

好塩性酵素の分子特性を利用した「超可溶化酵素」の創製

徳永 正雄

(鹿兒島大学農学部 生物資源化学科)

I. 研究の目的

高温、極端な pH、高濃度塩等、ヒトをはじめ通常生物が生育できないような特殊な環境でも生育できるいわゆる「極限環境生物」は、それぞれの環境に適応した特殊能力を備えており、そのメカニズムを解明し産業に生かす試みは重要である。

高濃度塩環境を好んで生育する好塩菌は、塩湖、岩塩、みそ・醤油、塩辛等の塩蔵食品等々に見いだされる人の暮らしに比較的身近な特殊環境微生物である。好塩菌は、生育環境に匹敵する高濃度塩を細胞内に蓄積するので、例えば高度好塩菌の菌体乾燥重量の 40%は K^+ が占めるといった「塩漬け」細胞であり、細胞成分は異常に高い塩濃度下で機能するべく適応している。蛋白質の場合は「酸性アミノ酸含量を高める」というのがその適応戦略であり、酸性アミノ酸は蛋白分子表面に多く局在している。その結果好塩性蛋白質は通常の蛋白質に比べ多くの水和水と、また多くの陽イオンを結合している。

我々は、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* 由来 nucleoside diphosphate kinase (HsNDK)、中度好塩菌 *Halomonas* sp. もしくは *Chromohalobacter* sp. の細胞内酵素 NDK、ペリプラズム酵素 β -lactamase (BLA)、外膜蛋白質 Porin、及び RND (resistance-nodulation-cell division) タイプ薬剤排出ポンプ外膜成分 HrdC 等の好塩性蛋白質の研究を通じて、上記の好塩性蛋白質の分子的特徴が「高い溶解性」を基盤とした好塩性酵素の様々な興味ある性質を生み出していると考えている。この仮説の検証と技術的な応用を目的として研究を進めている。

II. 方法・結果

1. 高度好塩菌 *H. salinarum* 由来 nucleoside diphosphate kinase (HsNDK).

現在までに報告されている高度好塩菌由来酵素は、ほとんどすべて 1~2M 以上の塩の存在がその安定性に必須 (0.4~0.5 M 以上でも良い例外が 2 種) で、それ以下の塩濃度では速やかに失活する。我々が見つけた *H. salinarum* 由来 HsNDK は、塩非存在下でも活性を示し、0~4 M NaCl 存在下、4 でも -20 でも安定な高度好塩菌由来の酵素としては極めて珍しい酵素であった。この遺伝子をクローニングし塩基配列を決定したところ、酸性アミノ酸含量が高いという好塩性酵素の特徴は保持されていた。HsNDK 遺伝子を大腸菌で発現させたところ、可溶性画分に発現されたが活性を示さず、4M NaCl を加え

ることによって活性化(folding)した。一度 folding すると塩を除いても安定で、*H. salinarum* から精製した native 酵素と同じ性質を示した。native 酵素を 90%、もしくは 6 M urea で変性させ活性の戻りを指標に refolding を観察したところ、低濃度 NaCl では巻き戻らないが、3M NaCl 存在下で 100%巻き戻った。これらの結果から、HsNDK は活性や安定性には塩を必要としないが、高次構造形成には高濃度塩を必要とすることが明らかとなった。また適合溶質である trimethylamine-N-oxide の高濃度溶液(4 M)中でも巻き戻ることが判明し、非イオン性の化合物により疎水的相互作用の強化のみで高度好塩菌由来蛋白が巻き戻った最初の例となった。以上、好塩性酵素に対する塩の効果は蛋白質表面の過剰なマイナス荷電の静電的反発を抑えることと、塩析効果による蛋白質コアの疎水的相互作用を強化するという二面性があることを実証することができた。

「好塩性酵素の分子特性に習う」という本助成研究において次のような極めて興味ある結果を得た。好塩性酵素の改変の手始めとして、HsNDK の N-末端に His-tag を付与して(pET15b vector に挿入)大腸菌で発現させたところ、大腸菌中で活性のある状態(folding 状態)で大量に発現するという予想外の結果を得た。HsNDK と His-HsNDK の *in vitro* refolding を調べてみると、His-HsNDK はより低濃度塩で巻き戻り、同じ塩濃度下では、HsNDK より数倍速く巻き戻った。また、HsNDK は高濃度塩(3.8 M)では 6 量体で存在し、低塩濃度(0.2 M)では 2 量体に可逆的に解離するが、His-HsNDK は、低塩濃度でも 6 量体を形成しており、His-tag の付加は四次構造の形成(安定化)も促進していることが判明した。この His-tag を含む延長配列の付加効果については、hexa-His-tag と(もしくは) thrombin cleavage site に存在する Arg によるプラス荷電の供給により HsNDK 蛋白表面のマイナス荷電どうしの反発が抑制されたと解釈できるデータを得ている。この結果より、微細な変化で大きく好塩性酵素の性質を改変できることが明らかとなり、好塩性酵素の分子育種の可能性が強く示唆された。

