

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

好冷性細菌の低温適応に関わるタンパク質とリン脂質

栗原 達夫, 川本 純, 江崎 信芳

0℃ 付近の低温環境に適応した好冷性細菌は低温での物質生産や環境浄化に有用であり、また、それらが生産する好冷性酵素は産業用酵素として利用価値が高いと考えられている。温度低下に伴う化学反応速度の低下、拡散速度の低下、膜流動性の低下などを好冷性細菌がいかに克服しているのか、その分子機構を明らかにすることは生物学的に意義深だけでなく、好冷性細菌の産業利用に向けた基盤的知見をあたえるものとしても重要である。本稿では筆者らの研究成果を中心に、低温で高い活性を示す好冷性酵素の構造的特徴、好冷性細菌の環境適応に寄与する低温誘導性タンパク質の網羅的解析、高度不飽和脂肪酸含有リン脂質が好冷性細菌の低温適応に果たす役割、好冷性細菌を宿主としたタンパク質低温生産システムの開発などについて紹介する。

1. はじめに

地球上の生命圏の約 8 割は極地・高山・深海など年間を通して 0℃ 付近以下の低温環境である¹⁾。冬季に低温になる地域も含めると、地球上の大部分の環境で生物は低温にさらされる。このような環境に適応した好冷性微生物^{脚注*}は、熱安定性の低い化合物の変換系構築や、寒冷期あるいは寒冷地における環境浄化など、新しいバイオプロセスの開発に有用と期待される^{2–5)}。化学反応速度や拡散速度が低下し、生体膜の流動性が低下する低温条件下で、微生物がいかにして物質輸送や代謝反応をつつがなく進行させ効率的に増殖するのか明らかにすることは、生物学的に重要な課題であるだけでなく、好冷性微生物の産業利用に向けた基盤的知見をあたえるものと考えられる。我々はこのような観点から南極海水や北極圏永久凍土から分離した好冷性細菌^{脚注*}を対象とした研究を展開し、これらの細菌が生産する好冷性酵素の特性解明^{6–12)}、低温での物質輸送に関わる膜タンパク質の同定¹³⁾、低温での生体膜機能維持に重

要な高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解明^{14,15)}、熱安定性の低いタンパク質を効率的に生産する新しい発現系の開発^{16,17)}などに取り組んできた。本稿では、好冷性細菌の低温適応に関わるタンパク質とリン脂質について、特に南極海水由来の *Shewanella livingstonensis* Ac10 について筆者らが行った研究の成果を中心に紹介する。また、本菌を宿主としたタンパク質低温生産システムの開発についても併せて紹介する。

2. 好冷性細菌の低温適応に関与するタンパク質

2-1. 好冷性酵素

好冷性細菌が低温環境で生育するためには個々の代謝反応が速やかに進行する必要がある。その過程を触媒する酵素の多くは、より高い温度で生育する生物の酵素に比べて低温域での活性が高い^{4,18–20)}。また、その多くは熱安定性が低い。このような酵素を好冷性酵素と呼ぶが、これらの

京都大学化学研究所 (〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄)
Proteins and phospholipids involved in cold-adaptation of psychrotrophic bacteria
Tatsuo Kurihara, Jun Kawamoto and Nobuyoshi Esaki (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)

脚注*Richard Morita は 0–5℃ で生育可能な微生物のうち、最適生育温度が 15℃ 以下で生育上限温度が 20℃ 以下のものを好冷菌 (psychrophile)、生育上限温度が 20℃ より高いものを低温菌 (psychrotroph または psychrotolerant) と定義した³⁸⁾。しかし、このような温度を境界線とすることの妥当性は必ずしも明確ではなく、定義を再検討すべきという議論もある³⁹⁾。本稿では好冷菌と低温菌を区別せず、0℃ 付近の低温で生育する微生物や細菌をまとめて好冷性微生物や好冷性細菌と呼ぶ。

特徴は酵素の活性部位が高いフレキシビリティをもつことでもたらされるものと考えられている。酵素反応の活性化自由エネルギー $\Delta G^\ddagger$ は、以下の式によって活性化エンタルピー $\Delta H^\ddagger$ および活性化エントロピー $\Delta S^\ddagger$ と関係づけられる。

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (T \text{ は絶対温度})$$

$\Delta G^\ddagger$ を小さくすれば反応速度が大きくなる。詳細は他稿^{4, 18, 19)}に譲るが、好冷性酵素の多くでは、反応原系から遷移状態への移行に伴って切断される結合（切断にエンタルピー変化を伴う結合）の数が少なく、これにより $\Delta H^\ddagger$ が小さくなっている。これはすなわち酵素の活性部位が高いフレキシビリティをもつということでもあるが、高いフレキシビリティは酵素の熱安定性を低下させる要因にもなる。具体的には以下のような構造的特徴が高いフレキシビリティを生み出していると考えられている^{4, 18-20)}。

