

論 文

グルコアミラーゼ澱粉結合ドメインフラグメントの アミノ酸置換タンパク質 C509G と C509S の熱変性

田中晶善*, 苅田修一**, 小菅芳栄***, 妹尾啓史*, 小畑 仁*

(受取日: 1999年7月28日, 受理日: 1999年8月20日)

Thermal Unfolding of Mutant Forms C509G and C509S of Starch Binding Domain-Fragment of *Aspergillus niger* Glucoamylase

Akiyoshi Tanaka,* Shuichi Karita,** Yoshie Kosuge,*** Keishi Senoo,* and Hitoshi Obata*

(Received July 28, 1999, Accepted August 20, 1999)

Thermal unfolding of the starch binding domain-fragment (SBDF; Thr507-Arg616) of *Aspergillus niger* glucoamylase and its mutant forms, Cys509→Gly (C509G) and Cys509→Ser (C509S), were investigated by adiabatic differential scanning calorimetry (DSC) to analyze the effect of the disulfide bridge (Cys509-Cys604) on thermal stability of SBDF. All the proteins, the wild type SBDF (WT), C509G, and C509S, showed single endothermic peak, and the peak temperature of the mutant proteins was lower than that of WT by about 9 degree. The apparent destabilization in the standard Gibbs free energy change caused by these mutations was 8-9 J mol⁻¹ at the temperature of half-denaturation of the WT protein (52°C). It was suggested that a part of each protein forms dimer in the native state.

1. 緒 言

*Aspergillus niger*のグルコアミラーゼ [EC 3.2.1.3] は 616 アミノ酸残基からなる糖タンパク質で、二つの主要なドメインから構成される^{1,4)}。一つはN末端側の触媒ドメイン、もう一つはC末端側の澱粉結合ドメイン (starch binding domain; SBD) で、短いリンカーがこれらを結合している。本酵素の熱変性を、断熱型DSCによって観測した結果⁵⁾ から、澱粉結合ドメインは触媒ドメインとは全く独立に変性し、また触媒ドメインの変性が不可逆であるの

に対して澱粉結合ドメインの変性は可逆的であることが判明している。

筆者らは、Thr507-Arg616 が構成する澱粉結合ドメインのフラグメントSBDFを遺伝子工学的手法を用いて調製し、その熱変性反応を断熱型DSCを用いて観測した⁶⁾。その結果、その変性が完全に可逆的であること、ほぼ二状態転移で説明できること、また触媒ドメインなどを含む全長タンパク質中での熱変性に比較して変性温度が低下すること、などを報告した。

SBDFには、その両端付近にある二つのシステイン残基、

* 三重大学生物資源学部, ** 遺伝子実験施設, *** 教育学部: 〒514-8507 三重県津市上浜町1515

* Faculty of Bioresources, **Center for Molecular Biology and Genetics, ***Faculty of Education, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Cys509とCys604が形成するジスルフィド結合が存在する⁷⁾。一般にジスルフィド結合はタンパク質を安定化させる要因と考えられている。本研究では、Cys509をグリシンとセリンに置換してジスルフィド結合を除いた変異型SBDF, C509GとC509Sを調製し、その熱変性をDSCを用いて観測することにより、熱変性におけるジスルフィド結合の寄与を評価することを試みた。(なお、アミノ酸番号は全長タンパク質におけるものを暫定的に踏襲したが、フラグメント単独としては、Cys509はCys3に相当する。)

2. 実験

2.1 試料

野生型SBDF (以下、野生型またはWT) およびそのアミノ酸置換タンパク質Cys509Gly (C509G)とCys509Ser (C509S) は次のように調製した。

2.1.1 変異型SBDF発現のためのプラスミドの構築

プラスミドの調製、DNA断片の電気泳動や、他の基本的な遺伝子取扱技術については、通常の方法を用いて行った⁸⁾。PCRによる部位特異変異によってC509GとC509Sをコードする遺伝子を作成した。それぞれ、5'-AAGGATCCATCGAGGGAAGGACCTCCGGTACCAC TCCCACC-3'と5'-AAGGATCCATCGAGGGAAGGACCTCCTCTACCCTCCCACC-3' (下線は変異箇所を示す; WTではTGT)をフォワードプライマーとして用いた。リバースプライマーとして、前報⁶⁾に記載したプライマーを使用した。PCRによって増幅した断片をpBluescriptIIISK- (Stratagene)に連結し、pAsSBD-C509G, およびpAsSBD-C509のそれぞれを構築した。この塩基配列を、Dye-terminator cycle sequencing kitおよび310 PRISM (PE Applied Biosystems)により決定し、意図しない変異が導入されていないことを確認した。各々の断片をpQE30 (Quiagen)にサブクローン化して、生じたプラスミドをpQESBD-C509G, pQESBD-C509Sと各々命名し、以下の実験に供した。野生型のSBDFの発現には、pQESBD1⁶⁾を使用した。

