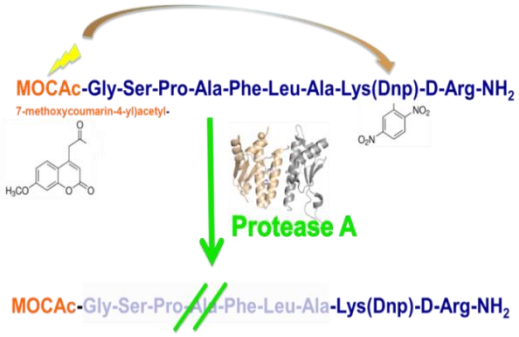
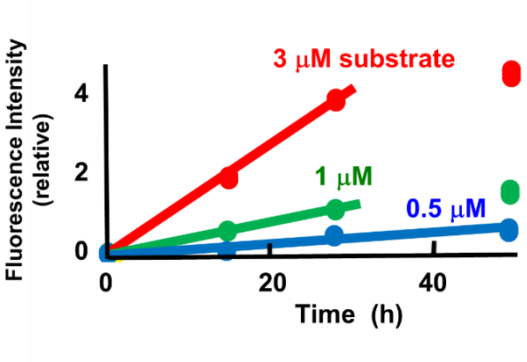
新規酵素の機能発見：活性測定法の確立

大阪府立高津高等学校　（科学部）
堀　建哉
指導教員：藤村　直哉

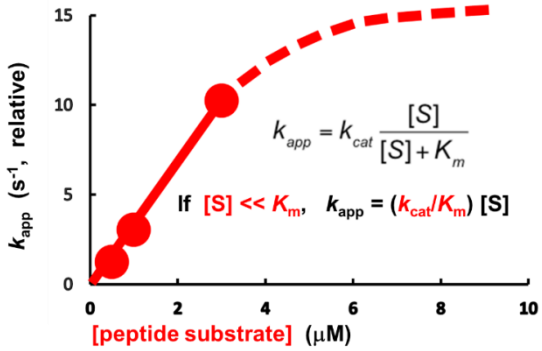
研究概要

すべての生物において、1/3 のタンパク質は機能的に研究されておらず、その状況は人間も同じであるので、機能の発見は科学の未来に大きく貢献すると考えられる。そこで、ほとんど研究されていない高度好熱菌のタンパク質についての研究を始めた。蛍光色素のついた合成基質を用いて。酵素活性測定方法を確立した。その方法を利用して、さまざまな金属イオンを添加した時の活性を調べたところ、活性発現には亜鉛イオン Zn^{2+}が必須であることがわかった。この protease A の研究から、全ての生物に共通する性質を発見したいと考えている。





酵素濃度ごとの時間変化測定の結果



酵素濃度と活性の関係

酵素活性測定法を確立、活性発現には亜鉛イオン Zn^{2+} が必須であることを発見!

１．　背景と目的

木村ら（2017）は、TTHA0227 というほとんど研究されていないタンパク質の研究を始めた。基質にカゼインを用いて、電気泳動で酵素活性を調べたところ、タンパク質と、Zn^{2+}存在下でカゼインを分解していた。ここから、これがタンパク質分解酵素であるとわかったので、proteaseA と名付けた。その研究を引き継ぎ、この proteaseA に対する金属イオンの影響を定量的に調べることにした。