- (1) 表面に電荷をもつアミノ酸残基、特に負電荷をもつアミノ酸残基が多い。溶媒である水分子との相互作用によるフレキシビリティの増大、同じ電荷をもった残基間の反発による不安定化などの効果があると考えられている。
- (2) Arg/(Lys+Arg)の値が小さいものが多い。ArgはLysに比べてグアニジノ基を介して周辺残基とより多くの塩橋形成、水素結合形成が可能であり、これによってタンパク質を安定化する傾向がある。フレキシビリティの高い好冷性酵素では、Argの比率が低い傾向が見られる。
- (3) 芳香環-芳香環相互作用や芳香環-アミノ基相互作用が少ない。
- (4) α ヘリックスが形成する双極子（N末端側が正、C末端側が負）とそこに含まれるアミノ酸残基の電荷の相互作用が弱い。C末端側に負電荷をもつアミノ酸残基が多い場合や正電荷をもつアミノ酸残基が少ない場合、電荷-双極子相互作用が弱まる。
- (5) α ヘリックス中のProの数が多く、 α ヘリックスが不安定化されている。
- (6) ループ内のProの数が少なく、Glyの数が多く、ループが長い。
- (7) Met（電荷間相互作用や双極子間相互作用に関与しない）の数が多く。
- (8) 金属イオンによる二次構造間の架橋やドメイン間の架橋が少ない。
- (9) 構造を安定化するジスルフィド結合を欠く。

以上のように酵素にフレキシビリティを付与する要因は多様であるが、個々の好冷性酵素がこれらの特徴のすべてを備えているわけではない。これらのうちのいくつかを備えることで低温での高い触媒活性が生み出されるものと考えられている。

低温で活性が高く、熱安定性が低い好冷性酵素は、低温で反応を行うことが望ましい場合や、使用後に穏和な条件

で酵素を失活させることが望ましい場合に有用である^{2, 3)}。低温で反応を行うことには、反応系の加熱に要するエネルギーを節約できるというメリットや、望ましくない副反応を抑制できるといったメリット、反応系に存在する熱安定性の低い、あるいは揮発性の高い有効成分を保持できるといったメリットがある。以上のような特徴により好冷性酵素は洗剤用酵素、食品加工用酵素、分子生物学研究用酵素、皮革加工用酵素、繊維加工用酵素などとしての応用が期待されている。

2-2. 低温誘導性タンパク質

好冷性細菌の低温適応に重要なタンパク質を見いだす手段の一つとして、低温誘導性タンパク質に着目して解析を進めるというアプローチがある。低温適応に関わるタンパク質は低温で必要とされるため、低温生育時に特異的に誘導生産されるものが多いことが考えられる。このアプローチは特に全ゲノム配列が解読された生物種に有効であり、*Methanococcoides burtonii*^{21, 22)}、*Bacillus psychrosaccharolyticus*²³⁾、*Psychrobacter cryohalolentis* K5²⁴⁾、*Psychrobacter arcticus* 273-4²⁵⁾、*S. livingstonensis* Ac10¹³⁾などについて、異なる温度で生育した菌体のプロテオーム比較によって多くの低温誘導性タンパク質が見いだされている²⁶⁾。

これらのうち、筆者らが主な研究対象としている南極海水由来 *S. livingstonensis* Ac10 は4~25℃で生育する好冷性細菌である。4℃と18℃で本菌を培養し、可溶性タンパク質と膜タンパク質を二次元電気泳動で分離して比較解析した結果、4℃での含量（全タンパク質に占める当該タンパク質の割合）が18℃の2倍以上のタンパク質として可溶性タンパク質47種、膜タンパク質5種が見いだされた¹³⁾。これらをペプチドマスフィンガープリンティング法で解析した結果、26種の可溶性タンパク質と2種の膜タンパク質が同定された（表1）。これらのタンパク質にはRNAの合成とフォールディングに関与するもの（RpoA, GreA, CspA）、タンパク質の合成とフォールディングに関与するもの（TufB, Efp, LysU, Tig）、膜輸送に関与するもの（OmpA, OmpC）、運動性に関与するもの（FlgE, FlgF）などが含まれていた。低温誘導性のRpoA, GreA, CspAは、配列によっては安定な塩基対が形成されて望ましくないRNAの二次構造ができやすい低温環境において、正確で効率的な転写と、適切なRNAのフォールディングに関わっている可能性が考えられる。Tigはペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼとして機能し、低温条件下におけるタンパク質の適切なフォールディングを助けるものと推測される。OmpAやOmpCの低温での誘導は、低温環境下で拡散速度が低下する影響を緩和し、栄養素などの効率的な取り込みに寄与していることが考えられる。実際にOmpC遺伝子の破壊株では、低温での生育速度が

