、5 mM MgCl_2 と 1 M sorbitol を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で 15°C 、60 分間反応させ、その後、残存活性を測定した (Figure 3-7A)。

(2) 反応時間の決定

2.2 pmol のフォスファターゼ I と 10 nmol の ^{14}C -MIAA を、5 mM MgCl_2 と 1 M sorbitol を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0) 中で 15°C 、0~120 分間反応させ、その後、残存活性を測定した (Figure 3-7B)。

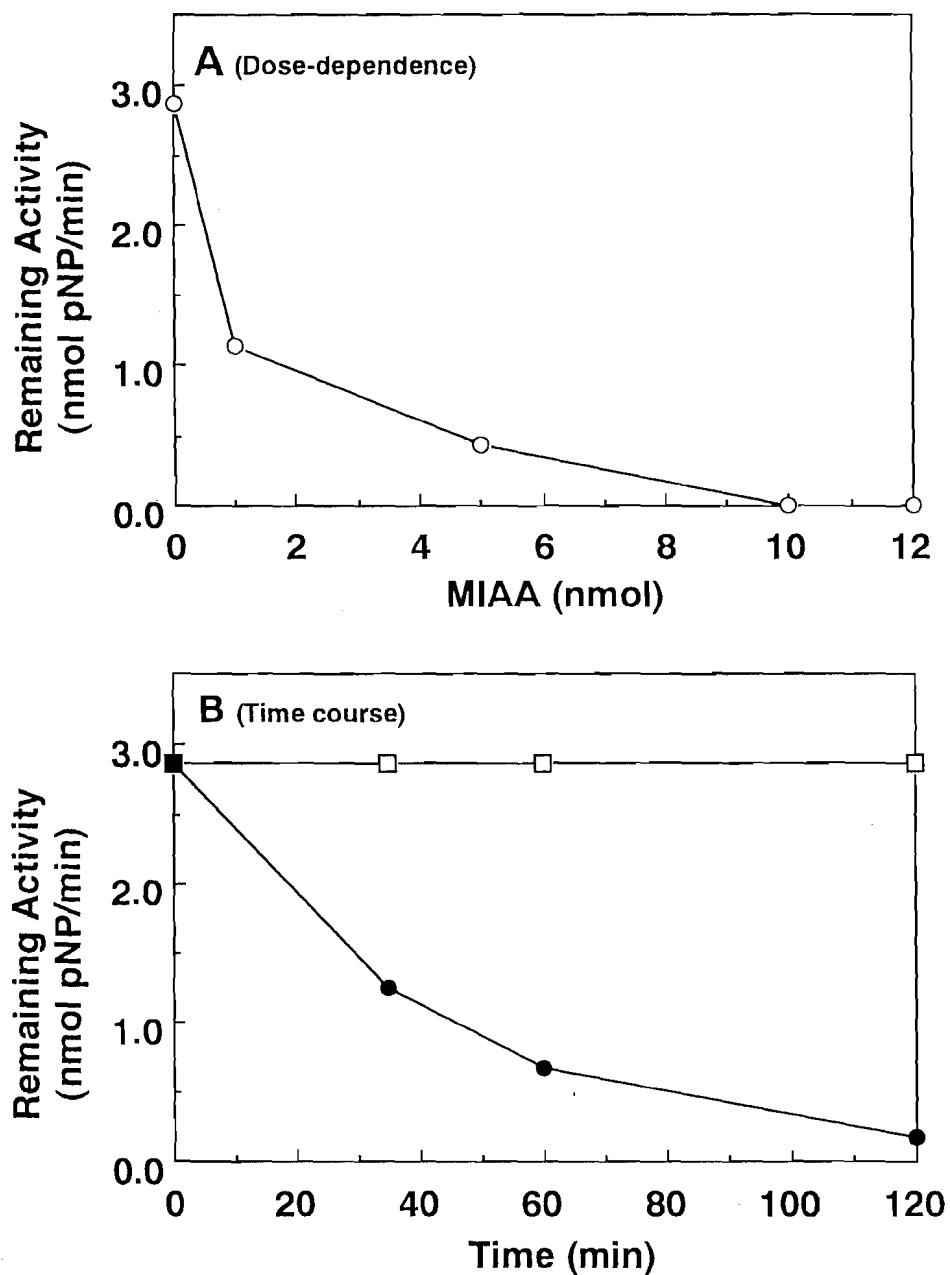


Figure 3-7. Dose-dependence (A) and time course (B) of inhibition of Phosphatase I with MIAA.

A: Phosphatase I (2.2 pmol) was incubated with indicated amount of MIAA at pH 6.0 and 15°C for 60 min.

B: Phosphatase I (2.2 pmol) was incubated with (*closed circle*) or without (*open square*) 10 nmol of MIAA at pH 6.0 and 15°C for indicated periods of time.

The remaining activity was determined as described in the text.

以上の結果から、フォスファターゼ I は、その 5000 倍モル量の ^{14}C -MIAA と 2 時間反応することにより、90%以上の阻害を受けることが示された。

そこで、第 3 節、第 2 項 (2) に記載した方法を決定し、80 pmol のフォスファターゼ I を ^{14}C -MIAA で修飾した。修飾タンパク質を塩酸加水分解し、その分解物を薄層電気泳動に供与した。なお、この本実験においても、予備実験と同様に、この修飾反応によりフォスファターゼ I は、90%の阻害を受けた。

泳動後のプレートのイメージング解析の結果、Figure 3-8B に示すように、修飾されたフォスファターゼ I 中の CM-誘導体は、その泳動位置から 1-CM-histidine と同定された。また、その放射活性から、CM-誘導体のモル数を定量したところ、1-CM-histidine は、70 pmol と算出された。従って、1 mol のフォスファターゼ I 中の 0.88 mol のヒスチジン残基が ^{14}C -MIAA 処理によって修飾されたこととなり、この修飾は、 ^{14}C -MIAA 処理によるこの酵素の阻害効果とよい相関性が得られた。また、Figure 3-8 のパネル B、また、パネル C において、CM-cystein の泳動位置には、放射活性は認められなかった。

以上の結果、フォスファターゼ I の活性中心は、ヒスチジン残基であり、他の PTPase とは異なり、システイン残基は関与していないことが示された。

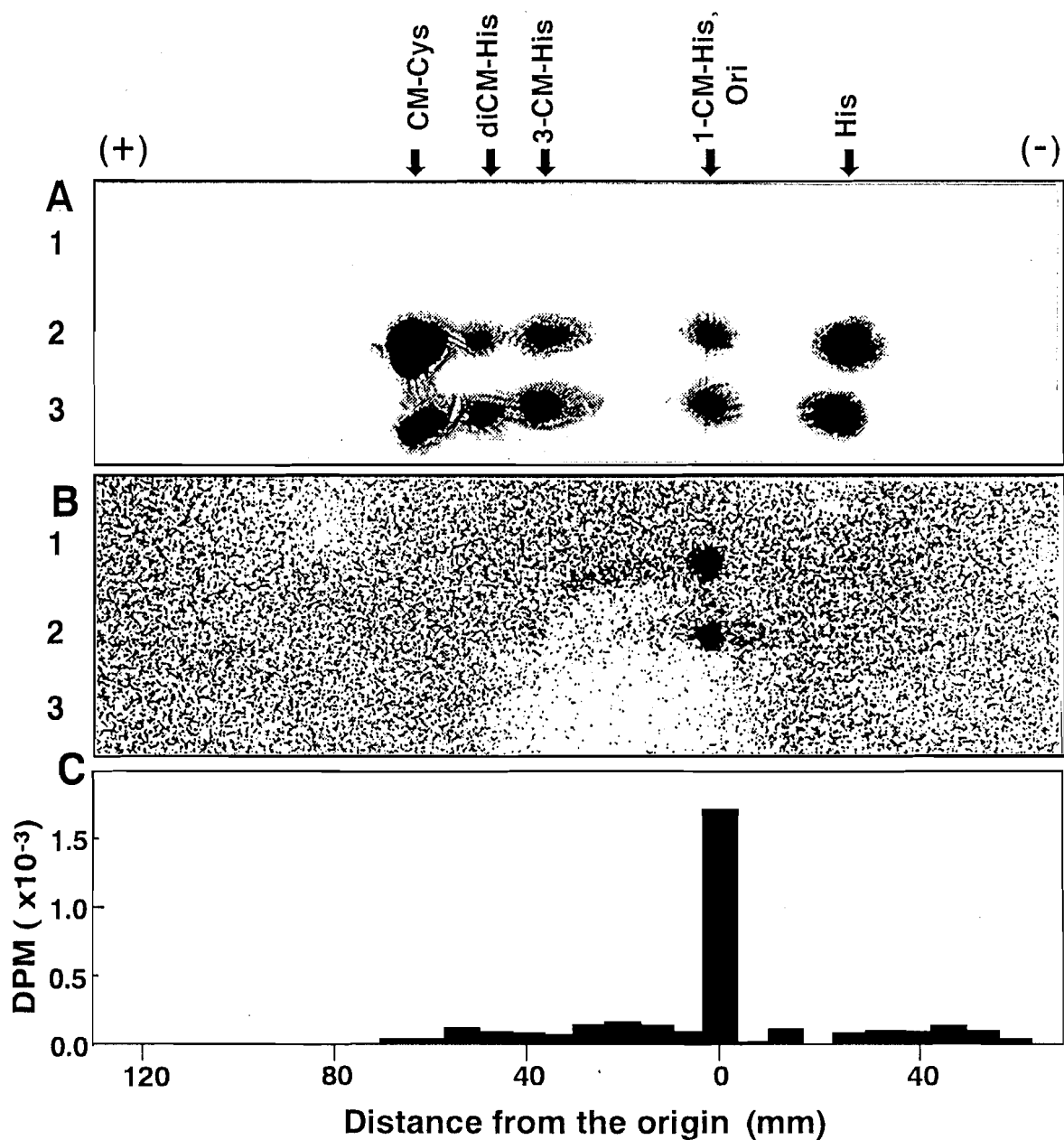


Figure 3-8. Identification and quantitation of the modified amino acid in Phosphatase I by ^{14}C -MIAA.

Phosphatase I (3 μg , 80 pmol) was treated with 400 nmol of ^{14}C -MIAA, and then hydrolyzed. The half portion (equivalent to 40 pmol of phosphatase I) of the hydrolyzate alone (*Lane 1*), with CM-amino acids as standard (*Lane 2*) and standard alone (*Lane 3*) were subjected to a thin-layer electrophoresis.

A: Staining of authentic CM-amino acids with ninhydrin on a silica gel plate.

B: Autoradiography of the plate. **C:** The radioactivity of segment of plate with

6.7 mm-width on lane 1 in B. Arrows indicate the positions of CM-cystein (CM-Cys), 1,3-diCM-histidine (diCM-His), 3-CM-histidine (3-CM-His), 1-CM-histidine (1-CM-His) on origin (Ori), and histidine (His) on the electrophoresis.

第5節 フォスファターゼ II の酵素的性質

第1項 pH安定性

精製フォスファターゼ II の pH 安定性を調べるために、以下のように酵素を処理した。

これらの処理によるフォスファターゼの残存活性は、本章、第3節、第3項に記載した方法で測定した。

2.8 ng (0.07 pmol) のフォスファターゼ II を、40 μ l の 5 mM $MgCl_2$ を含む各 pH の緩衝液 [100 mM sodium acetate-acetate (pH 5.0)、100 mM MES-NaOH (pH 6.0、7.0)、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM ethanolamine-HCl (pH 9.0、10.0)、100 mM glycine-NaOH-NaCl (pH 11.0)] 中、20°C で、0~60 分間インキュベートした。

その結果、Figure 3-9 に示すように、フォスファターゼ II は、pH 6.0~11.0 の間で安定であった。

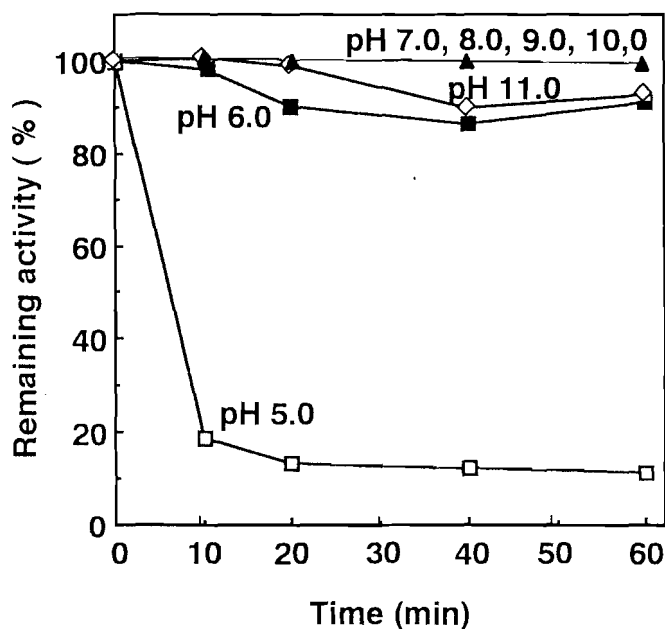


Figure 3-9. pH-stability of Phosphatase II.