2.1.2 野生型SBDFと変異型SBDFの大腸菌での発現と精製

pQESBD1, pQESBD-C509G, pQESBD-C509Sを含む大腸菌JM109株を用いて、Ni-NTA agarose (Quiagen)により各タンパク質を精製した⁷⁾。精製画分を20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)で一晩透析した。透析の後、SBDFと変異型SBDFをトリプシンにより限定加水分解し、ヒスチジンタグを除去した。この反応液を、Hitrap-Q Sepharose (Pharmacia-Amersham)に供した。回収したタンパク質を水に対して一晩透析し、凍結乾燥したものを最終精製標品とした。SBDFと変異型SBDFのN末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサー476A (PE Applied Biosystems)

により決定し、ヒスチジンタグの除去とSBDFの変異をアミノ酸のレベルでも確認した。

タンパク質濃度は、280 nmにおけるモル吸光係数 $\epsilon = 3.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて計算した。

2.2 DSC測定

各タンパク質の熱変性は、マイクロカル社製断熱型DSC (VP-DSC)⁹⁾を用い、昇温速度 1 K min^{-1} で測定した。緩衝液としてそれぞれ20mMのリン酸緩衝液 (pH 7), およびグリシン緩衝液 (pH 2)を用い、各サンプルをこれら緩衝液で透析し、最終透析外液を測定のための参照液とした。得られたDSCデータはPrivalovら¹⁰⁾とSturtevantの方法¹¹⁾に基づいて解析した。DSCの実測値と理論値の標準偏差は、過熱熱容量の最大値 c_{max} に対する相対値 (%)で表示した。ベースラインはTakahashiらの方法¹²⁾で求めた。

3. 結果と考察

3.1 pH7での変性反応

pH 7における野生型SBDF (WT), および、その変異型タンパク質C509GとC509SのDSC曲線の例をFig.1に示す。野生型 (Fig.1 a)については既報の結果とほぼ同じであり、また同じ溶液を数回繰り返して走査しても同じDSC曲線が得られ、変性は完全に可逆的であった。ジスルフィド結合を欠く二種の変異型タンパク質の場合 (Fig.1 b, c)は、置換アミノ酸の種類によらず、両者ほぼ同じDSC曲線であった。吸熱ピークは単一であり、野生型に比較してピーク温度は約9℃低下した。今回の測定濃度範囲内において、いずれのタンパク質の場合も濃度の増大に伴ってピーク温度がやや高くなる傾向が見られた。これは変性に解離が伴うことを示唆する。

変性の前後におけるベースラインを比較すると、変性前領域では比較的大きな正の勾配が観測され、変性後ではほとんど勾配がなかった。すなわち、変性の前後での比熱の変化 Δc_p は温度に依存する。

走査後のC509G, C509Sそれぞれの溶液を5~10℃まで冷却し、ただちに再走査を行うと、いずれの場合も最初の走査では見られなかった小さいピークが25℃付近に現れた (Fig.1 c, f)。最初の走査で観測された45℃付近のピークは、ピーク温度は変化せず、ピーク高さ (面積)のみが減少し、その減少分は25℃付近のピーク面積に相当した。再走査後のそれぞれの溶液を冷却し、再度走査すると、25℃付近の小さいピークも含め、再走査の場合とほぼ同じDSC曲線が得られた。

各タンパク質の変性について単純な二状態転移 $N \rightleftharpoons D$ (Nは天然状態, Dは変性状態を表す)を仮定し、それぞれの最初の走査について、変性の中点温度 $t_{1/2}$ (この温度で、 $[D]/[N] = 1$)、変性のエンタルピー変化 Δh_{cal} (J g^{-1})、お