表 1 *S. livingstonensis* Ac10 の低温誘導性タンパク質

遺伝子	タンパク質 ^a	スポット強度 (ppm) 4°C/18°C	誘導率 (4°C/18°C)	アクセシ ョン番号
RNA の合成とフォールディング				
<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit	782 / <30	>26	AB284093
<i>greA</i>	Transcription elongation factor	2591 / <30	>86	AB284102
<i>cspA</i>	Cold shock protein	17315 / <30	>580	AB284087
タンパク質の合成とフォールディング				
<i>tufB</i>	GTPase - translation elongation factor	976 / <30	>33	AB284113
<i>efp</i>	Translation elongation factor P/ Translation initiation factor	1160 / <30	>39	AB284108
<i>tig</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase (Trigger factor)	4790 / 858	5.6	AB284101
<i>lysU</i>	Lysyl - tRNA synthase class II	3600 / <30	>120	AB284089
膜輸送				
<i>ompC</i>	Porin	21284 / 5893	3.6	AB284090
<i>ompA</i>	Outer membrane protein A	18325 / <30	>610	AB284075
運動				
<i>flgE</i>	Flagellar basal body and hook protein	780 / <30	>26	AB284085
<i>flgL</i>	Flagellin and related hook-associated protein	5016 / 159	32	AB284088
代謝				
<i>ppxI</i>	Inorganic pyrophosphatase/ exopolyphosphatase	1027 / <30	>34	AB284081
<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-glycine ligase	1348 / <30	>45	AB284115
<i>deoC</i>	Deoxyribose- phosphate aldolase	1872 / <30	>62	AB284104
<i>fixB</i>	Electron transfer flavoprotein -subunit	2412 / <30	>80	AB284109
<i>nemA</i>	NADPH: flavin oxidoreductase	1550 / <30	>52	AB284084
<i>pdxJ</i>	Pyridoxal phosphate biosynthesis protein	1648 / <30	>55	AB284100
<i>ac10nuc</i>	Predicted extracellular nuclease	6058 / <30	>200	AB284091
<i>ac10cp</i>	Predicted carboxypeptidase	915 / <30	>31	AB284086
その他				
<i>ac10C417081</i>	6Fe-6S prismane cluster-containing protein	988 / <30	>33	AB284110
<i>ftsZ</i>	Cell division GTPase	1155 / <30	>39	AB284074
<i>ac10omp</i>	Predicted outer membrane protein	1517 / <30	>51	AB284079
<i>tsx</i>	Nucleotide-binding outer membrane protein	1887 / <30	>63	AB284082
<i>ac10tm</i>	Transposase	4281 / <30	>140	AB284094
機能未知				
<i>ac10C130109</i>	—	755 / <30	>25	AB284083
<i>ac10C097028</i>	—	1119 / <30	>37	AB284078
<i>ac10C346010</i>	—	2394 / <30	>80	AB284107
<i>ac10C084124</i>	—	2798 / <30	>93	AB284077

^a データベース上で当該タンパク質と最も高い相同性を示したタンパク質の名称。

顕著に低下することが示されている（未発表データ）。このように低温誘導性タンパク質の網羅的解析を行うことで、好冷性細菌の低温適応機構を解明する手がかりが得られている。

低温誘導性タンパク質の網羅的同定は上述のように種々の好冷性細菌で進められているが、好冷性細菌の種類によって同定された低温誘導性タンパク質の種類は異なる²⁶⁾。この結果からは好冷性細菌の種類によって低温適応機構に違いのあることが示唆される。その一方で、異なる好冷性細菌に共通する低温誘導性タンパク質もある。例えば CspA は、*P. cryohalolentis* K 5²⁴⁾、*S. livingstonensis*

Ac10¹³⁾、*Arthrobacter globiformis* SI55²⁷⁾などで低温誘導性タンパク質として同定されている。ペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼの低温誘導性は *Shewanella* sp. SIB1²⁸⁾、*M. burtonii*²¹⁾、*P. articus* 273-4²⁵⁾、*S. livingstonensis* Ac10¹³⁾などで見いだされている。タンパク質の適切なフォールディングのためにプロリル結合を異性化することは多くの細菌にとって低温で生育するために重要なプロセスであるものと考えられる。今後、個々のタンパク質の遺伝子破壊実験などによって、それらの低温適応への関与の詳細が明らかにされることが期待される。