The buffer solutions used were described in the text. The enzyme was incubated in individual buffer solutions containing 5 mM $MgCl_2$ for the indicated periods of time at 20°C, and the remaining activity was assayed as described in the text. The value of 100% corresponds to 18.4 nmol pNP/min.

第2項 活性の至適 pH

フォスファターゼ II (4.5 ng、0.11 pmol) を、2.5 mM MgCl₂ を含む各 pH の緩衝液 (前項に記載) 中で、本章、第3節、第3節の方法に従い、活性を測定した。

その結果、Figure 3-10 に示すように、フォスファターゼ II の反応至適 pH は、pNPP を基質とした場合、pH 9.8 であり、アルカリ側において高い活性を示した。

この結果から、フォスファターゼ II は、アルカリ性に至適 pH を有するアルカリフォスファターゼに分類された。そこで、この実験結果に基づき、フォスファターゼ II の対照酵素には、*Escherichia coli* のアルカリフォスファターゼ (BAP) を設定した。

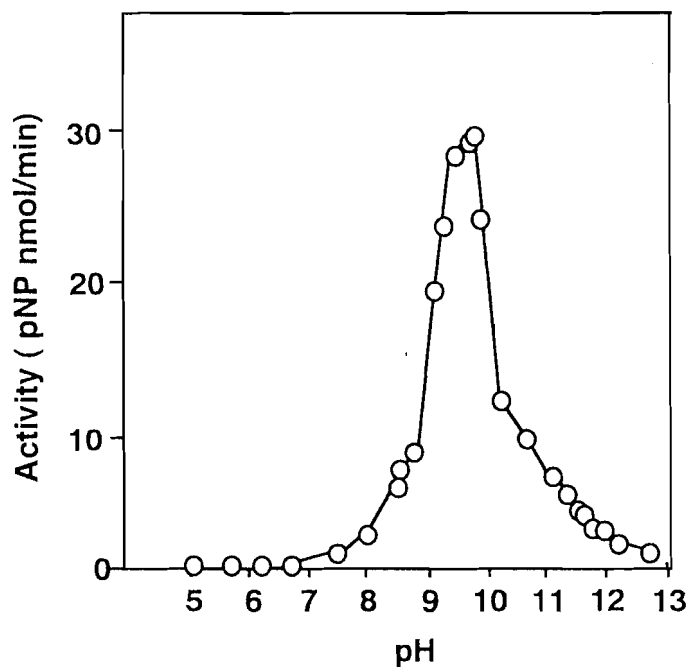


Figure 3-10. Dependence of activity of Phosphatase II on pH.

The reaction rates of Phosphatase II was determined as described in the text.

第3項 熱安定性

フォスファターゼ II 及び BAP の熱安定性を検討するために、それぞれの酵素を次のように処理した。

10.7 ng (0.26 pmol) のフォスファターゼ II あるいは、12 ng (0.14 pmol) の BAP を 5 mM MgCl₂ を含む 40 µl の 50 mM ethanolamine-HCl (pH 9.8)、あるいは、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中、0~80°C の各温度で 0~60 分間インキュベートした。

これらの処理による精製フォスファターゼの残存活性は、本章、第3節、第3項に記載した方法で測定した。

その結果、Figure 3-11 に示すように、フォスファターゼ II は、10°C 以下の温度では、60 分間のインキュベートにおいても比較的安定であるが、10°C 以上では、残存活性は、速やかに減少した（パネル A）。それに対して、パネル B に示したように、フォスファターゼ II の対照酵素として設定した BAP は、50°C まで安定であり、80°C、60 分間のインキュベート後でも、約 60% の残存活性を示した。

これらの結果から、好冷菌より分離精製したフォスファターゼ II は、中温菌の酵素、ここでは、*E. coli* の有する酵素が活性を十分に保持しているような中温域においても速やかに失活することが示された。

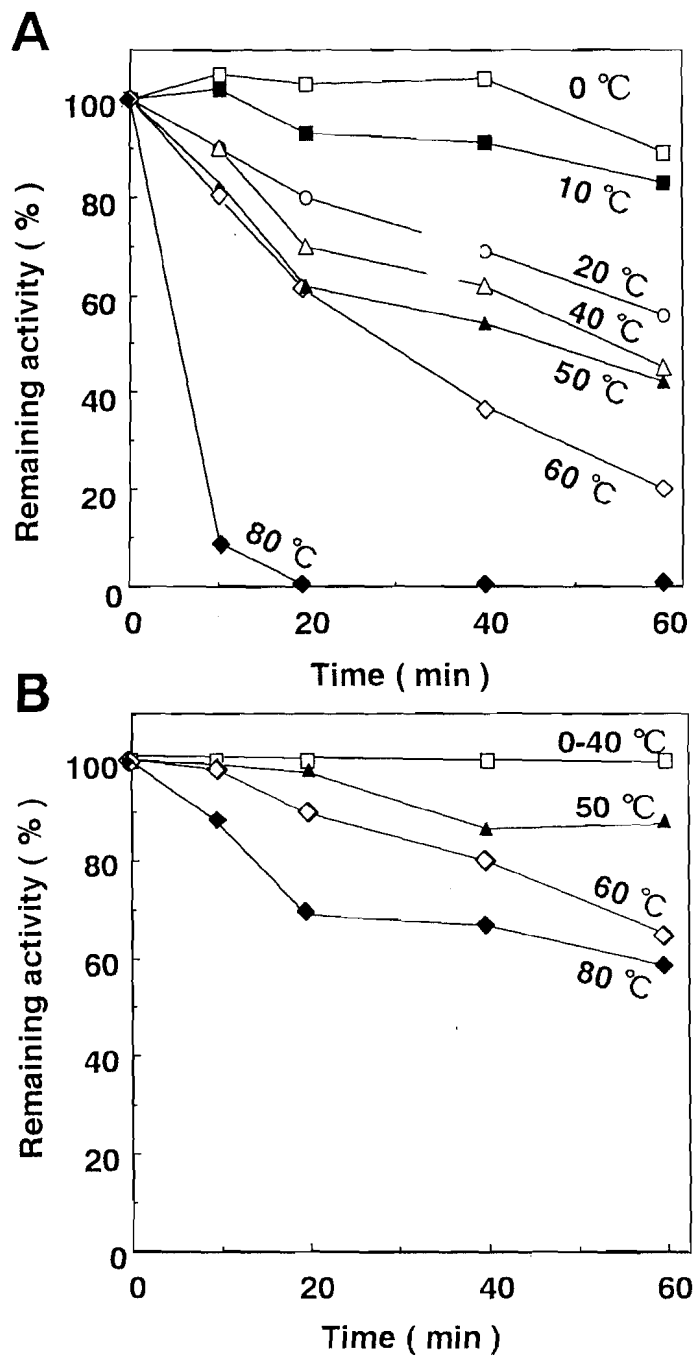


Figure 3-11. Thermo-stability of Phosphatase II and *E. coli* alkaline phosphatase (BAP).

Phosphatase II and BAP were incubated at individual temperatures and pH 9.8 (Phosphatase I) or 8.0 (BAP) for the indicated periods of time, and then the remaining activity was determined as described in the text. The 100% values correspond to 77.5 and 2.29 nmol pNP/min (Phosphatase II and BAP, respectively).

第4項 活性の至適温度

精製フォスファターゼ II (12.0 ng、0.29 pmol)、BAP (80 ng、0.93 pmol) について、本章、第3節、第3項の方法に従い、各温度でのそれらの活性を測定した。

その結果、Figure 3-12 に示すように、フォスファターゼ II の至適温度は、40°C であり、低温域においても 40°C での活性の 39~42% の活性を示した。故に、この精製フォスファターゼ II は、低温域においても高い活性を示し、また、フォスファターゼ II の最適温度は、BAP の 80°C と比べて低温側に大きくシフトしていることが明らかとなった。

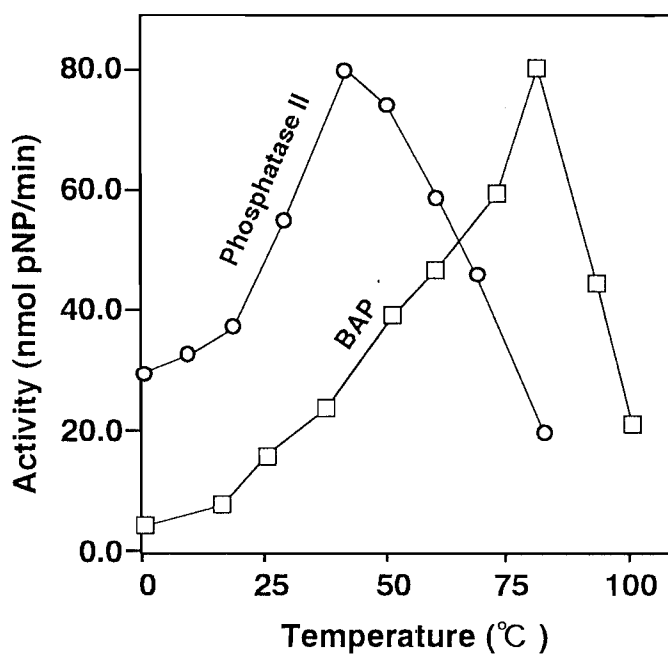


Figure 3-12. Dependences of activities of Phosphatase II and BAP on temperature.

The activity of respective phosphatase at indicated temperatures was determined as described in the text. *Circle*, Phosphatase II; *square*, BAP.

第5項 活性に及ぼす金属の影響

本章、第3節、第3項に記載した方法により、精製酵素を含む溶液中から、EDTA処理、それに次ぐ透析によって金属イオンを除去した後に、Table 3-4に示すような金属イオンの存在下でその活性を測定した。

その結果、Table 3-4に要約したように、フォスファターゼ II の活性は、 Mg^{2+} イオン、 Mn^{2+} イオン、 Co^{2+} イオンによりそれぞれ、10.1 倍、5.4 倍、4.8 倍に上昇した。また、 Zn^{2+} イオン、 Cu^{2+} イオンにより、92%以上の阻害効果が認められた。

Table 3-4. Effects of divalent cations on Phosphatase II activity.

	Activity (units/mg)	Relative activity(%)
none	0.1	100
2.5 mM $MgCl_2$	101	1010
2.5 mM $CaCl_2$	13.5	135
2.5 mM $MnCl_2$	54.1	541
2.5 mM $ZnCl_2$	<0.01	<8
2.5 mM $CoCl_2$	47.6	476
2.5 mM $NiCl_2$	17.1	171
2.5 mM $CdCl_2$	<0.01	<8
2.5 mM $CuSO_4$	<0.01	<8

第6項 基質特異性

リン酸化合物に対する精製酵素のカイネティックパラメーターを Table 3-5 に示した。

また、フォスファターゼ II は、広い基質特異性を持ち、本実験において用いた全てのリン酸化合物を脱リン酸化した。特に、この酵素は、ATP、GTP、CTP、5'-AMP といったヌクレチドリン酸に対して高い親和性を示し、また、 k_{cat}/K_m 値から判断すると、ATP、GTP、CTP の γ -リン酸部位を効率よく脱リン酸化できると考えられた。

Table 3-5. Substrate specificity of Phosphatase II.