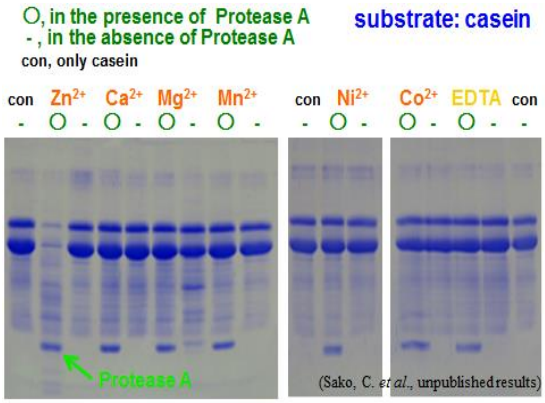


図１　電気泳動を用いて酵素活性を調べた結果

２．方法

方法には、酵素活性の測定法を用いた。蛍光色素の付いた合成基質（Yasuda et al,1999）を用いて蛍光光度計(Horiba,Fluoromax-4)で測定した。この基質の MOCAc 部分は蛍光を放っているが、基質が切断される前は Dnp によって消光される FRET という現象が起こっている。そこに、Protease A が連結部分を分解することで、MOCAc と Dnp の繋がりが断たれ、MOCAc は大きく蛍光を放つようになる（図２）。

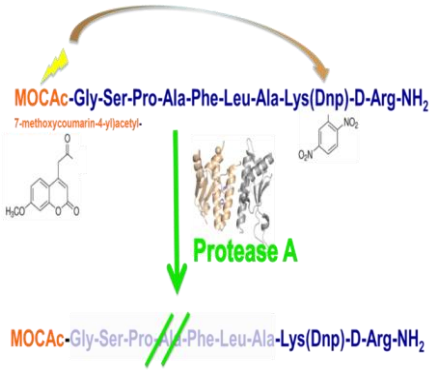


図２　合成基質と分解方法

３．結果

結果１

得られた炭素と硫黄の二重結合化合物（チオベンゾフェノン）は、青色結晶であり、炭素と酸素の化合物であるケトンが無色であることとは対照的であった。結果-1

①　酵素濃度変化について

基質濃度を一定にして、酵素濃度を 0.049 ,0.098 ,0.147 ,0.245 uM の場合の時間変化測定をした（図２）。その傾き（初速度）を求め、グラフに表した（図３）。その結果、活性は酵素濃度に比例することが分かった。

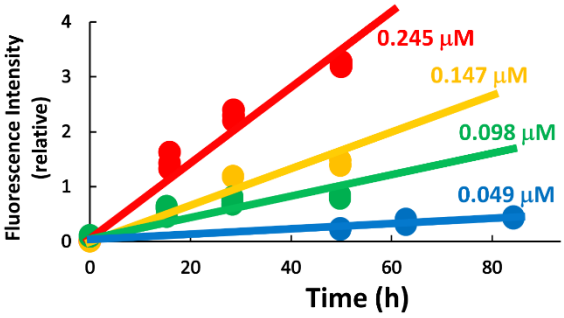


図３　酵素濃度ごとの時間変化測定の結果

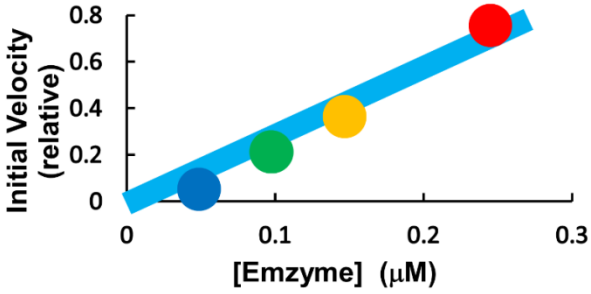


図４　酵素濃度と活性の関係

② 基質濃度変化 → 触媒効率(k_{cat} /K_m)がわかった

同様に、酵素濃度を一定にして、基質濃度を 0.5 ,1,3 uM の場合の時間変化測定をした（図５）。その傾き（初速度）を求め、グラフに表した（図６）。その結果、3 点は直線で結ぶことができた。ミカエリスメンテンの式を用いて考えると、本来はこのグラフは漸近的に曲がっていくことが知られているが、基質濃度が低いために右辺の分母は相対的に Km（解離定数）となり、基質濃度と活性が比例の関係にあるような状態になったと考えられる。