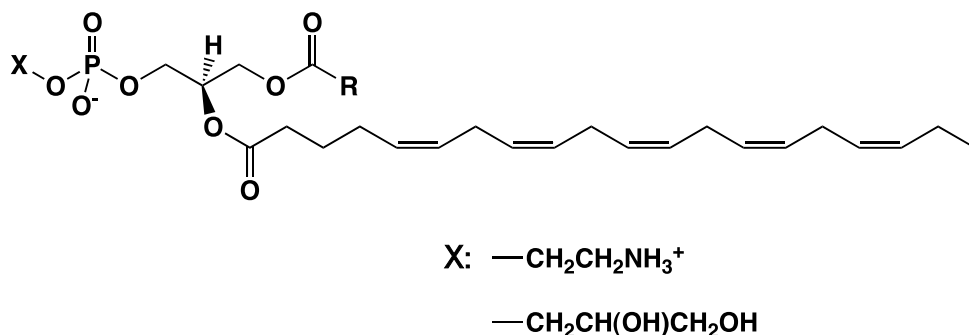


図1 EPA 含有リン脂質の構造

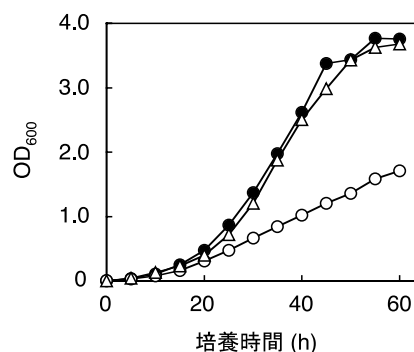
S. livingstonensis Ac10 には *sn*-2 位に EPA をもつホスファチジルエタノールアミン (X = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) とホスファチジルグリセロール (X = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$) が存在する。

3. 好冷性細菌の低温適応に関するリン脂質

S. livingstonensis Ac10 は 4℃ 付近で生育する際に高度不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を誘導生産する^{14,15)}。EPA は全脂肪酸の約 5% を占め、リン脂質 (ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルグリセロール) のアシル鎖として存在する (図 1)。一方、18℃ 付近で生育した菌体には EPA は検出されない。このような誘導特性から、EPA は本菌の低温適応に重要な役割を担うものと推定された。高度不飽和脂肪酸は他の海洋性好冷性細菌にも存在し^{29~34)}、これらの好冷性細菌の低温適応にも高度不飽和脂肪酸が関与する可能性が考えられた。

S. livingstonensis Ac10 において EPA が低温適応に関与する可能性を検討するため、筆者らは本菌の EPA 生合成酵素遺伝子を相同組換えによって破壊し、EPA 欠損株を得た¹⁴⁾。得られた EPA 欠損株は本菌にとって比較的高い温度である 18℃ では野生株と同様に生育したが、低温域では著しい生育阻害が見られた (図 2)。一方、化学合成した EPA 含有リン脂質を EPA 欠損株に添加したところ、低温での生育が回復した¹⁵⁾。これにより、EPA が本菌の低温適応に重要な役割を担うことが示された。低温では EPA 欠損株が菌糸状に伸長して多核になったことから、EPA 欠損によって細胞分裂が阻害されたものと考えられた (図 3A)。また、電子顕微鏡による観察によって、EPA 欠損株の細胞の中に異常な膜系が形成されることも明らかになった (図 3B)。

EPA のような高度不飽和脂肪酸含有リン脂質は一般に生体膜の流動性保持に重要と考えられている³³⁾。しかし、疎水性蛍光プローブであるピレンを用いた流動性測定では、野生株と EPA 欠損株に顕著な差は認められなかった¹⁴⁾。一方、37℃ で生育した *Escherichia coli* と 4℃ で生育した *S. livingstonensis* Ac10 の膜流動性については、後者でより高い流動性が見いだされた。4℃ で生育した *S. liv-*

図2 EPA を欠損した *S. livingstonensis* Ac10 の生育特性

野生株 (●) および EPA 欠損株 (○, △) を LB 培地 (●, ○) または LB 培地に EPA 含有リン脂質 (1-オレオイル-2-エイコサペンタエノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (EPA-PE)) を添加した培地 (△) で培養した。培養温度は 6℃。

ingstonensis Ac10 ではパルミトレイン酸とイソペンタデカン酸がそれぞれ全脂肪酸の 43% と 27% を占める主要な脂肪酸であり、これらの不飽和脂肪酸と比較的鎖長の短い脂肪酸によって *E. coli* よりも高い膜の流動性が確保されているものと考えられた。一方、全脂肪酸の 5% を占めるに過ぎない EPA の膜全体の流動性への寄与は小さいものと考えられた。

ピレンを用いた流動性測定の結果は、EPA が膜流動性保持以外の機能をもつことを示唆するものである。しかし、この結果は疎水性低分子化合物の膜内での拡散速度という一つの指標で流動性を評価したものであり、この方法で検出できないわずかな、あるいは局所的な流動性変化が細胞分裂阻害や膜生合成異常などを引き起こした可能性も排除できない。そこで、膜の流動性におよぼす影響が異なる種々の EPA アナログ (二重結合の数や位置が異なる脂肪酸) を *sn*-2 位に含むリン脂質を化学合成し、それらを EPA 欠損株に添加したときの表現型を調べた。その結果、 T_m 値 (液晶状態からゲル状態への転移温度) が高い脂肪酸を含むリン脂質で、 T_m 値が低い脂肪酸を含むリン脂質よりも、高い生育回復が見られるケースのあることがわ