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (nmol P_i /min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1}/mM)
pNPP	1.5	5.0	115	76.7
β -glycerophosphate	0.21	3.3	76.7	35.0
Pyrophosphate	0.71	1.7	40.0	56.7
ATP	0.064	1.6	36.7	567
UTP	0.32	2.8	65.0	200
GTP	0.14	2.0	46.7	333
CTP	0.13	1.8	41.7	317
ADP	1.29	6.6	152	118
3'-AMP	0.87	4.2	96.7	112
5'-AMP	0.075	0.65	15.0	200
Phosphotyrosine	0.60	7.0	162	267
Phosphoserine	0.53	2.1	48.3	91.7
Phosphothreonine	0.52	2.6	60.0	115

第6節 小括

本章では、第1節、緒言で述べたように精製フォスファターゼI及びIIの酵素的諸性質を検討した。その結果、(1)フォスファターゼIは、反応至適pHを、pH6.0にもち、pH6.0~8.0の間で安定であった。この性質から、本酵素は酸性フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼのどちらにも分類されないものであることが示された。また、Table 3-2に示したように、その基質特異性について、本酵素は、合成基質であるpNPPの他には、ホスホチロシンと、Figure 3-5に示したように、チロシン残基をリン酸化したpolyEY、MBPを脱リン酸化した。しかし、本酵素は、ホスホセリン、ホスホスレオニン、セリンまたはスレオニン残基をリン酸化したCasein、histone H1、phosphorylase aを基質としなかった。

これらの結果から、好冷菌フォスファターゼIは、タンパク質中のリン酸化チロシン残基を特異的に脱リン酸化するPTPase活性を有していた。また、本酵素の活性は、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} イオンにより顕著に上昇した。さらに、各種アミノ酸修飾試薬を用い、複数のアプローチによって活性中心アミノ酸を決定したところ、フォスファターゼIは、ヒスチジン残基を活性中心アミノ酸としていることを示した。

(2)フォスファターゼIIの反応至適pHが9.8であり、本酵素が、pH7.0~11.0の間で安定であるといった性質から、本酵素は、アルカリフォスファターゼに分類された。本酵素は、既に特性化されている*E.coli*などのアルカリフォスファターゼと同様に、広い基質特異性を示した。また、本酵素の活性は、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} イオンにより上昇し、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} イオンにより低下した。

精製フォスファターゼI及びIIの温度に対する影響について、これらの反応至適温度は、それぞれ30℃、40℃と低く、特にフォスファターゼIIの至適温度は、対照酵素としたBAPの80℃よりも低温側に大きくシフトしていた。また、低温域(0~15℃)においても、フォスファターゼIは、至適温度での活性の27~38%、IIは、39~42%の活性を発揮することができ、低温域において効率よく

反応を触媒することが示された。さらに、それらの熱安定性について、フォスファターゼ I では、20℃以上、II では、10℃以上で、それらの活性は著しく低下した。

この温度に関する酵素的性質から、これらの精製フォスファターゼは、i) 低温域においても高い活性を示す、ii) 反応至適温度が対照酵素のそれと比較して低温側にシフトしているといった低温酵素の特性を備えていることが示された。

以上、本章においては、精製フォスファターゼの酵素的性質を検討した。

第4章 精製フォスファターゼ I の理化学的性質¹⁰⁾

第1節 緒言

前章において、好冷菌 (*Shewanella* sp.) より、2種のフォスファターゼ (フォスファターゼ I、II) を分離精製し、フォスファターゼ I については、本酵素が、ヒスチジンを活性中心触媒アミノ酸とする PTPase であると結論づけた。この低温酵素の特性を解明する目的において、その構造特性を検討することは、必須であり、また、本酵素が他の PTPase とは、異なる活性中心アミノ酸を有していることから大きな意義をもつと考えられる。故に本章以降の実験においては、フォスファターゼ I に着目した。

本酵素は、細胞内含量が低いため、この酵素の立体構造の解析には、大腸菌などで大量発現した組み換えタンパク質が必要となる。そこで、本章では、フォスファターゼ I 遺伝子のクローニングのための情報として、これらのタンパク質のアミノ酸組成、N 末端領域のアミノ酸配列及び内部アミノ酸部分配列を決定することを試みた。

第2節 実験材料

生化学用の 2-mercaptoethanol、リジルエンドペプチダーゼ (*Achromobacter* Protease I、EC 3.4.21.50)、アミノ酸組成分析において使用した標準アミノ酸は、和光純薬工業より、トリプトファンとシステイン酸は、Nacalai Tesque 社より購入した。SH 基の修飾試薬である DACM は、テイカ製薬社製のものを使用した。アミノ酸配列分析において使用した PVDF 膜は、Millipore 社製の immobilon-P_{SO} を、ペプチド断片の分離の際に使用した μ BONDASPHERE C18 300 Å 5 μ カラム、626 型 HPLC システムは、Waters 社製のものを使用した。その他の試薬は、特級のものを使用した。

第3節 実験方法

第1項 アミノ酸組成分析

前章で得られた精製酵素を含む溶液を Millipore 社製の MilliQ Labo で作製した超純水に対して3昼夜透析し、さらに、その透析内液を凍結乾燥した。その乾燥酵素標品を、0.1 % (v/v) phenol と 0.25 % (v/v) 2-mercaptoethanol を含む 80 μ l の 6 N HCl 中で、110°C で 24、48、72 時間、塩酸蒸気加水分解した。

システインの定量は、次に示す方法に従い、システイン酸として定量した。凍結乾燥標品を 25°C で 1 時間インキュベートしておいた 50 μ l の過ギ酸溶液 (3% 過酸化水素水を含む 88.2% ギ酸溶液) に溶解した。その溶液を、0°C で 16 時間インキュベートした後、100 μ l の超純水を加え、凍結乾燥し、さらに、110°C、24 時間、塩酸加水分解した。

また、トリプトファンの定量においては、凍結乾燥標品を 4 N methanesulfonic acid 中で 110°C、24 時間加水分解した。

上述の方法により得られたそれぞれの加水分解物を L-8500 形アミノ酸分析機 (Hitachi 社製) に供与した。

第2項 遊離の SH 基の定量

精製酵素タンパク質中に含まれる遊離の SH 基を、この官能基と結合して蛍光を発する DACM を用いて、以下の方法に従い、定量した。

フォスファターゼ I、1.87 μ g (48.7 pmol) と 10 nmol の DACM を 20 mM EDTA、20 mM EGTA、6 M guanidine hydrochloride を含む 0.2 ml の 200 mM Tris-HCl (pH 8.5) 中で、20°C、60 分間反応させた。次いで、0.8 ml の超純水を加え、励起波長 400 nm、蛍光波長 470 nm における蛍光強度を F-2500 形蛍光光度計 (Hitachi 社製) で測定した。SH 基のモル数は、予め作成しておいた 2-mercaptoethanol を用いた検量線より算出した。

第3項 質量分析

本酵素タンパク質の分子量の測定には、MALDI-TOF質量分析計（PerSeptive Biosystems社製）を使用した。マトリックスとして、シナピン酸（3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid）を、分子量の標準物質としては、BSA（MW 66,431）、 α -chymotrypsinogen（MW 25,635）を使用した。

第4項 精製タンパク質のリジルエンドペプチダーゼ消化

精製酵素タンパク質（凍結乾燥標品、30 μ g、0.8 nmol）を、4 M urea を含む 100 μ l の 50 mM Tris-HCl(pH 9.0)に溶解し、精製タンパク質重量の 1/100 倍のリジルエンドペプチダーゼを加え、30 $^{\circ}$ Cで、4時間インキュベートした。その後、同じく 1/100 倍重量をさらに加え、12時間インキュベートした。これにより、精製タンパク質に対して、1/50 倍重量のペプチダーゼで処理したことになる。反応は、極少量の TFA を添加し、反応液の pH を酸性にすることにより停止した。

第5項 逆相 HPLC

前項で得られたリジルエンドペプチダーゼ消化物を、予め 0.1%(v/v) TFA を含む超純水で平衡化しておいた μ BONDASPHERE C18 300 \AA 5 μ カラム（ ϕ 2.1 \times 150 mm）に供与した。非吸着画分を溶出後、acetonitrile 濃度を 60%(v/v)まで上昇させる直線濃度勾配法により、各ペプチド断片を溶出した。なお、溶出されたペプチド断片は、その 220 nm における吸光度により検出した。分離されたペプチド断片を含む溶液は、直ちに遠心濃縮により溶液中の acetonitrile を除去し、凍

結乾燥した後に、乾燥ペプチド標品として、-30℃のフリーザー内で保存した。

第6項 アミノ酸配列の決定

精製酵素タンパク質の凍結乾燥標品あるいは、-30℃で保存しておいたペプチド断片の凍結乾燥標品を 10 μ l の 0.2 % (v/v) TFA に溶解した。この溶解物を PVDF 膜にスポットし、得られた膜を PPSQ-10 形自動アミノ酸配列分析機 (Shimadzu 社製) に供した。PVDF 膜は、前処理として、100 % methanol、50 % (v/v) methanol、超純水に順次、30 秒間ずつ浸したものを使用した。

第4節 精製フォスファターゼ I のアミノ酸組成

Table 4-1. Amino acid composition of psychrophilic Phosphatase I.

	Mole%	Number of residue ^e
Asx	12.63	42
Thr ^a	6.55	22
Ser ^a	5.39	18
Glx	9.93	33
Gly	8.24	28
Ala	4.49	15
Cys ^c	0.34	1
Val ^b	6.36	21
Met ^a	1.55	5
Ile ^b	6.10	21
Leu ^b	11.07	37
Tyr	4.24	14
Phe	4.26	14
Lys	6.19	21
His	4.48	15
Trp ^d	1.99	7
Arg	4.36	15
Pro	1.84	6
	100	
Total residues		335
Total mass		38,299

^a Determined by extrapolation to zero-hydrolysis time.

^b Obtained at 72 hours-hydrolysis.

^c Measured as cysteinic acid after oxidation by performic acid-treatment.

^d Hydrolyzed with 4 N methanesulfonic acid.

^e The numbers of Ala residues were assumed to be 15.

フォスファターゼ I のアミノ酸組成を Table 4-1 に示した。このタンパク質中のアラニン残基を 15 個と仮定すると、このタンパク質は、335 残基のアミノ酸から構成され、分子量は、38,299 であり、MALDI-TOF 質量分析により決定した分子量、38,366 と近い値を示した。この構成アミノ酸組成から判断すると、フォスファターゼ I 中にシステイン残基は、1 個しか含まれていないため、ジスル

フィド結合がこの酵素タンパク質中には、存在しないこと、また、プロリン残基が6個しか含まれていないことが特徴的であった。システイン残基が1個しか含まれていないことは、本章、第3節、第2項に記載した方法で、遊離のSH基を定量することで確認した。

このタンパク質の280 nmにおける吸光度と、アミノ酸分析により得られた構成アミノ酸の総重量から、10 mg/mlのタンパク質溶液の280 nmにおける吸光度を、20.2と算出し、さらに、その値と分子量から、280 nmにおける分子吸光係数を、 $7.75 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ と算出した。

第5節 N末端領域及び内部アミノ酸部分配列の決定

第1項 N末端領域のアミノ酸配列の決定

本章、第3節、第6項に記載した方法よりフォスファターゼのN末端領域の配列を決定した (Figure 4-1)。100 pmolのフォスファターゼIを配列決定に供したところ、第1残基目のアスパラギンが、収率40%で得られた。同様の操作を、マッコウクジラの骨格筋由来のミオグロビンについて行い、同程度の収率でN末端アミノ酸が検出されたことから、フォスファターゼIは、モノマーであることが裏付けられた。

また、インターネット上のBLAST Searchプログラム²⁷⁾を用いて、このフォスファターゼIのN末端領域の配列とホモロジーを示すタンパク質を検索したが、フォスファターゼ活性を示すタンパク質は認められなかった。

**Asn-Thr-Ala-Thr-Glu-Phe-Asp-Gly-Pro-Tyr-
Val-Ile-Thr-Pro-Ile-Ser-Gly-Gln-Ser-Thr**

Figure 4-1. N-terminal region amino acid sequences of Phosphatase I.

第2項 内部アミノ酸部分配列の決定

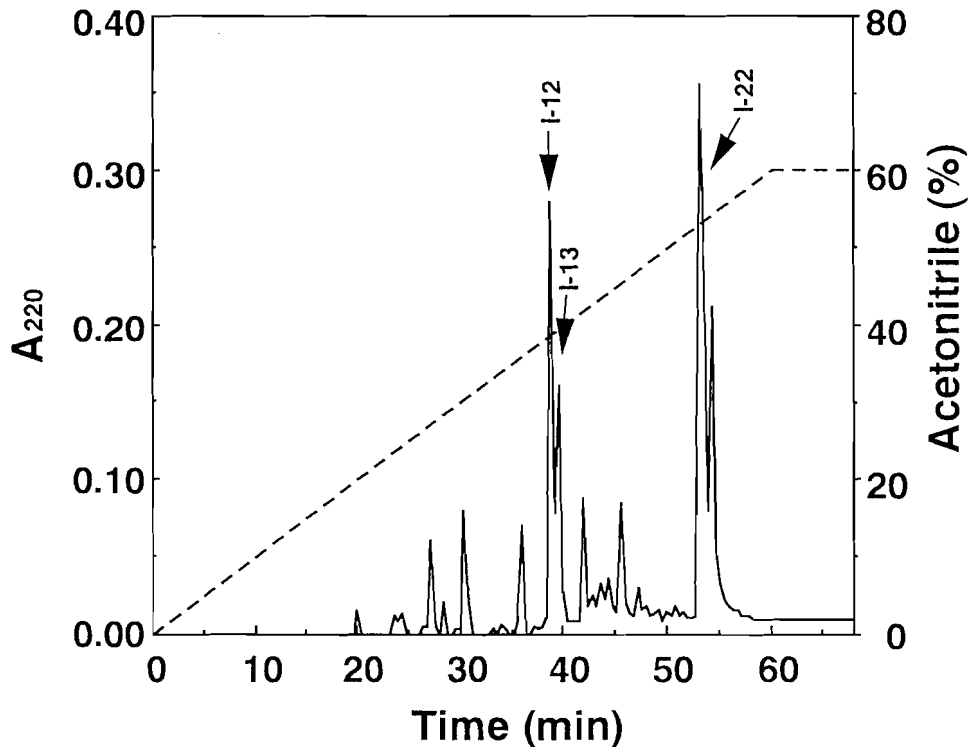


Figure 4-2. Separation of lysylendopeptidase-digested peptides of Phosphatase I by a reversed HPLC.

