

耐冷菌の低温適応戦略

高野和文

(大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻)

研究の目的

自然界には、低温環境で生育可能な微生物・低温菌が存在する。低温菌は 20℃ 以下のみで増殖可能な好冷菌と 20℃ 以上および 0℃ 付近でも増殖可能な耐冷菌に分けられる。本研究では、20℃ 以上および 0℃ 付近で増殖可能な耐冷菌に注目し、耐冷菌の低温適応機構の分子レベルでの解析を通して、低温下における微生物の細胞管理体制を探る。特に生物の最も基本的な構成要素であるタンパク質に焦点を絞り、生物が低温で直面する困難および耐冷菌が備えるタンパク質を通じたそれを克服するための低温適応機構を調べる。具体的には、耐冷菌が低温 (0~4℃) で特異的に発現するタンパク質を同定し、その機能および低温環境下における細胞内での役割を調べる。

方法

これまでに、0~25℃ で増殖可能な耐冷菌 *Shewanella* sp. SIB1 が低温 (0~4℃) で特異的に発現するタンパク質 SIB1 FKBP22 を同定し、SIB1 FKBP22 が低温でペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PPIase) 活性を有すること、至適温度が大腸菌の酵素 (>25℃) に比べてかなり低温 (10℃) であり、20℃ 以上では急激に活性が低下することを明らかにした[1]。このことは、耐冷菌が低温環境下において、タンパク質の折れたたみ反応の律速段階であるプロリン異性化反応の遅い点を克服する必要があり、そのためのシステムを備えていることを示唆している。そこで本研究では、SIB1 FKBP22 の具体的な機能に関する知見を得るために、SIB1 FKBP22 を構成する 2 つのドメインの役割を解析する。ホモダイマーである SIB1 FKBP22 は PPIase 活性を有する C 末ドメイン、二量体を形成する N 末ドメイン、および両者の間に位置するヘリックス 3 からなる。そこで C 末ドメイン+ 3 と N 末ドメイン+ 3 の 2 種のタンパク質を、大腸菌での遺伝子過剰発現により充分量作製し、それらの酵素活性と構造安定性を測定し、新たな耐冷菌の低温適応機構を調べた[2]。

結果

C 末ドメイン+ 3 のみでは、ペプチド (*N*-succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-*p*-nitroanilide) を基質としたプロテアーゼカップリング法で、10℃ で測定した PPIase 活性は全長 SIB1 FKBP22 と同程度あったが、タンパク質 (RNase T1) を基質としたリフォールディング法で測定したときは大幅に低下していた。N 末ドメイン+ 3 は両 PPIase 活性を示さなかった。このことは、N 末ドメインが基質タンパク質との結合に重要であることを示している。一方熱安定性の解析から、C 末ドメイン+ 3 は約 35℃ で変性した。これは、SIB1 FKBP22 が失活する 20℃ と異なっている。一方、N 末ドメイン+ 3 は約 45℃ で変性し、高い熱安

定性を有していた。

考察

SIB1 FKBP22 の活性を有するC末ドメインで観察された酵素的な失活と構造的な変性の温度が異なる現象は、常温生物由来のタンパク質ではあまりみられない。耐冷菌に関しては、アミラーゼやファミリー8 キシラーゼなどで報告されている。したがって、失活と変性温度が異なるのは耐冷菌の特性であると思われる。これは、'localized flexibility'と名づける低温適応戦略の一つであると提案する。酵素のフレキシビリティを増加させると、触媒反応に伴う活性部位の構造変化のエネルギーコストが減り、 k_{cat} が大きくなる。一方で、これにより K_m も同時に増加する。フレキシビリティの増加を活性部位周辺の小さな領域に限定すれば、 K_m を低く維持したまま k_{cat} を大きくすることができる。

また、耐熱性の大きく異なる2つのドメインを有することも低温適応戦略の一つかもしれない。安定性の低いドメインは低温での効率的な触媒作用に必要な活性部位周辺のフレキシビリティを増加させ、安定性の高いドメインは基質結合部位周辺の構造的な厳密性を増加させることで低温での高い触媒効率を実現させているのではないかと考えられる。

文献

- [1] Suzuki Y, Haruki M, Takano K, Morikawa M, Kanaya S. (2004) Possible involvement of an FKBP family member protein from a psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. SIB1 in cold-adaptation, *Eur J Biochem.* 271, 1372-1381.
- [2] Suzuki Y, Takano K, Kanaya S. (2005) Stabilities and activities of the N- and C-domains of FKBP22 from a psychrotrophic bacterium overproduced in *Escherichia coli*, *FEBS J.* 272, 632-642.