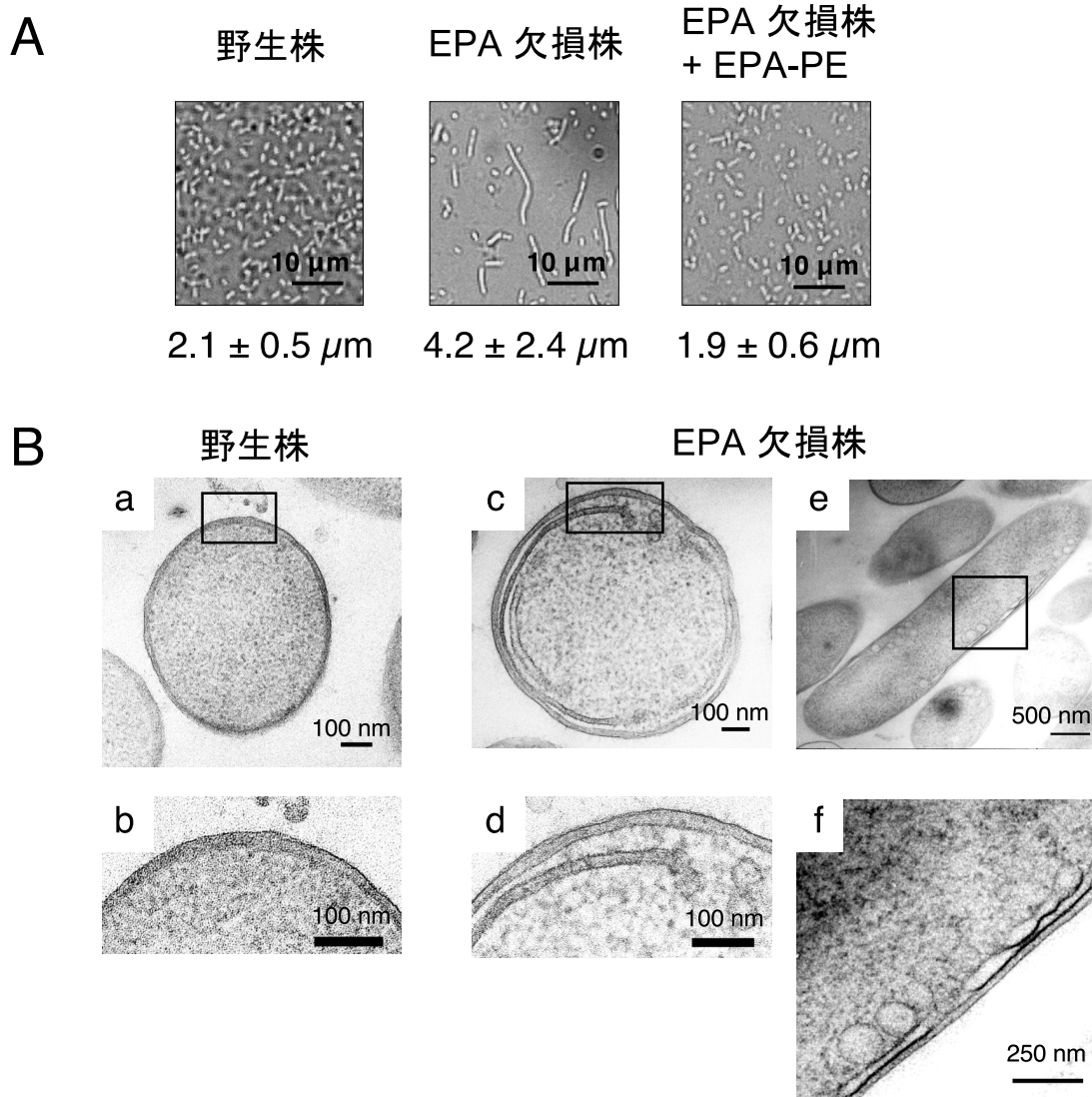


図3 EPAを欠損した *S. livingstonensis* Ac10の形態学的特徴

A) 野生株とEPA欠損株の光学顕微鏡写真。右端はEPA含有リン脂質添加培地で培養したEPA欠損株。写真の下に数字は菌体長 ($n=20$)。生育温度は6℃。

B) 野生株 (a, b) とEPA欠損株 (c-f) の電子顕微鏡写真。b, d, fはそれぞれa, c, eの枠内の拡大写真。a-dは菌体の短軸に沿った断面、e, fは長軸に沿った断面。生育温度は4℃。

かった (未発表データ)。ゲル化しやすく流動性保持効果が小さいと考えられる脂肪酸でより顕著にEPAの代替効果が見られるという結果は、EPA含有リン脂質が膜流動性保持以外の機能を担う可能性を強く示唆するものといえる。