Preparation of Phosphatase I treated with lysylendopeptidase were applied to a column of μ BONDASPHERE C18 \AA 5 μ (ϕ 2.1 x 150 mm) equilibrated with 0.1 % TFA. The adsorbed peptides were eluted with a 24-ml linear gradient of 0 to 60% acetonitrile.

The flow rate was 0.4 ml/min. *Solid* and *dotted line* represent absorbance profile at 220 nm and elution gradient with acetonitrile, respectively. Indicated peptides (*I-number*) were subjected to amino acid sequence analysis.

本章、第3節、第4項から第6項に記載した方法で、フォスファターゼIのペプチド断片への消化を行い、逆相HPLCにより、それらのペプチドを分離した。この分離したペプチドのうち、いくつかについてそのアミノ酸配列の決定を行った。

その分離されたペプチドの溶出像を、Figure 4-2に示し、決定された部分アミノ酸配列をFigure 4-3に示した。

この決定されたアミノ酸配列を基に、インターネット上のBLAST Searchプロ

グラムを用いて、ホモロジーを示すタンパク質を検索した。その結果、フォスファターゼ I の部分配列に対してホモロジーを示すフォスファターゼは、認められなかった。

I-12 : N-terminal region sequence
I-13 : (Lys)-Leu-Tyr-Gly-Ala-Asp-Thr-Glu-Ile-
Gly-Gln-
I-22 : (Lys)-Ile-Ile-Asp-Gly-Asn-Asn-Ala-Phe-
Gly-Glu-Gly-Ile-Met-Val-Met-

Figure 4-3. Amino acid sequences of lysylendopeptidase-digested peptides.

第6節 小括

本章においては、第1節 緒言において述べたように、精製フォスファターゼIの理化学的性質として、そのアミノ酸組成、N末端領域アミノ酸配列及び内部アミノ酸部分配列の決定を試みた。

それぞれの構成アミノ酸の組成に着目すると、フォスファターゼIは、335残基のアミノ酸から成り、それらの構成アミノ酸のうち、プロリン残基が分子内に6個しか含まれていないこと、また、システイン残基が1個であり、ジスルフィド架橋を形成できないことといった特徴が認められた。

フォスファターゼIのN末端領域のアミノ酸配列と、リジルエンドペプチダーゼ消化により得られたペプチドの配列の決定により、その全アミノ酸残基(335残基)の13.4%にあたる45残基の配列を明らかとした。

この得られた配列に対して、それぞれ、ホモロジーを示すタンパク質を検索したところ、フォスファターゼI中の配列と相同性を示すフォスファターゼは認められなかった。この結果から、フォスファターゼIが、新規のフォスファターゼであることが示唆された。

ここで得られたフォスファターゼIのアミノ酸部分配列についての情報は、次章のフォスファターゼI遺伝子のクローニングに対して有用なものである。

以上、本章においては、精製フォスファターゼIの理化学的諸性質を明らかとした。

第5章 フォスファターゼ I 遺伝子のクローニング及びその塩基配列の決定と大腸菌による組み換えタンパク質の発現

第1節 緒言

前章までの実験により、好冷菌フォスファターゼ I は、PTPase 活性を有し、ヒスチジンを活性中心触媒アミノ酸とする新規の酵素であると結論づけた。しかし、本酵素の構造と機能の相関性の解明において、その細胞内含量の低さ故に精製酵素を用いた構造解析は困難であると考えられる。本酵素を大量に得るためには、本酵素タンパク質をコードする遺伝子のクローニング及び大腸菌などによるその組み換えタンパク質の発現、精製が必要である。

そこで、本章では、第4章において決定されたフォスファターゼ I の N 末端領域及び内部部分アミノ酸配列を基に、オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、好冷菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR、inverse PCR 法によりフォスファターゼ I 遺伝子をクローニングする。さらに、決定された塩基配列の情報を基に、フォスファターゼ I を GST との融合タンパク質として大腸菌 DH5 α で発現し、その融合タンパク質を glutathione-S-Sepharose カラムを用いて分離精製したことについて述べる。

第2節 実験材料及び試薬

各種制限酵素と専用の反応バッファーは、New England Biolab 社製のものを使用した。Table 5-1 に示したようなオリゴヌクレオチドの合成をサワディーテクノロジー社に委託し、PCR に用いるプライマーとして使用した。なお、このオリゴヌクレオチドのうち、Sense-13、ANT-N-2、C-3、ANT-N-3、CT の 5'末端側には、制限酵素 *EcoRI* の認識配列を、NT の 5'末端には、*BamHI* の認識配列を付

加した。アガロースゲルからの DNA 断片の回収には、BIO RAD 社製の DNA Purification kit を使用した。コンピテントセル *Escherichia coli* DH5 α 、Takara ligation kit、T4 DNA ligase、*AmpliTaq* GOLD DNA polymerase、glutathione-S-Sepharose 4B は、Nacalai Tesque 社より購入した。ナイロンメンブレン HybondTM-N、proteinase K、RNase A、[α -³²P]dCTP は、Amersham 社製のものを使用した。塩基配列の決定に使用した SequiTherm EXCELTM Long-ReadTM DNA Sequencing Kit-LC、IRD41 Infrared Dye Labeled Primer は、Aloka 社より購入した。また、X 線フィルムは、Fuji Photo Film 社のものを使用した。その他の試薬は、特級のものを使用した。

Table 5-1. Synthetic oligonucleotide primers.

Degenerated oligonucleotide primers

N-1 : 5'-AAY-ACI-GCI-ACI-GAR-TTY-GAY-GG-3'
 (Forward) N T A T E F D G

ANT-13 : 5'-TG-YTG-ICC-IAT-YTC-IGT-RTC-XGC-3'
 (Reverse) W? Q G I E T D A

Other primers

For 1st IPCR

Sense-13: 5'-GGAATTCCTACGGCGACGACACCGAGAT-3'
 (Forward)

ANT-N-2: 5'-GGAATTCCTCCAGTAAGCCGTGCTTTGA-3'
 (Reverse)

For 2nd IPCR

C-3 : 5'-GGAATTCCTTACTGGAAAATAACCGGCTTA-3'
 (Forward)

ANT-N-3: 5'-GGAATTCACATTACCCACGGTGACAG-3'
 (Reverse)

For construction of
 expression-vector

NT : 5'-GGATCCAATACTGCAACTGAGTTTGAT-3'
 (Forward)

CT : 5'-GGAATTCCTTGCTTACTATCTAGCTTA-3'
 (Reverse)

I, Y, R, and X in oligonucleotide sequences indicate inosine, C/T, A/G, and any nucleotide, respectively.

第3節 実験方法

第1項 プライマーの作製

第4章で得られたフォスファターゼIのN末端領域及び内部部分アミノ酸配列を基に、N-1プライマーとANT-13プライマーを合成した (Table 5-1)。

第2項 好冷菌ゲノム DNA の調製

第2章、第3節に記載した方法で培養した好冷菌 (*Shewanella* sp.) 0.2 g (湿重量) を 5 ml の TEG バッファー [25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、50 mM glucose] に懸濁し、50 µg の proteinase K を加え、65°C で 1 時間インキュベートした。反応液に 5 ml の phenol-chloroform-isoamylalchol (25v:24v:1v) を加え、穏やかに攪拌した。次いで、500 ×g で遠心分離し、得られた上層 (水層) を新しいチューブに移した。この上層に対して、再度 phenol-chloroform-isoamylalchol 処理を行った後、遠心分離より得られた上層に 500 µl の 3 M sodium acetate (pH 5.2)、10 ml の氷冷 ethanol を加え、-80°C で 15 分間静置した。これを 10,000 ×g で 10 分間遠心分離し、得られた沈澱を、10 ml の氷冷 70%(v/v) ethanol で洗浄した後、真空乾燥し、100 µl の TE バッファーに溶解した。この溶液に、50 µg の RNase A を加え、37°C で 16 時間インキュベートした。この反応液について phenol-chloroform- isoamylalchol 処理、ethanol 処理、真空乾燥を行うことにより、得られた沈澱を、100 µl の TE バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] に溶解した。

これにより得られたゲノム DNA を含む溶液の一部を、0.8%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、高分子の DNA が得られたことを確認した後に、260 nm における吸光度より DNA 濃度を測定し、以降の実験に供した。

第3項 ゲノム DNA を鋳型とした PCR

PCR は、Table 5-1 に示した N-1 と ANT-13 オリゴヌクレオチドをプライマー、10 ng のゲノム DNA を鋳型として、1 unit の *AmpliTaq* GOLD DNA polymerase とプログラムインキュベーター MiniCycler™ (MJ RESEARCH 社製) を用いて行った。そのプログラムは、94°C で 10 分間インキュベートし、鋳型 DNA を一本鎖にした後、94°C、55°C、72°C で 1 分間のインキュベートを 30 サイクルとした。反応終了後、反応液を 1%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、増幅した DNA 断片を確認した。この増幅断片を BIORAD DNA purification kit を用いてゲルから抽出し、*Takara* ligation kit を用いて、この DNA 断片を pBluescript SK-T-ベクターに挿入し、そのライゲーション産物でコンピテントセル *E.coli* DH5α を形質転換した。

第4項 塩基配列の決定

形質転換株を、100 µg/ml の ampicillin を含む LB 培地[Luria-Bertanis' broth: 1%(w/v) tryptone、0.5%(w/v) yeast extract、1%(w/v) NaCl]中、37°C で一晩培養した。遠心分離により菌体を回収した後、プラスミド DNA を Sambrook らの方法²⁸⁾に基づいて精製した。シーケンシング反応は、SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing Kit-LC を用いたサイクルシーケンス法により行った。電気泳動及び塩基配列の決定は、4000L 形 DNA sequencer (LI-COR 社製) により行った。

第5項 サザンハイブリダイゼーション

(1) プロブの調製

サザンハイブリダイゼーションに用いるプローブには、第3項において回収した PCR 増幅断片を Random Prime DNA Labeling kit (MEGAPRIME、Amersham 社製) により、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP で標識したものをを用いた。

(2) 各種制限酵素によるゲノム DNA の消化とサザントランスファー

好冷菌ゲノム DNA を制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、*Pst*I を単独、あるいは2種組み合わせることにより消化した。この制限酵素の反応は、6 μg のゲノム DNA と 20 units の各制限酵素を 20 μl の制限酵素用反応バッファー [10 mM Tris-HCl(pH 7.9)、50 mM NaCl、10 mM MgCl_2 、1 mM DTT] 中、37°C で 18 時間とした。反応液を、1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 200 ml の変性液 [0.5 N NaOH-1.5 M NaCl] に浸漬し、室温で 15 分間、さらに変性液を交換し、30 分間、穏やかに振盪し、ゲルに含まれる DNA をアルカリ変性させた。ゲルを中和液 [0.5 M Tris-HCl(pH 7.5)-3 M NaCl] に浸漬し、室温で 15 分間、さらに中和液を交換した後、30 分間穏やかに振盪することにより中和した。以上の処理により、得られたゲルから、Sambrook らの方法²⁸⁾に基づいて DNA を Hybond-N ナイロンメンブレンに転写し、メンブレンを風乾した。さらに、DNA の固定化のためにメンブレンを UV トランスイルミネーターを用いて 3 分間紫外線照射を行った。

(3) ハイブリダイゼーション

乾燥したナイロンメンブレンを Table 5-2 に示したハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、55°C で 1 時間インキュベートした後、(1) で調製した ^{32}P -標識プローブ (1×10^7 cpm) をハイブリダイゼーション溶液に添加し、さらに 16 時間インキュベートした。メンブレンを洗浄後、風乾し、X 線フィルムに -80°C で 16 時間感光させた。

Table 5-2. Component of hybridization-buffer.