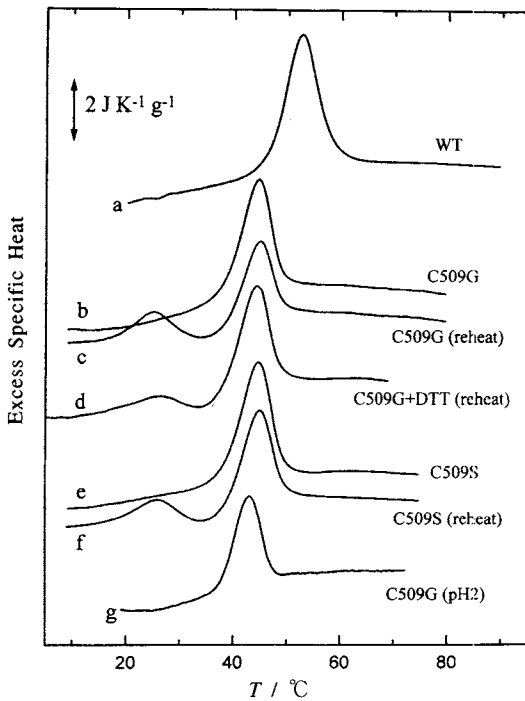


Fig.1 DSC traces of the thermal unfolding of the starch binding domain-fragment of *Aspergillus niger* glucoamylase (wild type; WT) and its two mutant forms C509G and C509S. Observed at pH 7 unless otherwise stated. DTT; dithiothreitol (0.3%).

よびファントホッフのエンタルピー変化 ΔH_{vH} と ΔH_{cal} ($=\Delta h_{cal} \times 12,100 \text{ g mol}^{-1}$) の比, $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ を最小自乗法によって求めた。その結果を **Table 1** にまとめる。**Fig.2** は、C509S について得られたDSC曲線(実線)と、その解析の結果得られたパラメータを用いた理論曲線(波線)の例である。図に示すように、計算値と実測値には若干のずれが見られ、標準偏差は野生型よりかなり大きい値であった。

野生型, C509G, C509S いずれの場合も, $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ は 1 より大きい値を示した。ピーク温度が濃度増大に伴って上昇することから、天然状態において一部が二量体を形成しており、変性と共に解離するものと推定される。*

* 最も単純なモデルとして、 $N_2 \rightleftharpoons 2D$ を仮定してDSC曲線を解析すると、ピーク後のDSC曲線がより大きな傾斜を持つことを含め、実験結果をかなりよく再現し、標準偏差の改善もみられた。

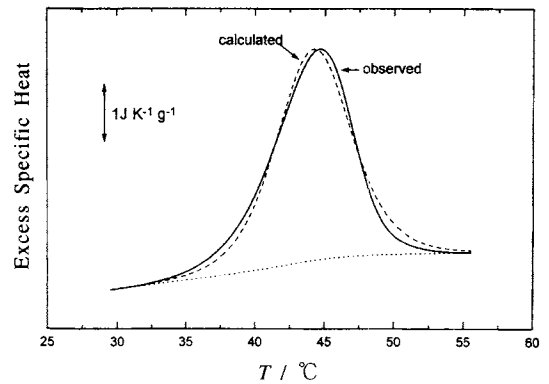


Fig.2 An example of the DSC curve analysis. Protein; C509S (0.77 mg ml^{-1}). Observed at pH 7 (20 mM phosphate buffer). Solid line is the observed DSC data and the dashed line is a theoretical curve using $\Delta h_{cal} = 25.9 \text{ J g}^{-1}$, $t_{1/2} = 44.2 \text{ }^\circ\text{C}$, and $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} = 1.5$. The standard deviation of the calculated values from the observed data was 3.5% relative to the maximum excess specific heat c_{max} .