Shewanella marinintestina IK-1では、EPA欠損株が野生株に比べて高い過酸化水素感受性を示す³⁵⁾。EPA含有リン脂質が活性酸素分子種の膜透過性を下げる効果をもつものと考えられている。一方、*S. livingstonensis* Ac10に関してはEPA欠損による過酸化水素感受性の増大は認められなかった (未発表データ)。このような違いが生じる理由は不明であるが、EPA含量の違いが一因である可能性は考

えられる。*S. marinintestina* IK-1のEPA含量は20℃で全脂肪酸の17.5%であり³⁰⁾、*S. livingstonensis* Ac10のEPA含量 (4℃で5%) よりも多い。EPA含有リン脂質の濃度が高いことが過酸化水素耐性付与に重要である可能性も考えられ、このような可能性について今後検討していくことが必要であろう。

EPA含有リン脂質の酸化ストレス耐性付与以外の機能として、筆者らは、EPA含有リン脂質が特定の膜タンパク質と特異的に相互作用することでそれらの機能や安定性に影響を及ぼす可能性を考えている。筆者らは、*S. livingstonensis* Ac10の野生株とEPA欠損株で膜タンパク質のプロテオーム解析を行うことにより、ポーリンタンパク質な

ど、数種の膜タンパク質の含量がEPAの有無によって変化することを見いだしている¹⁴⁾。また、脂質輸送と細胞分裂に関与する膜タンパク質の高生産によってEPA欠損株の低温域における生育不全が回復することも見いだしている(未発表データ)。これらの結果は、EPA含有リン脂質が特定の膜タンパク質の機能発現に重要であることを示唆している。膜タンパク質の表面に脂質分子が適切に結合することは膜タンパク質の機能や安定性に重要であると考えられる。EPA含有リン脂質と特定の膜タンパク質の間に特異的な相互作用があるのか、そしてそれによってこれらの機能や安定性が影響を受けるのかについては今後の重要な検討課題である。そのような解析を通して高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理的役割の詳細が明らかになることが期待される。

4. 好冷性細菌を利用したタンパク質低温生産システムの開発

好冷性細菌が生産する好冷性酵素は上述のように食品加工用酵素、洗剤添加用酵素などとして幅広い応用が期待されている。筆者らは好冷性酵素の機能解析や応用開発を行う過程で、*E. coli*を宿主としたタンパク質生産系で好冷性酵素の高生産が困難なケースをしばしば経験してきた。その原因の一つは目的タンパク質の熱安定性の低さにあると考えられたため、好冷性細菌を外来タンパク質高生産の宿主として開発し、熱安定性の低い好冷性酵素などの高生産に適したタンパク質低温生産システムを構築することを考えた。好冷性細菌を宿主とした生産系は、熱安定性の低いタンパク質のみならず、常温での酵素活性が宿主に対して毒性を示すようなタンパク質にも有効と考えられる。低温では酵素活性の低下による毒性緩和が期待されるからである。そこで、低温での菌体収量に優れ、また、全ゲノム情報を利用した育種が可能な*S. livingstonensis* Ac10を宿主としたシステムを開発することにした。

まず、本菌の形質転換法を検討した。通常用いられているエレクトロポレーションや化学的な手法では*S. livingstonensis*を形質転換できなかったが、広宿主域プラスミドを導入した*E. coli*と18℃で接合させることで形質転換が可能であることを見いだした¹⁷⁾。

次に外來遺伝子の高発現に有効なプロモーターを探索した¹⁷⁾。4℃と18℃で生育した本菌のタンパク質を二次元電気泳動で分析し、4℃での含量が総タンパク質量の1%以上を占めるタンパク質、および4℃での含量が18℃での含量の2倍以上のタンパク質を同定し、これらの遺伝子のプロモーター活性を調べた。これらのほか、低温で誘導生産されるEPAの生合成酵素遺伝子のプロモーター、および低温誘導性CspAのホモログ遺伝子二つのプロモーターについても同様に検討を加えた。プロモーター活性の検討

では、それぞれの遺伝子の上流域約300bpをβ-ラクタマーゼ遺伝子上流に挿入し、広宿主域プラスミドpJRD215を用いて*S. livingstonensis* Ac10に導入した。これを4℃と18℃で培養し、細胞抽出液のβ-ラクタマーゼ活性を測定することでプロモーター活性を評価した。その結果、シャペロニンGroES、アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼAhpC、コールドショックタンパク質CspAホモログのプロモーター(それぞれAP2, LI3, OP4)が4℃あるいは18℃で高い活性を示した。定常期ではLI3プロモーターを用いた場合に、4℃と18℃のいずれにおいても最も高いβ-ラクタマーゼの生産量が得られた。

そこでLI3プロモーターを用い、*S. livingstonensis* Ac10を宿主として、種々の外來タンパク質の高生産を試みた。β-ガラクトシダーゼ遺伝子をLI3プロモーターの下流に挿入した場合、4℃で28mg/L培養液、18℃で120mg/L培養液のβ-ガラクトシダーゼが生産された¹⁷⁾。