2 .中度好塩菌 *Chromohalobacter* 由来 BLA(HaBLA) の高効率巻き戻りと通常生物由来 BLA との比較

中度好塩菌 *Chromohalobacter* sp.560 菌体より AmpC タイプの BLA 活性を検出し、遺伝子のクローニングにも成功した。BLA 活性は、osmotic shock 法で分離できることから、通常細菌のものと同様ペリプラスムに局在することが解った。すなわち、培地と同程度の高濃度塩環境で機能することが示唆された。遺伝子解析からシグナルペプチドを有し、また成熟酵素部分は酸性アミノ酸含量が極めて高く、予想どおり典型的な好塩性酵素の特徴を備えていた(図 1)。この酵素は、GST および His-tag fusion 蛋白質として大腸菌で活性型で発現し、それぞれの affinity column で均一に精製できた。現在までに 200 種類以上の BLA 蛋白質が報告され、全ての酵素は 60~70 分の熱処理で不可逆的に失活するが、HaBLA は 5 分間煮沸しても温度を常温に戻せば瞬時に 75~80%の活性を示し

た。CD 測定によると、BLA は 60 の熱処理で完全に変性し、温度を下げると可逆的に構造を回復した。至適反応温度は通常生物由来の BLA と変わらず ~60 付近なので、煮沸後の活性は、一旦変性した BLA が極めて効率よく巻き戻っていることを示している。HaBLA は、酸性アミノ酸に富み、そのマイナス荷電による高い可溶性が非特異的凝集を抑え、高効率の可逆的巻き戻りを保証しているものと考えられる。この酵素は単量体酵素であるが、蛋白質濃度が濃いほど熱処理に安定であり、巻き戻り過程で凝集しにくい性質が明らかである。現在、この分子特性を生かした応用的技術開発を急いでいる。

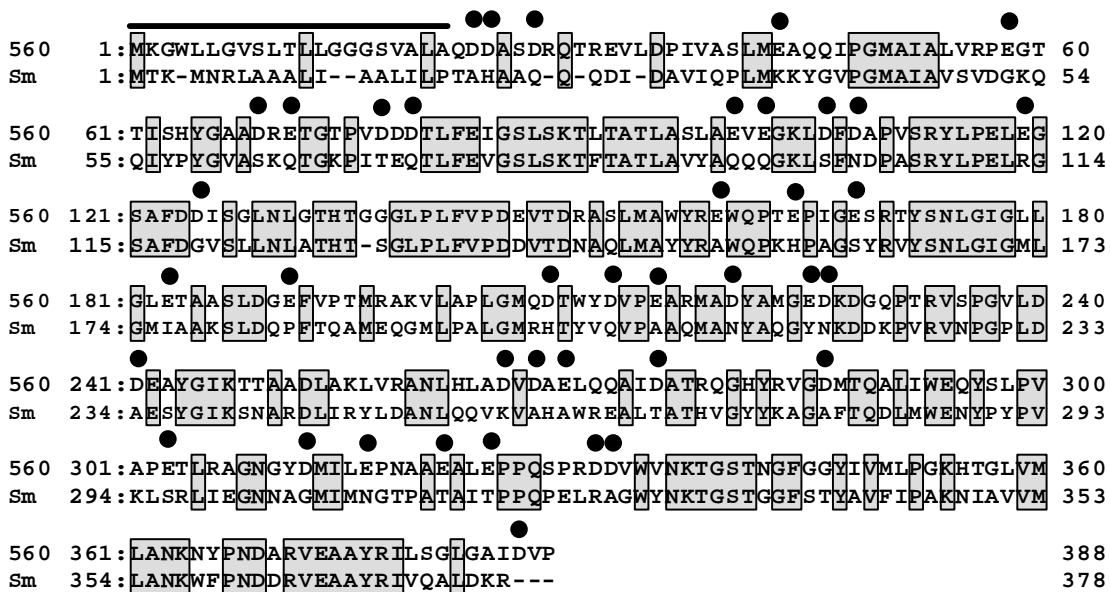


図 1 . 中度好塩菌 HaBLA (560)と、HaBLA に最も相同性の高い *Serratia marcescens* BLA (Sm)とのアミノ酸配列アラインメント。

非相同領域で HaBLA が酸性アミノ酸である部分を で示した。HaBLA の非相同領域の 1/4 近くを、酸性アミノ酸が占めるという典型的な酸性蛋白質である。

III. 文献

1. Ishibashi, M. *et al.* FEBS Lett. 493, 134-138 (2001)
2. Ishibashi, M. *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 216, 235-241 (2002)
3. Ishibashi, M. *et al.* J. Protein Chem. 22, 345-351 (2003)
4. Ishibashi, M. *et al.* Protein Pept. Lett. 10, 575-580 (2003)
5. Tokunaga, H. *et al.* FEBS Lett. 558, 7-12 (2004)
6. Ishibashi, M. *et al.* FEBS Lett. 570, 87-92 (2004)
7. Tokunaga, H. *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 70, 4424-4431 (2004)
8. Arakawa, T. & Tokunaga, M. Protein Pept. Lett. 11, 125-132 review (2004)
9. Tokunaga, M. *et al.* 生化学(2004) 12月号、総説、印刷中