3.2 ジチオスレイトール共存系での変性

C509G と C509S の再走査で観測された 25°C 付近のピークの実体を推定するために、ジチオスレイトール (DTT) 共存系で熱変性を観測した。DTT 0.3% 共存系における C509G の再走査の例を **Fig.1 d** に示す。DTT 添加により 25°C 付近のピークは明らかに小さくなった。このことは、25°C 付近のピークが 2 量体の熱変性であることを示唆する。すなわち最初の走査によって熱変性したタンパク質の 2 分子が、それぞれに一個所存在する Cys 残基 (Cys604) によって分子間ジスルフィド結合を形成したのち、天然状態に近い構造に巻き戻ったものと推定される。NMR から明らかにされた SBDF の立体構造⁷⁾ によれば、Cys604 は分子表面に存在しており、分子間ジスルフィド結合を形成することは不可能ではないと考えられる。変性温度が低下したのは、分子間ジスルフィド結合の形成によって天然状態の立体構造にゆがみが生じた可能性が推定される。

3.3 β -シクロデキストリン共存系

β -シクロデキストリンは、グルコアミラーゼの澱粉結合ドメイン、およびそのフラグメント SBDF に特異的に結合する。 β -シクロデキストリン共存系 (1 mM) において熱変性を観測した。いずれのタンパク質の場合も DSC 曲線は高温側へシフトした。野生型の場合、ピーク温度が約 6°C、C509G と C509S の場合はいずれも約 9°C 上昇した。用いた β -シクロデキストリン濃度は、 β -シクロデキストリンの解

Table 1 Thermodynamic parameters of the thermal unfolding of the starch binding domain fragment of *Aspergillus niger* glucoamylase (WT) and its two mutant forms C509G and C509S.

protein	No. of observation	pH	protein conc. (mg/ml)	β CD conc. (mM)	$t_{1/2}$ (°C)	Δh_{cal} (J g ⁻¹)	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$	ΔC_p^d at $t_{1/2}$ (J K ⁻¹ g ⁻¹)	S.D. (%)
WT	4	7	0.14-0.95	0	52.1-52.4	31.6 ± 0.8	1.16 ± 0.04	0.37 ± 0.11	1.1 ± 0.3
WT	1	7	0.42	1	58.3	43.4	0.99	0.65	2.9
WT	1	2	0.29	0	58.1	20.6	2.83	0.32	2.4
C509G	3	7	0.10-0.34	0	43.4-43.8	23.0 ± 1.0	1.67 ± 0.07	0.86 ± 0.25	4.7 ± 0.1
C509G	1	7	0.72	1	52.9	38.5	1.18	0.55	4.7
C509G	1	2	0.62	0	42.6	16.1	2.87	0.33	3.5
C509S	4	7	0.14-0.77	0	42.9-44.2	23.5 ± 1.5	1.57 ± 0.12	0.17 ± 0.06	4.2 ± 0.5
C509S	1	7	0.13	1	53.3	33.5	1.45	~0	4.3
C509	1	2	0.30		~43	-	-	-	-

Figures after ± are standard deviation.

離定数より十分に高く、変性温度の上昇はタンパク質分子の構造の安定化によるものではなく、変性に伴うβ-シクロデキストリンの解離平衡のシフトによる見かけ上のものであると考えられる。

それぞれの結果について解析を行い、変性のパラメータをTable 1のように得た。 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ は野生型でほぼ1となり、β-シクロデキストリンの結合により天然状態で単量体となっていることが示唆される。C509GとC509Sの場合も同様に、β-シクロデキストリン非共存系の場合に比較して $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ の値が減少し、1に近い値を示した。

またC509GとC509Sの再走査で観測される低温側の小さいピーク温度も、β-シクロデキストリンの共存によって高温側にシフトしている。β-シクロデキストリンが結合可能な、天然状態に近い立体構造を保ったまま、分子間ジスルフィド結合で二量体化しているものと推定される。

3.4 pH 2における変性

野生型SBDFはpH 4.5付近で最も高い変性温度 (65 °C以上)を示したが、変性と共に沈殿し、熱力学量の評価は不可能であった。

pH 2における変性の観測を試みた。pH 7での結果と比較すると、野生型では変性温度の上昇が見られたが、C509Gの場合 (Fig. 1 g), 変性温度はほとんど変化せず、 Δh_{cal} が減少した。沈殿は起こらなかったが、いずれの場合も再走査をしても吸熱ピークは観測されず、変性は不可逆であった。解析結果をTable 1に示す。いずれの場合も Δh_{cal} が減少すると共に、 $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ の値が3に近くなり、オリゴマーが形成されていることを示す。

4. ジスルフィド結合の効果

タンパク質にアミノ酸置換を行ったことによる効果は、変性の熱力学量を一定の温度で比較することで評価できる。野生型の $t_{1/2}$ における変性のギブズ自由エネルギー変化の差、 $\Delta\Delta G_d^0$ は次式から得られる。

$$\Delta\Delta G_d^0 = \Delta H_{cal,m} \frac{T_{1/2,m} - T_{1/2}}{T_{1/2,m}} - \Delta C_{p,m} (T_{1/2,m} - T_{1/2} + T_{1/2} \ln \frac{T_{1/2}}{T_{1/2,m}}) \quad (1)$$