20xSSC*	3.0 ml
50xDenhardt's**	2.5 ml
10%(w/v) SDS	0.1 ml
10 mg/ml Salmon sperm single strand DNA	0.1 ml
H ₂ O	4.3 ml / 10 ml

*20xSSC solution : 3 M NaCl, 0.3 M tri-sodium citrate dihydrate

**50xDenhardt's solution : 1%(w/v) BSA, 1%(w/v) Ficoll 400,
1%(w/v) polyvinylpyrrolidone K-30

第6項 inverse PCR

本節第1項から第5項に記載した方法により決定されたフォスファターゼ I 遺伝子の部分塩基配列とサザンハイブリダイゼーションの結果から作成した制限酵素地図（第4節参照）を基にして、未決定領域の塩基配列を決定するために inverse PCR²⁹⁾を行った。この反応の概略図を Figure 5-1 に示している。

(1) ゲノム DNA の制限酵素処理

1 µg の好冷菌ゲノム DNA を 20 units の制限酵素 *Pst* I、あるいは *Hind*III と 200 µl 中の制限酵素用反応バッファー中、37°C で 16 時間インキュベートした。これにより切断された DNA を phenol-chloroform-isoamylalcohol(25v:24v:1v)処理、ethanol 処理を行うことにより精製し、10 µl の TE バッファーに溶解した。

(2) 切断したゲノム DNA の自己環状化

制限酵素処理したゲノム DNA を 10units の T4 DNA ligase を用いて 500 µl の 50

mM Tris-HCl (pH 8.0)-10 mM MgCl₂-10 mM DTT 中で 15°C、16 時間インキュベートすることにより自己環状化させた。この反応液を phenol-chloroform-isoamylalcohol 処理、ethanol 処理を行うことにより、DNA を精製し、10 μl の TE バッファーに溶解した。

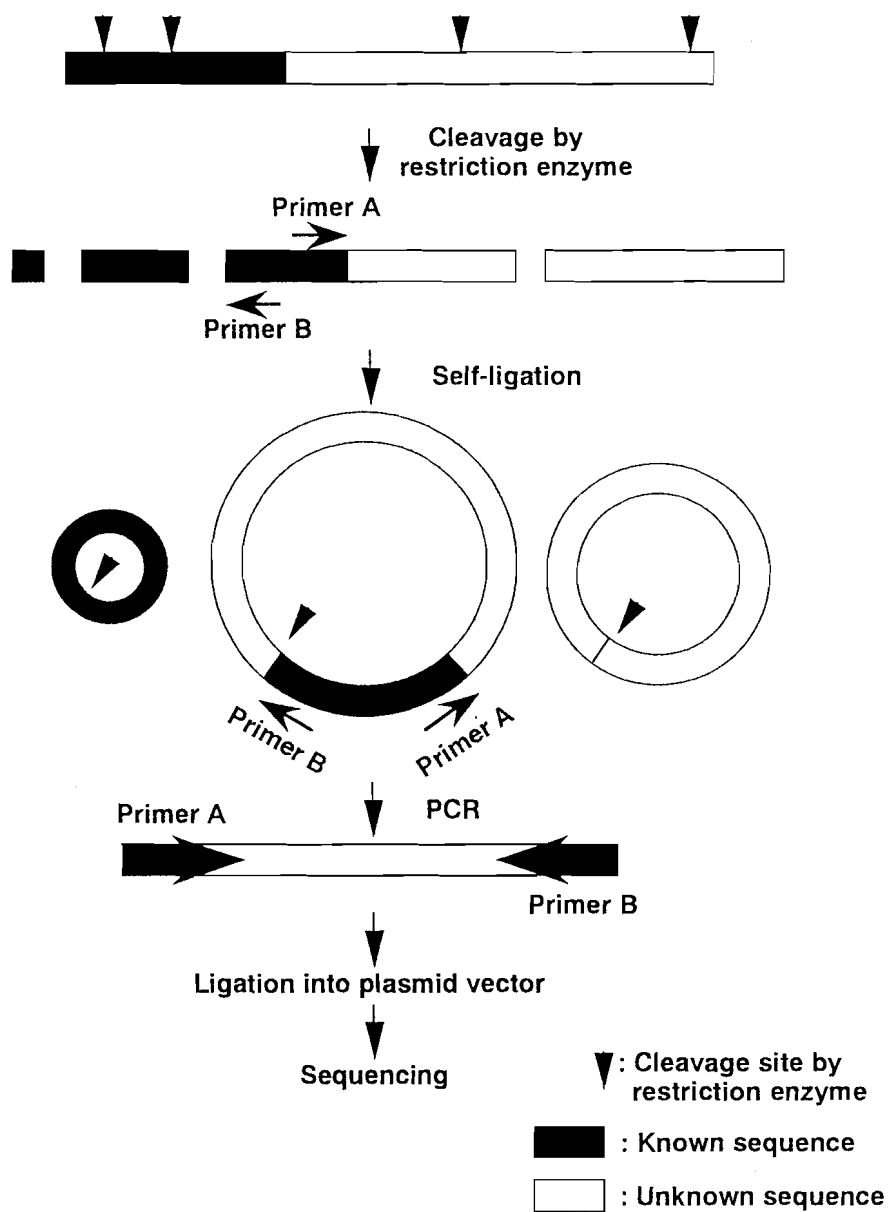


Figure 5-1. Illustration of inverse PCR.

(3) PCR

自己環状化したゲノム DNA を鋳型、Table 5-1 に示した inverse PCR 用に合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、5 units の *AmpliTaq* GOLD DNA polymerase を用いて PCR を行った。この反応に用いたプログラムは、95°C で 10 分間インキュベートした後に、94°C で 1 分間、55°C で 2 分間、72°C で 2 分間のインキュベートを 30 サイクル行い、さらに、72°C で 10 分間インキュベートするように設定した。反応終了後、反応液を 1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、増幅断片の確認を行い、この DNA 断片を、DNA Purification kit を用いてゲルから抽出した。抽出した DNA 断片を *Eco*RI 処理し、*Takara* ligation kit を用いて、予め *Eco*RI 処理しておいた pBluescript SK に挿入し、そのライゲーション産物でコンピテントセル *E.coli* DH5 α を形質転換した。

次いで、第 4 項に記載した方法に従って、そのインサート部分の塩基配列を決定した。

第 7 項 GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質の大腸菌での発現

(1) 発現ベクターの構築

ここでは、フォスファターゼ I を GST との融合タンパク質として発現させるために、発現ベクターとして、プラスミド pGEX-6p-2 を用いた。

Table 5-1 に示した合成オリゴヌクレオチド (NT、CT) をプライマーとし、好冷菌ゲノム DNA を鋳型として、フォスファターゼ I をコードする全長の DNA を PCR 法により増幅した。反応は、1 unit の *AmpliTaq* GOLD DNA polymerase を用い、94°C で 10 分間インキュベートした後に、94°C で 1 分間、53°C で 1 分間、72°C で 2 分間のインキュベートを 30 サイクル行った。反応終了後、反応液を 1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。増幅断片を確認した後、この DNA 断片を DNA Purification kit を用いてゲルから回収し、制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI に

より消化した。Takara ligation kit を用いてその DNA 断片を *Bam*HI、*Eco*RI で消化しておいた pBluescript SK ベクターに挿入し、そのライゲーション産物でコンピテントセル *E.coli* DH5 α を形質転換した。このベクター中のインサート部分について本節第 4 項に従い、その塩基配列を決定し、インサート DNA が、フォスファターゼ I 遺伝子であることを確認した。

このフォスファターゼ I 遺伝子を含んでいる pBluescript SK ベクターから、*Bam*HI、*Eco*RI により消化、ゲルからの抽出を行うことによりインサート DNA を得、その DNA を Takara ligation kit を用いて、*Bam*HI、*Eco*RI で消化しておいた pGEX-6p-2 ベクターに挿入し、そのライゲーション産物でコンピテントセル *E.coli* DH5 α を形質転換した。

(2) GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質の発現及び精製

形質転換した *E.coli* DH5 α 株を 100 μ g/ml の ampicillin を含む LB 培地 1 リットル中で、OD₆₀₀=0.5 まで培養した後、終濃度 0.2 mM となるように IPTG を加え、25 $^{\circ}$ C で 48 時間培養することによって GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質の発現を誘導した。遠心分離によって回収した菌体 (3.4 g) を 20 ml の緩衝液 F [25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM MgCl₂、1 mM DFP、1 M sorbitol] に懸濁し、6 mg の lysozyme を加え、1 時間氷上に静置した。次いで、この懸濁液に 3.4 g の酸化アルミナを加え、菌体を乳鉢、乳棒を用いて磨砕した後に、10,000 \times g で 30 分間遠心分離した。得られた沈澱については、再び酸化アルミナを用いて磨砕した。この 2 回の抽出操作により得られた上清は、さらに、90,000 \times g で 60 分間遠心分離した。上清を、予め精製用バッファーで平衡化しておいた glutathione-S-Sepharose 4B カラム (ϕ 1.0 \times 2.0 cm) に供与した。非吸着画分を溶出後、吸着タンパク質を 5 mM glutathione を含む精製用バッファーで溶出した。溶出画分のフォスファターゼ活性は、第 2 章、第 4 節に記載した方法に従って測定した。また、GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質の重量は、Bradford 法³⁰⁾ により、BSA を検量線として定量した。

第4節 制限酵素地図の作成

本章、第3節、第1項から第4項に記載した方法に従い、フォスファターゼ I の N 末端領域及び内部部分アミノ酸配列を基にして合成したオリゴヌクレオチド、N-1、ANT-13 (Table 5-1) をプライマー、好冷菌ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、その増幅断片の塩基配列を決定した。さらに、その増幅断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行い、その結果と第4章で決定したフォスファターゼ I の構成アミノ酸残基数から、フォスファターゼ I 遺伝子近傍の制限酵素地図を作成した。

その結果、Figure 5-2 に示すように、フォスファターゼ I 遺伝子の近傍には、*Hind*III、*Pst* I、*Bam*HI、その遺伝子中に、*Eco*RV による切断部位の存在が考えられた。

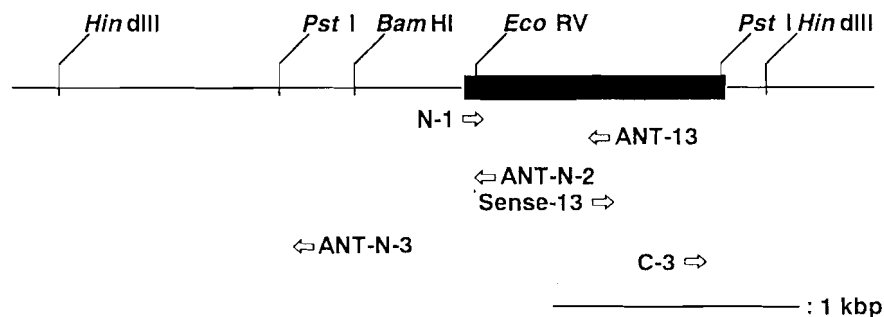


Figure 5-2. Restriction map of the gene encoding Phosphatase I.

Black box and *arrows* indicate the coding region of Phosphatase I and the positions hybridized with indicated primers, respectively.

第 5 節 inverse PCR 法を用いたフォスファターゼ I 遺伝子の クローニング及びその塩基配列の決定

前節において決定された部分塩基配列を基にして合成したオリゴヌクレオチド、Sense-13、ANT-N-2 (Table 5-1) をプライマー、制限酵素 *Pst* I で切断、自己環状化したゲノム DNA を鋳型として、inverse PCR を行った (1st IPCR)。これにより、約 1.2 kbp の増幅断片が認められた。その DNA 断片の塩基配列を決定したところ、既に決定した領域の 5'側上流の約 800 bp と下流の約 400 bp の塩基配列を決定することができた。

ここで決定した塩基配列を基にして、オリゴヌクレオチド、C-3、ANT-N-3 を合成した (Table 5-1)。このオリゴヌクレオチドをプライマー、制限酵素 *Hind*III で切断、自己環状化したゲノム DNA を鋳型として、inverse PCR を行った (2nd IPCR)。これにより得られた約 1.3 kbp の増幅断片を *Hind*III で消化し、得られた約 200 bp の DNA 断片の塩基配列を決定した。