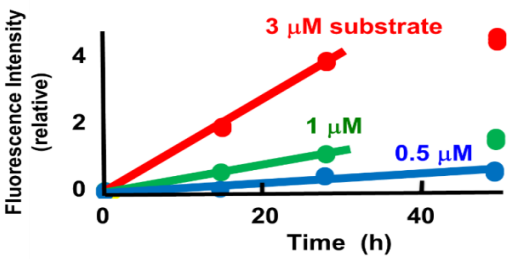


図５　酵素濃度ごとの時間変化測定の結果

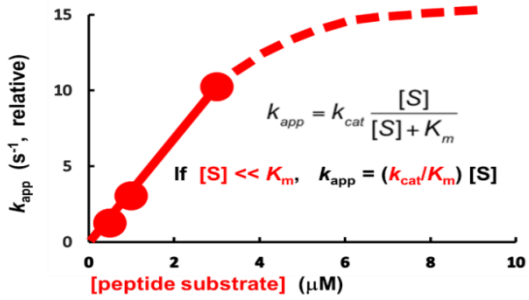
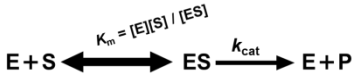
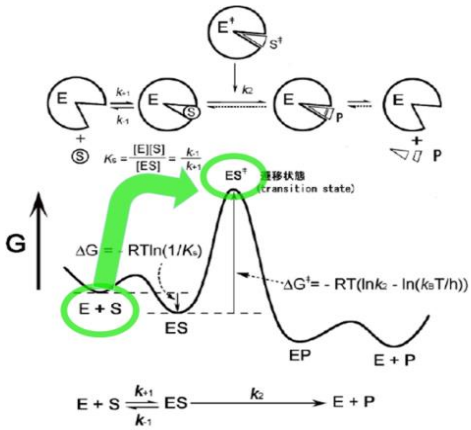


図６　酵素濃度と活性の関

酵素と基質の結合過程において、k_{cat} は酵素のはたらきやすさを、K_mは解離定数を表している。この結果から求まった k_{cat}/K_m は触媒効率を表しており、図７の矢印の部分のエネルギー差に相当する。酵素活性法が確立されたことを用いて、最適な金属イオンが何かを調べた。





結果-2

図７酵素と基質の結合過程におけるエネルギー変化

① 最適な金属イオンは Zn^{2+} だった。

タンパク質によく影響を与える金属イオン６種類（Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}）を用いて、時間変化測定を行った（図８）。その傾き（初速度）を求め、棒グラフに表した（図９）。Zn^{2+} を加えたとき、protease A の活性が最も高いことが分かった。Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+} を添加したときは、あまり活性の変化は見られなかった。 Co^{2+} の負の値については、誤差と判断した。

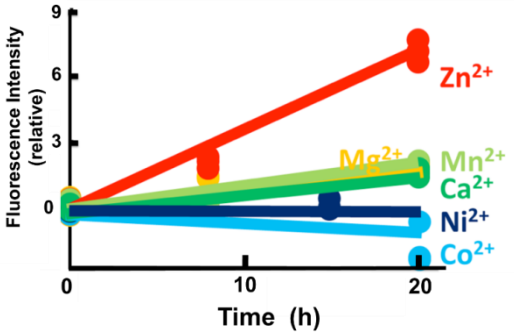


図８　金属イオンごとの時間変化測定の結果

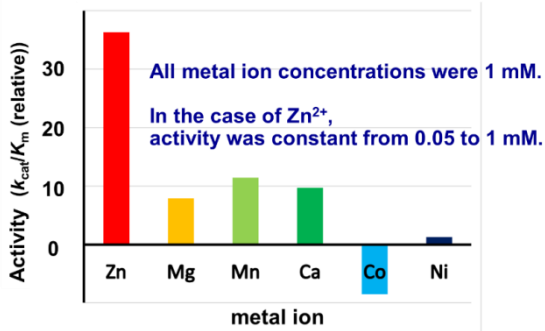
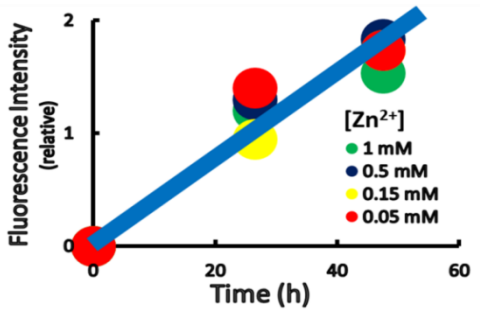