次に、この生産システムが好冷性酵素など熱安定性の低いタンパク質の生産に有効か検討するために、生育至適温度が10℃の好冷性細菌*Desulfotalea psychrophila* DMS 12343³⁶⁾由来の4種のタンパク質(オリゴエンドペプチダーゼPepF、ロイシルアミノペプチダーゼLAP、プロリダーゼPepQ、β-グルコシダーゼBglA)の生産を試みた。一般に好冷性細菌由来のタンパク質の熱安定性は、常温菌や好熱菌由来のタンパク質と比べて低いことが知られており、ここで用いた*D. psychrophila*由来のPepFの場合、30℃、30分間の処理で活性がほぼ半減する。PepFを含むこれら4種のタンパク質を*S. livingstonensis* Ac10を宿主として4℃と18℃で生産した(図4)¹⁷⁾。また、同じタンパク質を、*E. coli*を宿主とし、T7プロモーターを用いて生産した。*E. coli*を宿主として37℃で培養した場合は、BglA以外の3種のタンパク質は電気泳動でのバンドとして検出されるレベルでは生産されなかった。*E. coli*の培養温度を18℃に下げるといずれのタンパク質も生産されるようになったが、PepFとPepQに関しては、*S. livingstonensis* Ac10を宿主として18℃で培養した方が単位培養液量あたりの生産量が多かった。一方、LAPの生産量は*E. coli*を宿主として18℃で培養した場合の方が多く、BglAに関しては、37℃で*E. coli*を宿主とした場合が最も多かった。*S. livingstonensis* Ac10を宿主とした生産系では、いずれのタンパク質に関しても18℃で培養したときの生産量が4℃で培養したときの生産量を上回った。この一因としては、発現に用いたプラスミドの細胞あたりのコピー数が18℃において4℃の場合の約3倍であることが考えられた。

以上のように*S. livingstonensis* Ac10を宿主とした生産系は、タンパク質の種類によっては、現在、最も広く利用されている高発現系の一つであるT7プロモーターを利用し

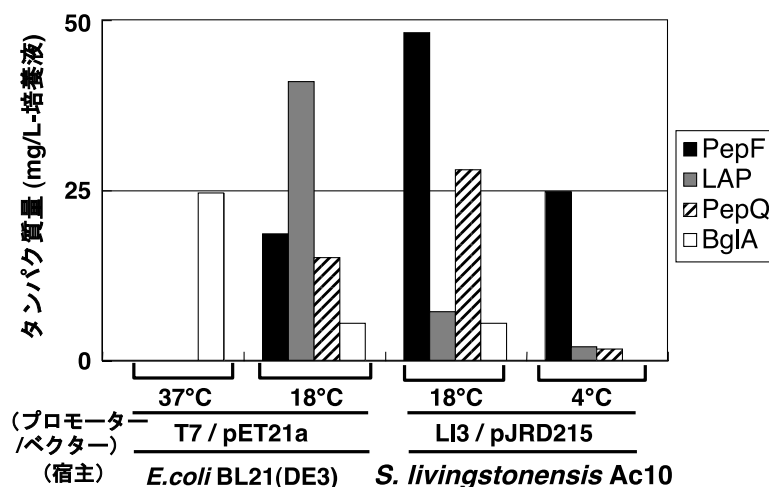


図4 *S. livingstonensis* Ac10 と *E. coli* を宿主とした外来タンパク質の生産

た系に匹敵する、あるいはそれを上回る生産能をもつことが示された。筆者らが開発した好冷性細菌を宿主とするタンパク質生産系は有用なものではあるが、それはまだ初歩的なものであり、改善の余地が大いにある。さらに強力なプロモーターの開発、多コピープラスミドの開発、宿主の改変などによって、より優れた生産システムに改良できることが期待される。

5. おわりに

本稿でも紹介したように、好冷性酵素は産業用酵素として大きな潜在能力を秘めている。しかしながらこれまでに実用化された好冷性酵素は常温性酵素や耐熱性酵素と比べてはるかに少ない。研究の歴史が浅いことが一因であるが、好冷性酵素特有の安定性の低さが、生産、流通、使用の妨げになる場合もある。低温での高い触媒活性を保持しつつ、安定性を向上させることができれば、好冷性酵素の応用範囲は飛躍的に広がるものと考えられる。分子進化工学的な手法により低温での触媒活性を保持しつつ安定性を高めることに成功した例もあり³⁷⁾、今後、同様な試みが成功すれば、好冷性酵素の用途はさらに広がるものと考えられる。

好冷性酵素の生産系としては、既存の *E. coli* を宿主としたシステムなどが利用可能であるが、熱安定性の低さなどが原因で高生産が難しい場合もある。本稿で紹介した好冷性細菌を宿主とした異種タンパク質生産システムのさらなる改良にも大きな期待がもたれる。また、より優れた生産システムを開発・改良していくためには、好冷性細菌の低温適応機構の分子レベルでの理解を深めていくことが重要であると考えられる。