以上により、フォスファターゼ I 遺伝子とその近傍の塩基配列を決定することができた (Figure 5-3)。

```

CTGCAGAGGCTGCAAGCTGTATGTCATCACGGGCGTACATTAACCGCCTACTGGTATATTCAAATGGGT -665
ATGATGCTTTTTGCCCTGTACCGTGGGTAATGTAAGTAAATAAAAAACAACACGTCATGTATTGGGCT -596
GTTGCGCTGCTTGTATTGCCGTATGGTGCATCGGCCAATTTCCAACCTTAATGCTATTCAATCCTTA -527
GTTTACTTTCTCCCGGTGATTTACTGGGGGTGTGGGGATCAGCACATCGCGATAAGCTGTCCCGTTT -458
ATTGATAAGTACTGGATCCCTATGTTTATTTAGCAATTGCATTGGCATTGGTTCAAGCGCAATTTTTT -389
GGTGCTGGCGTGCTTAATAAATCCCATTGAAATGACCGTGCCCGATCTAATGCTACCGCAAAAAGT -320
CTACTGACATTAGTGATCTTGCCATTTTGAACAAATTTGAACATATCACAATCGCGCCACTGCAAAAAG -251
TTAGCGGAGGTGAGTTTTGCCATTTACTTTATCCACCCGTGGCTCACTACGCCTTGGTGGATGATCTAC -182
GATAGCCCAGACTTGTTCGGCTAGCAGGTAAGGCAACATCTTACCACGTTAATTGTCACGCTTATT -113
GTGGTCGCCATTTGATATGATCGCCGTGTTGATCAAAAAATTATTAAGTAAACGCAGCCGATACCTC -44
ATCGGTTGGTAGTCATTTGTTCAAAAAGAATAAGAAGTAGAAAAATGAATAAAATTTATTGCCTTGCAAT
M N K I Y C L A V -13
ACTGAGTCTAACGCTGCTGAGCCCACTTGCACTTGCCAATACTGCAACTGAGTTTGATGGCCCTTACGT 95
L S L T L L S P L A L A N T A T E F D G P Y V
GATAACCCGATATCTGGTCAAAGCACGGCTTACTGGATCTGTGACAATAGACTCAAAACGACCTCGAT 164
I T P I S G Q S T A Y W I C D N R L K T T S I
AGAAAAGCTGCAAGTAAATCGACCCGAGCATTGTGGGGATTACCCGAGACTAAGCTCTCAAGCGAGAT 233
E K L Q V N R P E H C G D L P E T K L S S E I
TAAGCAGATCATGCCTGACACTTACTTAGGTATTAAGGTTGGTGGCGTTAAGTGTACACGGCCA 302
K Q I M P D T Y L G I K K V V A L S D V H G Q
GTATGACGTTCTGCTGACTCTGCTTAAAAAGCAAAAGATTATTGATAGTGTGAAATTTGGCCCTTCGG 371
Y D V L L T L L K K Q K I I D S D G N W A F G
CGAGGGGCATATGGTGTGACGGGGGATATCTTTGACCGCGCCATCAAGTCAATGAAGTGTGTGGTT 440
E G H M V M T G D I F D R G H Q V N E V L W F
TATGTATCAGCTCGACCAACAAGCAGCAGACGCTGGCGCATGGTACATCTATTAATGGGCAATCATGA 509
M Y Q L D Q Q A R D A G G M V H L L M G N H E
ACAGATGGTACTCGGCGGTGACTTGGCTATGTACACCAGCGTTATGATATAGCCACAACCCCTCATTAA 578
Q M V L G G D L R Y V H Q R Y D I A T T L I N
CCGCCCTATAACAAGCTCTACGGCGCAGATACTGAAATAGGTCAGTGGTTAAGAAGTAAAGAACCCAT 647
R P Y N K L Y G A D T E I G Q W L R S K N T I
TATCAAGATCAACGATGTGCTGTATATGCATGGTGGGATCAGCAGCGAATGGATCAGTCGAGAGCTAAC 716
I K I N D V L Y M H G G I S S E W I S R E L T
CTTAGACAAAGCGAATGCACTGTATCGAGCTAATGTGGATGCGTTCGAAAAATCACTAAAGGCGGATGA 785
L D K A N A L Y R A N V D A S K K S L K A D D
CTTACTCAATTTCTTTTTTTTGGAAACGGACCAACTTGGTATCGAGGCTACTTTTCAGAAACATTTAC 854
L L N F L F F G N G P T W Y R G Y F S E T F T
CGAAGCTGAAGTGGATACCATTTTACAACACTTTAACGTTAATCATATCGTGGTGGACACACCTCCA 923
E A E L D T I L Q H F N V N H I V V G H T S Q
AGAACGGGTCTTAGGTCTATCCACAACAAGTCATTGCCGTGATAGCAGCATAAAAGTCGGTAAATC 992
E R V L G L F H N K V I A V D S S I K V G K S
AGGTGAAGTCTATTACTGGAAAATAACCGGCTTATACGGGGTATATGACGGAACAGTGAACACT 1061
G E L L L L E N N R L I R G L Y D G T R E T L
GCAGGAAAATAGCCTTAATCAATAAAAAGTCCCTAAGCTAGATAGTAAAGCAAAGCAGAATGGTGGCAGT 1130
Q E N S L N Q * 340
CAATAAGTGACAGCCACCTAATTCATTTGGATTGGTTCTCTAACCACTATTTCATTTAACACACTCTGTC 1199
AGTCAGTGGCTTATCTGCGCTTCACTACTCAATAAAAATAACTTACAGCGCGACAAATGATACGCAAG 1268
CTT 1271

```

Figure 5-3. Nucleotide- and deduced amino acid-sequence of Phosphatase I.

The amino acid sequence is shown in the one-letter representation below the respective codons (an asterisk indicates a stop codon). The underlined regions represent sequences which match the partial peptide sequences listed in Figure 4-3: Asn¹-Thr²⁰, the N-terminus; Ile⁹³-Met¹⁰⁹, peptide I-22; Leu¹⁷⁸-Gln¹⁸⁷, peptide I-13.

第6節 GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質の発現と精製

前節で決定したフォスファターゼ I 遺伝子の塩基配列を基に、前節、第7項に記載した方法に従い、GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質を大腸菌 DH5 α 中で発現させ、タンパク質粗抽出画分から、GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質を glutathione-S-Sepharose カラムに供することにより分離精製した。その溶出像と溶出画分のフォスファターゼ活性を、Figure 5-4 に示した。

その結果、5 mM glutathione を含む精製用バッファーにより溶出された画分にフォスファターゼ活性が認められた。この溶出画分を SDS-PAGE¹²⁾ に供し、CBB 染色法によりタンパク質を検出したところ、GST-フォスファターゼ I 融合タンパク質は、約 60 kD のタンパク質として、均一に分離精製されていることが示された (Figure 5-5)。

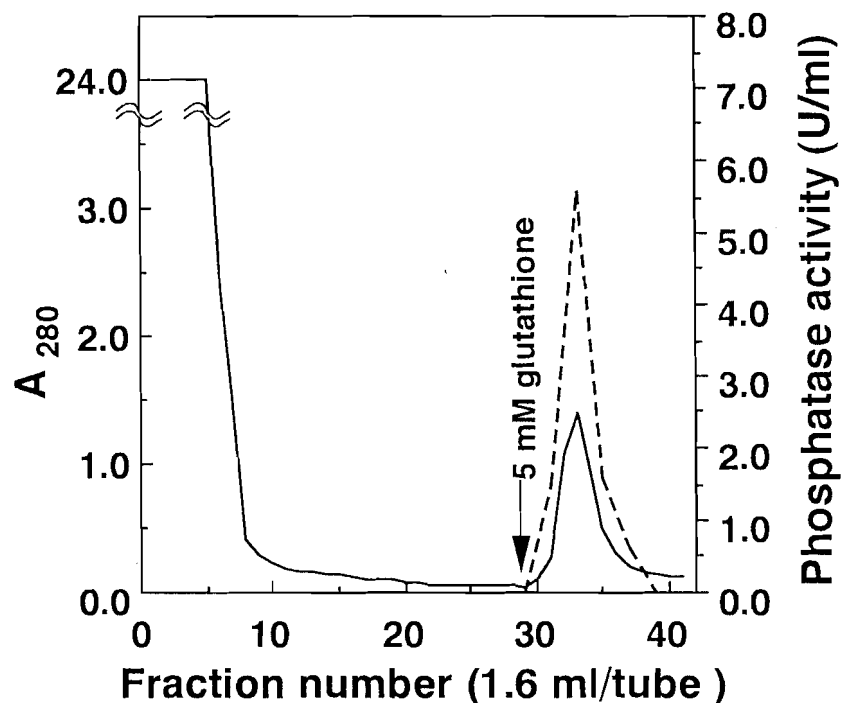


Figure 5-4. Glutathione-Sepharose 4B column chromatography.

The crude enzyme preparation was applied to a column of glutathione-Sepharose 4B column (ϕ 1.0 x 2.0 cm), and then adsorbed proteins were eluted with buffer F containing 5 mM glutathione.

The flow rate was 0.5 ml/min. *Solid line*, absorbance at 280 nm. *Dotted line*, phosphatase activity.

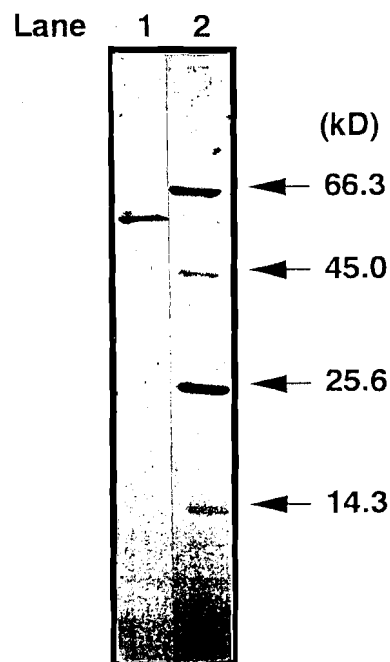


Figure 5-5. Homogeneity of purified GST-Phosphatase I fusion protein.

Lane 1: GST-Phosphatase I fusion protein (4.0 μ g), lane 2: molecular weight markers containing bovine serum albumin (66,300), chicken egg ovalbumin (45,000), bovine pancreas α -chymotrypsinogen (25,635), and chicken egg lysozyme (14,300).

第7節 融合タンパク質が有するフォスファターゼ活性の温度依存性

第3章、第3節、第3項に記載した方法に従い、GST-フォスファターゼI融合タンパク質が有するフォスファターゼ活性の温度依存性を検討した。

その結果、Figure 5-6に示すように、この融合タンパク質のフォスファターゼ活性の反応至適温度は、40°Cであり、低温域（0~15°C）においても、40°Cにおける活性の18.1~41.3%の活性を示した。

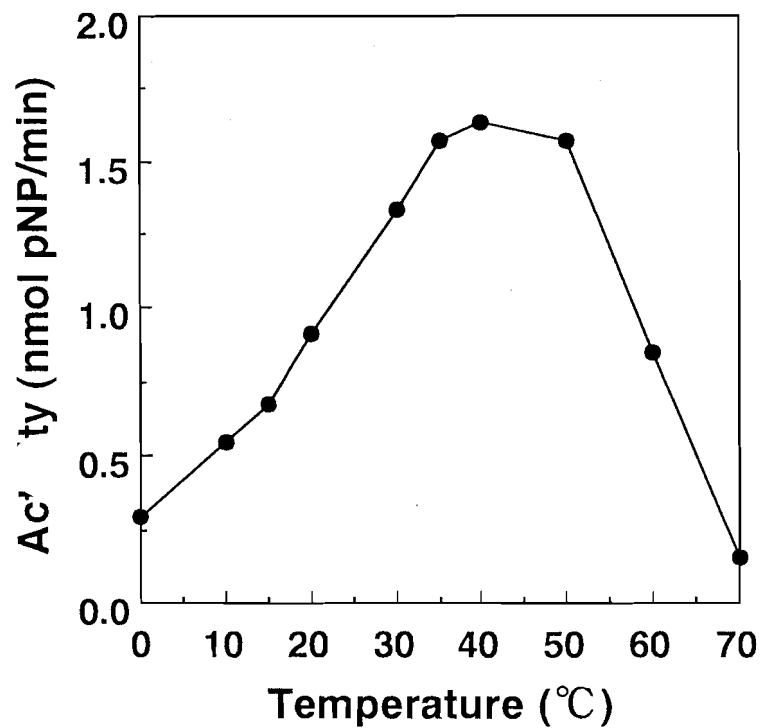


Figure 5-6. Dependence of phosphatase activity of GST-Phosphatase I fusion protein on temperature.

The phosphatase activity of GST-Phosphatase I fusion protein (211.8 ng) at indicated temperatures was determined in the text.

第 8 節 小括

本章では、好冷菌 (*Shewanella* sp.) ゲノム DNA から、フォスファターゼ I 遺伝子を含む DNA 断片を、PCR 法、inverse PCR 法により、クローニングし、その塩基配列 (1,836 bp) を決定した。その塩基配列から推測されるアミノ酸配列中に、第 4 章で示した本酵素の N 末端領域及び内部部分アミノ酸配列と完全に一致する配列が認められ、この遺伝子をフォスファターゼ I 遺伝子であると判断した。Figure 5-3 に示したように、フォスファターゼ I は、340 残基のアミノ酸から成り、その N 末端アミノ酸であるアスパラギン残基の上流に、21 残基のアミノ酸からなるシグナルペプチド様の配列が認められた。このフォスファターゼ I の推定アミノ酸配列について、ホモロジー検索を行ったところ、bacteriophage λ のプロテインフォスファターゼ λ PP、*Saccharomyces cerevisiae* のホスホプロテインフォスファターゼ PP-Z1、*Zea mays* のホスホプロテインフォスファターゼ PP1 中の配列と 11 残基のアミノ酸について相同性が認められた (Figure 5-7)。

	73	83	97	106	143	152
P-I	VALSDVHGQYD		MVMTGDIFDR		LLMGNHEQMV	
λ PP	WVVDLHGQYT		LISVGDLYDR		AVRGNHEQMM	
PPZ	KIVGDVHGQYG		YLFLGDYVDR		LLRGNHECAN	
PP1	KICGDVHGQYS		YLFLGDYVDR		LLRGNHECAS	
	* **		** **		****	▲

Figure 5-7. Sequence alignment of conserved protein phosphatase domain.