図９　金属イオンと活性の関係

② Zn^{2+} 濃度変化を行った結果、0.05 mM で十分だった。

活性が高かった Zn^{2+} のみに注目し、0.05 ,0,15 ,0.5 ,1 mM の場合の濃度変化測定を行った（図１０）。各 Zn^{2+} 濃度での初速度を求め、グラフに表した（図１１）。すると、Zn^{2+} の濃度には活性があまり影響を受けず、活性には 0.05 mM で十分であることが確認された。



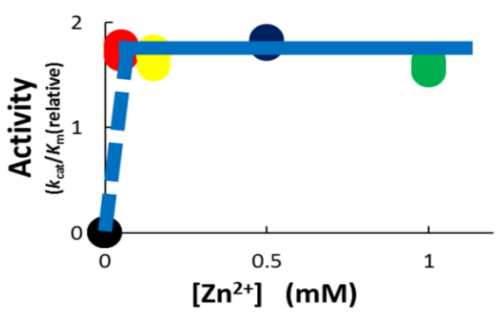


図 10　金属イオンごとの時間変化測定結果　図 11　金属イオンと活性の関

４．考察

①　酵素と Zn^{2+} との解離定数が 0.05 mM 以下なら、細胞内の Zn^{2+} 濃度と一致。

人間の細胞内における、結合をしている Zn^{2+} の濃度は、0.0026 mM である（図１２）（Kondo et al,2008)。結果から、実験では、0.05 mM でも十分な活性があったが、この 0.0026mM の濃度まで Zn^{2+} を下げても、protease A は活性を保ち続けると考えられる。

Metal	Metal Conc. in the Medium (mM)	Intracellular Concentration (mM) Total	Free
Na	20	43	22
Mg	0.17	35	1.5
Si	0.19	0.34	0.32
P	1.5	220	32
K	4.4	72	44
Ca	0.29	6.7	0.13
Mn	0.00014	0.16	0.00091
Fe	0.0034	1.8	0.0034
Co	< 0.000017	< 0.00062	< 0.00062
Ni	< 0.00016	0.15	< 0.0059
Cu	< 0.000031	0.055	< 0.0011
Zn	0.0050	0.58	0.0026
Mo	< 0.000058	0.011	0.0050
Cd	< 0.000018	0.0066	< 0.00066

(Kondo, N. *et al.* (2008) *Extremophiles* 12, 217-223)

図１２　人間の細胞内における金属イオンの濃度

②　立体構造情報：Zn^{2+} や 基質との結合様式

protease A の立体構造を見てみると（図１３）、活性部位と思われる位置にヒスチジンがあり、金属イオンが結合しやすい構造をしていることが分かる。protease A と似た構造をもつタンパク質の立体構造（オレンジ色）と重ね合わせてみると（図１４）、Zn^{2+} （赤い球）が結合しているのが分かる。以上から、protease A も、同じ位置に Zn^{2+} が結合すると考えられる。

図１３　protease A の立体構造
Thermus thermophilus HB8 : 2EJQ

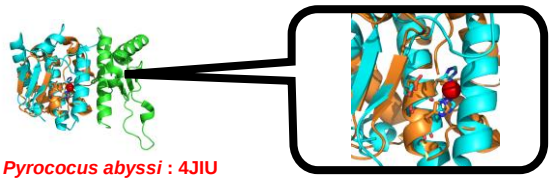


図１４　protease A と似た立体構造をもつタンパク質の立体構造

５．　今後の展望

この研究を経て、protease A の酵素活性法が確立された。これを用いて、基質特異性や最適 pH を調べた上で、X 線結晶解析を行い、立体構造を作っていきたいと考えている。