ここで、添字mはアミノ酸置換タンパク質を、また添字のないものはWTを示す。 $\Delta C_p = \Delta C_{p,m} \times 12,100 \text{ g mol}^{-1}$, また、 $T_{1/2} / K = t_{1/2} / ^\circ\text{C} + 273.15$ である。式 (1) から明らかなように、正確な比較のためには、正確な $\Delta C_{p,m}$ の評価が不可欠である。DSC曲線から直接 $\Delta C_{p,m}$ を求めることも不可能ではないが一般には誤差が伴いやすく、通常、pHを種々に変えることで変性温度を変え、それぞれの Δh_{cal} を評価し、その温度依存性から求めることが多い。しかしながら今回の場合、この方法を用いることはできなかった。

暫定的にTable 1の $\Delta C_{p,m}$ を用いた場合、式 (1) から、C509Gでは-8.9 kJ mol⁻¹, またC509Sでは-8.2 kJ mol⁻¹ (いずれも不安定化) と計算された。C509Gの場合、野生型の $t_{1/2}$ における Δh_{cal} は30 J g⁻¹となり、野生型の Δh_{cal} とほとんど同じとなる。したがって不安定化の原因は、ジスルフィド結合が欠落したことによって、変性状態のエントロピーが増大したことによると推定される。

現在、C509G + C604G, およびC509S + C604Sの調製

も含め、より正確な熱力学量の評価と比較の方法について検討を進めている。

謝 辞

DSC装置を使わせていただいた、エール大学Sturtevant名誉教授、およびDTT共存系でのDSC測定をご指導いただきました大阪府立大学深田はるみ先生に深謝します。

文 献

- 1) B. Svensson, T. G. Pedersen, I. Svendsen, T. Sakai, and M. Ottesen, *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 55-69 (1982).
- 2) B. Svensson, K. Larsen, I. Svendsen, and E. Boel, *Carlsberg Res. Commun.* **48**, 529-544 (1983).
- 3) B. Svensson, H. Jespersen, M. R. Sierks, and E. A. MacGregor, *Biochem. J.* **264**, 309-311 (1989).
- 4) A. P. Gunning, V. J. Morris, G. Williamson, and N. J. Belshaw, *Analyst* **119**, 1939-1942 (1994).
- 5) A. Tanaka, H. Fukada, and K. Takahashi, *J. Biochem.* **117**, 1024-1028 (1995).
- 6) A. Tanaka, S. Karita, Y. Kosuge, K. Senoo, H. Obata, and N. Biosci, *Biotech. Biochem.* **62**, 2127-2132 (1998).
- 7) K. Sorimachi, A.J. Jacks, M.-F. Le Gal-Coëffet, G. Williamson, D.B. Archer, and M. P. Williamson, *J. Mol. Biol.* **259**, 970-987 (1996).
- 8) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis,

Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

- 9) V. V. Plotnikov, J. M. Brandts, L.-N. Lin and J. F. Brandts, *Anal. Biochem.* **250**, 237-244 (1997).
- 10) P. L. Privalov and N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684 (1974).
- 11) J. M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488 (1987).
- 12) K. Takahashi and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **20**, 6185-6190 (1981).

要 旨

黒麹かびグルコアミラーゼの澱粉結合ドメインフラグメント (Thr507-Arg616; 以下WT) と、そのCys509をグリシンとセリンに置換した二種のアミノ酸置換タンパク質、C509GとC509Sを遺伝子工学的手法によって調製した。これらの熱変性を断熱型DSCによって観測し、ジスルフィド結合が熱変性パラメータに与える効果を調べた。pH7において、いずれのタンパク質も単一の吸熱ピークを示し、C509GとC509Sの変性のピーク温度は、いずれもWTに比較して約9℃低下した。野生型の変性の中点温度 (52℃) で比較すると、これらのアミノ酸置換タンパク質は変性のギブズ自由エネルギー変化で8~9 kJ mol⁻¹不安定化した。三種のタンパク質とも、天然状態において部分的に二量体化していると推定された。