Each amino acid is shown in the one-letter representation. The numbers on the top of this alignment correspond to the amino acid numbers from N-terminus. *Asterisk* and *arrow* indicate identical amino acid between four proteins and catalytic amino acid residue in λ PP, respectively.

λ PP, bacteriophage λ protein-phosphatase; PPZ, *S. cerevisiae* phosphoprotein phosphatase PP-Z1; PP1, *Z. mays* phosphoprotein phosphatase PP1.

図中の*印で示した、この4分子種のフォスファターゼで同一のアミノ酸は、タイプ1のプロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼ中にみられる活性中心アミノ酸であるヒスチジン（図中の矢印）を含む保存領域であることが知られている³¹⁾。また、フォスファターゼIのアミノ酸配列中には、現在までに知られている PTPase と相同性を示す配列は認められなかった。この事実は、前章までの実験により得られた、フォスファターゼIが新規の PTPase であるといった結論を裏付けるものであった。

さらに、本章では、決定した塩基配列を基に、フォスファターゼIを GST との融合タンパク質として大腸菌 DH5 α 中で発現させ、融合タンパク質を分離精製することを試みた。即ち、IPTG による発現の誘導の後、菌体の破碎、さらに得られたタンパク質粗抽出画分を glutathione-S-Sepharose カラムに供した。これにより、約 60 kD の GST-フォスファターゼI 融合タンパク質を均一に分離精製した (Figure 5-5)。この融合タンパク質が有するフォスファターゼ活性の温度依存性を検討したところ、Figure 5-6 に示すように、この融合タンパク質は、低温域 (0~15 $^{\circ}$ C) においても、精製フォスファターゼI と同様に高い活性を示した。しかし、反応至適温度は 40 $^{\circ}$ C であり、第3章で記述した精製フォスファターゼI の反応至適温度 (30 $^{\circ}$ C) よりも高く、40 $^{\circ}$ C 以上の活性についても精製フォスファターゼI よりも高いことが示された。この相違は、フォスファターゼI の N 末端側に融合されている GST タンパク質の存在により、フォスファターゼI の立体構造が何らかの干渉を受け、本酵素の安定化に影響を及ぼしていることが推測される。

以上、本章では、フォスファターゼI 遺伝子のクローニング及びその組み換えタンパク質の発現と分離精製に成功したことを述べた。ここで得られた組み換えタンパク質は、この酵素の立体構造を解明するにあたりよい実験材料となると考えられる。

第6章 総括及び考察

本論文においては、低温酵素の構造と機能の相関性の研究に関連した有用な知見を提供、蓄積することを目的として、好冷菌 (*Shewanella* sp.) のフォスファターゼを分離精製する方法を確立し、その分子特性を明らかとした。第1章、序論において述べたように、低温酵素は、熱に対して不安定であることから、その単離は困難であることが予想された。この問題を克服するために、分離精製過程に使用する全ての緩衝液に、低温酵素の安定性を向上させる Mg^{2+} イオンと sorbitol を共存させた。その結果として、第2章に記載したように、2 kg の菌体より、分子量 38.4 kD のフォスファターゼ I (0.26 mg) と 41.0 kD のフォスファターゼ II (1.04 mg) を均一なタンパク質として分離精製することができた。

2種のフォスファターゼの酵素的性質を検討したところ、フォスファターゼ I の反応至適温度は、30°Cであり、低温域 (0~15°C) における活性は、30°Cでの活性の 27~38%を保持していた。また、フォスファターゼ I は、中性付近に高い活性を示し、酸性フォスファターゼあるいはアルカリフォスファターゼのどちらにも分類されなかった。これまでに、両フォスファターゼに分類されている酵素は、広い基質特異性を示すことが知られている^{32,33)}。しかし、フォスファターゼ I は、基質として合成基質である pNPP の他にはホスホチロシンだけを脱リン酸化した (Table 3-2)。この結果から、本酵素がタンパク質中のホスホチロシンを脱リン酸化する可能性が考えられた。この可能性を検討するために、第3章、第7節、第2項に記載したように、チロシン残基あるいは、セリン残基とスレオニン残基をリン酸化したポリペプチドを調製し、それらに対するこの酵素の脱リン酸化活性を測定した。その結果、チロシン残基をリン酸化した polyEY、MBP を基質とした時に、この酵素の脱リン酸化活性が認められた。これらの基質チロシンリン酸化タンパク質は、現在までに知られている PTPase の基質として頻繁に用いられているものである¹⁹⁾。

他方、フォスファターゼ II の反応至適温度は、40°Cであり、低温域における活性は、40°Cでの活性の 39~42%を保持していた。また、フォスファターゼ II

は、pH 9.8 に至適 pH を示したことから、アルカリフォスファターゼに分類された。現在までに報告されているアルカリフォスファターゼと同様に本酵素は、広い基質特異性を示し、特に、ATP、GTP、CTP、AMP、 β -glycerophosphate をよい基質とした。故に、フォスファターゼ II は、好冷菌生体内において、さまざまなリン酸化合物の脱リン酸化を通して、無機リン酸の供給経路において機能していることが推測される。また、この広い基質特異性と熱に対する不安定さを考慮すると、本酵素は、さまざまな実験技術において、新しいツールとして利用できる可能性を有している。例えば、タンパク質や DNA 等の選択的なリン酸化に際し、前処理として、本酵素で脱リン酸化すること等への応用が考えられる。フォスファターゼ II の触媒反応に及ぼす二価カチオンの影響を検討したところ、この酵素の活性は、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} イオンにより上昇し、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} イオンによりほとんど消失した。これに対して、対照酵素である *E.coli* のアルカリフォスファターゼでは、その活性の発現に、 Zn^{2+} と Mg^{2+} の両イオンが必須である³⁴⁾。この金属要求性の違いは、フォスファターゼ II に、対照酵素とは異なる、二価カチオンを介した触媒反応機構が存在することを示唆するものであった。

以上の酵素的性質のうち、両フォスファターゼの温度に対する特性について、両酵素は、i) 低温において高い活性を示すこと、ii) 反応最適温度が対照酵素のそれと比較して低温側にシフトしているとする低温酵素の特性を備えていた。

また、好冷菌フォスファターゼ I が PTPase 活性を有していること、フォスファターゼ II がアルカリフォスファターゼに分類されることを明らかとした。

現在、いくつかの分子種の PTPase が、哺乳動物、昆虫、酵母等から単離されている。PTPase が、タンパク質中のホスホチロシン残基の脱リン酸化により細胞周期、情報伝達などの生理的に重要なプロセスに関与していることが示唆されている²¹⁾。しかしながら、好冷菌を含む原核生物においては、“two-component system” と呼ばれるタンパク質のヒスチジン残基とアスパラギン酸残基のリン酸化は存在することが知られている³⁵⁾ もの、セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基のような水酸基を含むアミノ酸のリン酸化と脱リン酸化の例は稀で

ある。ところが、*E. coli*において熱ショックタンパク質である Dna K がそれ自身のスレオニン残基を自己リン酸化する活性を有していること³⁶⁾、シアノバクテリアのゲノム DNA 中にプロテイン-セリン/スレオニン-キナーゼとプロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼをコードする遺伝子が見い出されていること³⁷⁾、さらに最近、シアノバクテリア *Nostoc commune* UTEX 584 のゲノム中に PTPase をコードする遺伝子 (iph P) が見い出されており、*E. coli*において発現させたその組み換えタンパク質の特性が調べられている³⁸⁾。この Iph P PTPase は、タンパク質中のホスホチロシン残基とホスホセリン残基を脱リン酸化することが示され、シアノバクテリア内において鉄原子の保持と輸送に関わると推測されている。

精製したフォスファターゼ I の生体内における機能とその基質は明らかではないが、好冷菌自身の産生するホスホチロシンを含むタンパク質の脱リン酸化、あるいは菌体の生育における栄養源として摂取した外因性のペプチドもしくは、その分解物に含まれるホスホチロシンの脱リン酸化を通して生理的に重要なプロセスに関与していることが推測される。

また、第3章において、このフォスファターゼ I の活性中心アミノ酸がヒスチジン残基であり、分子中にただ一つ含まれているシステインは関与していないことを明示したが、前述した Iph P タンパク質を含め、現在までに報告されている PTPase の活性中心アミノ酸残基がシステインであること²¹⁾とは異なっていた。また、このフォスファターゼ I の N 末端領域のアミノ酸配列、及びリジルエンドペプチダーゼ処理により得られたペプチド断片のアミノ酸配列に対するホモロジー検索の結果、相同性を示す他のフォスファターゼが認められなかったことから、この好冷菌フォスファターゼ I が PTPase 様活性を有し、ヒスチジン残基を活性中心構成触媒残基とする新規のフォスファターゼであることを明らかとした。

最近、PTPase の構造と機能の相関性についての研究が進展し、全ての PTPase は、PTPase 触媒ドメインと呼ばれる約 250 アミノ酸残基からなる保存領域を有しており、このドメイン中には、固有のモチーフ (His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Arg、

Xaa は任意のアミノ酸) が存在していることが明らかにされている³³⁾。また、部位特異的変異や化学修飾の実験から、このモチーフ中のシステイン残基が、酵素活性に必須な活性中心アミノ酸残基であり、リン酸-酵素の中間体を形成すること³⁹⁾、アルギニン残基が、基質の認識と遷移状態の安定化に関与していること⁴⁰⁾が知られている。

タンパク質のリン酸化セリン残基あるいはリン酸化スレオニン残基を脱リン酸化するプロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼもまた、PTPaseと同様に、合成基質である pNPP を脱リン酸化する。このフォスファターゼの活性中心の触媒残基はヒスチジン残基であり、水素結合により相互作用するアスパラギン酸残基と共役して脱リン酸化反応を触媒する³¹⁾。

これらの事実から、次に挙げる仮説が成立する。即ち、フォスファターゼ I の活性中心の触媒部位について、本酵素は、i) 他の PTPase 中の固有のモチーフにおけるシステイン残基が、ヒスチジン残基に置換している構造を、あるいは、ii) プロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼの触媒部位と類似した構造を有している。また、基質結合部位については、PTPase 様の活性を有することから、iii) 他の PTPase おいて共通してみられる基質結合部位と同様の構造を保持している、あるいは、iv) 新規の基質結合モチーフが存在する。

この仮説を証明するためには、フォスファターゼ I の全アミノ酸配列の決定が必要となる。そこで、第 5 章に記述したように、フォスファターゼ I の部分アミノ酸配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、好冷菌ゲノム DNA からフォスファターゼ I 遺伝子をクローニングした後、その塩基配列を決定した。その配列から推測されるアミノ酸配列について、ホモロジー検索を行ったところ、bacteriophage λ 、*S.cerevisiae*、*Z.mays* のホスホプロテインフォスファターゼに相同性を示す配列が認められた。この配列は、プロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼ (タイプ 1) に保存されている、活性中心アミノ酸であるヒスチジン残基 (Figure 5-7、矢印で示した) を含む触媒ドメインの構造であることが知られている³¹⁾。また、PTPase との相同性は認められなかったことから、フォスファターゼ I の触媒部位について、先に述べた仮説 ii) が成立

することが示唆された。しかしながら、このフォスファターゼ I は、セリンあるいはスレオニンをリン酸化した基質に対しては脱リン酸化活性を示さないことから、基質結合部位については、プロテイン-セリン/スレオニン-フォスファターゼとは異なる構造を有していることが考えられる。

また、フォスファターゼ I の推定アミノ酸配列をみると、この酵素は、340 残基のアミノ酸から構成され、分子中に 2 つのシステインが存在することが示された。この結果と第 4 章のアミノ酸組成分析により得られた結果の相違から、フォスファターゼ I の C 末端領域のプロセシングとシステイン残基が何らかの修飾を受けている可能性が考えられた。

以上、好冷菌より精製したフォスファターゼ I が、新規の PTPase 様酵素であることを示し、その一次構造を明らかとしたが、上記の活性中心の構造に対する仮説をさらに証明するためには、このフォスファターゼ I の触媒部位と基質結合部位を形成しているアミノ酸配列の決定が、今後の課題として挙げられる。