文 献

- Russell, N.J. (1990) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 326, 595–608, discussion 608–611.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georgette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., & Feller, G. (2000) *Trends Biotechnol.*, 18, 103–107.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., & Sowers, K.R. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 253–261.
- Marx, J.C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., & Gerday, C. (2007) *Mar. Biotechnol. (NY)*, 9, 293–304.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., & Thomas, G. (2008) *Biotechnol. Adv.*, 26, 457–470.
- Choo, D.W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., & Esaki, N. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 486–491.
- Kulakova, L., Galkin, A., Kurihara, T., Yoshimura, T., & Esaki, N. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 611–617.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Choo, D.W., Hirano, Y., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2003) *Protein Expr. Purif.*, 30, 171–178.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 144–148.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1682–1690.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., & Esaki, N. (2002) *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 16, 255–263.
- Wei, Y.L., Kurihara, T., Suzuki, T., & Esaki, N. (2003) *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 23, 357–365.
- Kawamoto, J., Kurihara, T., Kitagawa, M., Kato, I., & Esaki, N. (2007) *Extremophiles*, 11, 819–826.
- Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato, S.B., & Esaki, N. (2009) *J. Bacteriol.*, 191, 632–640.
- Sato, S., Kurihara, T., Kawamoto, J., Hosokawa, M., Sato, S.B., & Esaki, N. (2008) *Extremophiles*, 12, 753–761.
- 栗原達夫, 江崎信芳 (2006) 化学と生物, 44, 4–6.
- Miyake, R., Kawamoto, J., Wei, Y.L., Kitagawa, M., Kato, I., Kurihara, T., & Esaki, N. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4849–4856.

- 18) Feller, G. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 648–662.
 - 19) Siddiqui, K.S. & Cavicchioli, R. (2006) *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403–433.
 - 20) 栗原達夫, 江崎信芳 (2009) 化学工学, **73**, 324–327.
 - 21) Goodchild, A., Saunders, N.F., Ertan, H., Raftery, M., Guilhaus, M., Curmi, P.M., & Cavicchioli, R. (2004) *Mol. Microbiol.*, **53**, 309–321.
 - 22) Goodchild, A., Raftery, M., Saunders, N.F., Guilhaus, M., & Cavicchioli, R. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 473–480.
 - 23) Seo, J.B., Kim, H.S., Jung, G.Y., Nam, M.H., Chung, J.H., Kim, J.Y., Yoo, J.S., Kim, C.W., & Kwon, O. (2004) *Proteomics*, **4**, 3654–3659.
 - 24) Bakermans, C., Tollaksen, S.L., Giometti, C.S., Wilkerson, C., Tiedje, J.M., & Thomashow, M.F. (2007) *Extremophiles*, **11**, 343–354.
 - 25) Zheng, S., Ponder, M.A., Shih, J.Y., Tiedje, J.M., Thomashow, M.F., & Lubman, D.M. (2007) *Electrophoresis*, **28**, 467–488.
 - 26) Kurihara, T. & Esaki, N. (2008) in *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (Margesin, R., Schinner, F., Marx, J. C. & Gerday, C. eds.), pp. 333–344, Springer-Verlag, Berlin.
 - 27) Berger, F., Normand, P., & Potier, P. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 5670–5676.
 - 28) Suzuki, Y., Haruki, M., Takano, K., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1372–1381.
 - 29) Yazawa, K. (1996) *Lipids*, **31 Suppl.** S297–300.
 - 30) Satomi, M., Oikawa, H., & Yano, Y. (2003) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 491–499.
 - 31) Kato, C. & Nogi, Y. (2001) *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 223–230.
 - 32) Wallis, J.G., Watts, J.L., & Browse, J. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 467.
 - 33) Valentine, R.C. & Valentine, D.L. (2004) *Prog. Lipid Res.*, **43**, 383–402.
 - 34) Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T., Watanabe, K., & Morita, N. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 665–670.
 - 35) Okuyama, H., Orikasa, Y., & Nishida, T. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 570–574.
 - 36) Rabus, R., Ruepp, A., Frickey, T., Rattei, T., Fartmann, B., Stark, M., Bauer, M., Zibat, A., Lombardot, T., Becker, I., Amann, J., Gellner, K., Teeling, H., Leuschner, W.D., Glockner, F.O., Lupas, A.N., Amann, R., & Klenk, H.P. (2004) *Environ. Microbiol.*, **6**, 887–902.
 - 37) Wintrobe, P.L. & Arnold, F.H. (2000) *Adv. Protein Chem.*, **55**, 161–225.
 - 38) Morita, R.Y. (1975) *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144–167.
 - 39) Feller, G. & Gerday, C. (2003) *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 200–208.
-