低温酵素の温度に対する特性を考慮すると、フォスファターゼ I は、低温域で高い活性を示す点で、ユニークな構造を有していると考えられる。そこで、その理化学的性質を検討した。第 3 章の Table 3-1 に示したフォスファターゼ I のアミノ酸組成をみると、分子中に含まれるプロリン残基のモル%が、1.8 %であり、BAP C75 の 4.7 %⁹⁾ とヒト PTP1B の 6.9 %⁴¹⁾ 等に比べ低い値を示した。また、本酵素は、システイン残基をただ一つしか含んでいないことから、分子内にジスルフィド架橋は存在しないことを示した。

タンパク質分子中のプロリン残基は、unfolding 状態のエントロピーを減少させることにより、folding 状態の構造を安定化させることが知られており⁴²⁾、耐熱酵素においては、ヘリックスの N-cap 部位に頻繁に存在することが知られている⁴³⁾。同様に、ジスルフィド結合はタンパク質の二次構造間に架橋することにより立体構造を安定化させる⁴⁴⁾。このようなタンパク質の立体構造を安定化させる要因の欠如が、フォスファターゼ I の高次構造に柔軟性を付与し、このことが低温で酵素活性を発現する特性に寄与していると推察される。

これまでに、いくつかの分子種の低温酵素が、低温環境において生育する生物種からクローニングされた遺伝子を *E.coli* での大量発現することにより、組み換えタンパク質として得られ、その分子特性が検討されている²⁾。しかし、それらの構造と機能の相関性に関する普遍的な知見は得られていない。

低温酵素の構造と機能の相関性、つまりは低温酵素の分子機能特性を決めている構造的要因を解明するためには、この酵素タンパク質の立体構造、あるいは触媒ドメインの構造の温度依存的変動の解析が主要な命題となる。今後、本研究の主要な研究課題として、フォスファターゼ I の組み換えタンパク質についての高次構造の解析等が挙げられる。

以上、低温酵素として、好冷菌 (*Shewanella* sp.) から、2 分子種のフォスファターゼを分離精製し、特に、新規の PTPase であるフォスファターゼ I について、その分子特性を詳細に検討した。得られた多くの知見は、低温酵素の構造と機能の相関性を理解する上で有用であることが認められた。

第7章 要約

- 1) 2 kg の好冷菌 (*Shewanella* sp.) より、低温酵素である 2 種のフォスファターゼ (フォスファターゼ I、II) を、順次、DEAE-Cellufine、Butyl-Cellulofine、Hydroxylapatite、Sephacryl S-100、Mono-Q カラムに供し、分離精製した。その結果、フォスファターゼ I は、58 units/mg の比活性を有する 38,400 の分子量、フォスファターゼ II は、104 units/mg の比活性を有する 41,000 の分子量を示す均一なタンパク質として得ることができた。
- 2) フォスファターゼ I の至適 pH は、6.0 であり、この酵素は、pH 6.0~8.0 の間で安定であった。その活性は、 Mg^{2+} イオンにより上昇し、 Zn^{2+} イオンにより低下した。また、本酵素が、タンパク質中のホスホチロシン残基を特異的に脱リン酸化する活性を有すること、各種阻害剤を用いた実験により、このフォスファターゼの活性中心アミノ酸がヒスチジン残基であることを示した。これらの結果から、本酵素が、新規の PTPase 様フォスファターゼであることを明示した。
- 3) フォスファターゼ II の至適 pH が、9.8 であることから、このフォスファターゼがアルカリフォスファターゼに分類されること、この酵素が、広い基質特異性を有することを示した。また、この酵素の活性の発現には、 Mg^{2+} イオンが要求され、一方、 Zn^{2+} イオンは、その活性を阻害することを明らかにした。
- 4) 両フォスファターゼの温度に対する影響を調べたところ、両酵素とも低温域における活性は高く、それぞれの反応最適温度は、30°C (フォスファターゼ I)、40°C (フォスファターゼ II) であった。特に、フォスファターゼ II の最適温度は、対照酵素である BAP のそれ (80°C) と比較して低温側にシフトしていた。この結果から、両酵素が、低温酵素の特性を備えていることを示した。
- 5) 精製フォスファターゼ I のアミノ酸組成を調べたところ、本酵素は、335 残基のアミノ酸から構成されており、そのアミノ酸中のプロリン残基のモル%

が低いこと、また、システイン残基がただ一つしか含まれておらず、故に、フォスファターゼ I の分子内にジスルフィド結合が存在しないことが示された。また、この酵素タンパク質の N 末端領域と内部部分配列を決定し、得られた配列に対するホモロジー検索の結果、これらの配列と相同性を示す配列を有するフォスファターゼは認められず、このフォスファターゼ I が、新規の酵素であることを示唆した。

- 6) 決定されたフォスファターゼ I の N 末端領域と内部部分アミノ酸配列を基に、フォスファターゼ I 遺伝子を含む DNA 断片を、PCR 法、inverse PCR 法によりクローニングし、その塩基配列 (1,826 bp) を決定した。さらに、決定した塩基配列を基にフォスファターゼ I を GST との融合タンパク質として大腸菌 DH5 α 中で発現させ、その発現タンパク質を glutathione-S-Sepharose カラムにより均一なタンパク質として分離精製することに成功した。この融合タンパク質の有するフォスファターゼ活性は、好冷菌より精製したフォスファターゼ I の活性と同様に低温域においても高い活性を示した。

参考文献

- 1) Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 715-728
- 2) Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., and Gerday, Ch. (1989) Enzymes from psychrophilic organism. *FEMS Microbiology Reviews*, **18**, 189-202
- 3) Davail, S., Feller, G., Narinx, E., and Gerday, Ch. (1994) Cold adaptation of proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17448-17453
- 4) Guan, K. L. and Butch, E. (1995) Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH 2, which selectively dephosphorylates the mitogen activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7197-7203
- 5) Shiozaki, K., Akhavan-Niaki, H., and McGowan, H. C. (1994) Protein phosphatase 2C, encoded by *ptcl+*, is important in the heat shock response of *Shizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3742-3751
- 6) Amores, M. V., Hortelano, P., Garcia, S. L., and Lupianez, J. A. (1994) Metabolic adaptation of renal carbohydrate metabolism. V. *In vitro* response of rat renal-tubule gluconeogenesis to different diuretics, *Mol. Cell. Biochem.*, **137**, 117-125
- 7) Yeaman, S. J., Smith, G. M., Jepson, C. A., Wood, S. L., and Emmison, N. (1994) The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv. Enzyme. Regul.*, **34**, 355-370
- 8) Sharfstein, S. T. and Keasling, J. D. (1994) Polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **745**, 77-91
- 9) Wyckhoff, H. W., Handschumacher, M., Murthy, H. M. K., Sowadski, J. M. (1983) The three dimensional structure of alkaline phosphatase from *E. coli*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **55**, 453-480

- 10) Tsuruta, H., Tsuneta, S. T., Ishida, Y., Watanabe, K., Uno, T., and Aizono, Y. (1998) Purification and some characteristics of phosphatase of a psychrophile. *J. Biochem.*, **123**, 219-225
- 11) Ishida, Y., Tsuruta, H., Tsuneta, S. T., Uno, T., Watanabe, K., and Aizono, Y. (1998) Characteristics of psychrophilic alkaline phosphatase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2246-2250
- 12) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- 13) Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-326
- 14) Morrissey, J. H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gel : A modification procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, **117**, 307-310
- 15) Tsuruta, H. and Aizono, Y. (1999) Enzymatical properties of psychrophilic phosphatase I. *J. Biochem.*, **125**, in print.
- 16) Brunai, A. M. and Pinna, L. A. (1988) Characterization of four tyrosine protein kinases from the particulate fraction of rat spleen, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 451-457
- 17) Brunai, A. M., Marchiori, F. and Pinna, L. A. (1985) Isolation and partial characterization of distinct forms of tyrosine protein kinase from rat spleen. *FEBS lett.*, **188**, 321-325
- 18) Kimelberg, H. K. and Papahadjopoulos, D. (1972) Phospholipid requirements for (Na⁺+K⁺)-ATPase activity : head group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 277-292
- 19) Hiraga, A., Munakata, H., Hata, K., Suzuki, Y., and Tsuiki, S. (1992) Purification and characterization of rat liver protein tyrosine phosphatase with sequence similarity to src-homologyregion 2. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 195-206

- 20) Kleantous, C., Cullis, P. M., and Shaw, W. V. (1985) 3-(Bromoacetyl)-chloramphenicol, an active site directed inhibitor for chloramphenicol-acetyltransferase. *Biochemistry*, **24**, 5307-5313
- 21) Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1990) Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 101-120
- 22) Gurd, F. R. N. (1972) Carboxymethylation. *Methods. Enzymol.*, **25**, 424-438
- 23) Miles, E. W. (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate, *Methods. Enzymol.*, **47**, 431-442
- 24) Robinson, G. W., Bradshaw, R. A., Kanarek, L., and Hill, R. L. (1967) The thiol groups of fumarase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2709-2718
- 25) Nishida, E. and Kobayashi, T. (1977) Relationship between tubulin SH groups and bound guanine nucleotides. *J. Biochem.*, **81**, 343-347
- 26) Levy, H. M., Leber, P. D., and Ryan, E. M. (1963) Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosine triphosphate and phosphatase compounds. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3654-3659
- 27) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?Jform->
- 28) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual* 2nd Eds.
- 29) Triglieri, T. Peterson, M. G., and Kemp, D. J. (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 8186
- 30) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- 31) Zhuo, S., Clemens, J. C., Stone, R. L., and Dixon, J. E. (1994) Mutational analysis of a ser/thr phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26234-26238

- 32) von Tigerstrom, R. G. (1984) Production of two phosphatases by *Lysobacter enzymogenes* and purification and characterization of the extracellular enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 693-698
- 33) Olzak, M., Watorek, W., and Morawiecka, B. (1997) Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, **1341**, 14-25
- 34) Plocke, D. J., Levinthal, C., and Vallee, B. L., (1962) Alkaline phosphatase of *Escherichia coli* : A zinc metalloenzyme. *Biochemistry*, **1**, 373-378
- 35) Bourret R. B., Borkovich, K. A., Simon, M. I. (1991) Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 401-441
- 36) Zyllicz, M., LeBowitz, J. H., MacMcken, R., and Georgopoulos, C. (1983) The dnaK protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an *in vitro* DNA replication system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 6431-6435
- 37) Zhang, C. -C., Gonzalez, L., and Phalip, V. (1998) Survey, analysis and genetic organization of genes encoding eukaryotic-like signaling proteins on a cyanobacterial genome, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3619-3625
- 38) Potts, M., Sun, H., Mockaitis, K., Kennelly, P. J., Reed, D., and Tonks, N. K. (1993) A protein-tyrosine/serine phosphatase encoded by the genome of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584, *J. Biol. Chem.*, **268**, 7632-7635
- 39) Guan, K. and Dixon, J. E. (1991) Evidence of protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cystein-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17026-17030
- 40) Zhang, Z. -Y., Wang, Y., Wu, L., Fauman, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1994) The Cys(X)₅Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry*, **33**, 15266-15270

- 41) Pallen, C. J., Lai, D. S. Y., Chza, H. P., Boulet, I., and Tong, P. H. (1991) Purification and characterization of high-molecular-mass form of protein phosphotyrosine phosphatase (PTP1B) from placental membrane. *Biochemical J.*, **276**, 315-323
- 42) Matthews, B. W., Nicholson, H., and Beckel, . J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 6663-6667
- 43) Rentier-Delrue, F., Mande, S. C., Moyens, S., Terpstra, P., Mainfroid, V., Gorai, K., Lion, M., Hol, W. G. J., and Martial, J. A. (1993) Cloning and overexpression of the triose isomerase genes from psychrophile and thermophilic bacteria. *J. Mol. Biol.*, **229**, 85-93
- 44) Vihinen, M. (1987) Relationship of protein flexibility to thermostability. *Prot. Eng.*, **1**, 477-480

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご懇篤な御鞭撻を頂きました、神戸大学農学部、相菌 泰生 教授に篤く御礼申し上げます。また、終始適切なお指導を賜りました神戸大学農学部、山形 裕士 助教授、宇野 知秀 助手に深謝いたします。

本論文を御校閲くださいました神戸大学農学部、大川 秀郎 教授及び岸原 士郎 教授、神戸大学発達科学部、上地 真一 教授に深謝申し上げます。

また、実験材料である好冷菌をご恵与いただきました、佐賀大学農学部、渡辺 啓一 助教授に篤く御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり惜しみないご協力をくださいました、常田 ソフィア 輝子嬢、石田 良博氏並びに神戸大学農学部生物化学講座の皆様へ感謝いたします。