

## 特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

好塩性酵素の分子メカニズム  
—高度好塩菌由来ヌクレオシドニリン酸キナーゼから学ぶ—

石橋 松二郎, 徳 永 正 雄

高度好塩菌の生育には2.5M以上の塩が必須で、その酵素は一般的に安定性と活性に1M以上の塩を必要とする。この高度好塩菌由来の酵素はタンパク質表面に酸性アミノ酸を多く持つという明快な特徴を示している。

我々は高度好塩菌から30°C以下では安定性や活性に塩を必要としない例外的な酵素ヌクレオシドニリン酸キナーゼを見出した。しかし、構造形成には高濃度の塩を必要とし、この塩の役割は、低い塩濃度ではタンパク質表面の遮蔽を行い、高濃度では疎水的コア構造の形成に寄与していることを明らかにした。

また、低塩濃度存在下でも構造形成できる変異体を作成し、そのメカニズムを明らかにし、サブユニット構造の安定性は、好塩性タンパク質の好塩性と深く関わっているという、新たな好塩性酵素の特徴を示すことができた。

## 1. 好塩菌とは

通常生物が生育できないような特殊環境下でも生育できる能力を持った微生物を「極限環境微生物」と呼んでいる。近年、さまざまな極限環境微生物、例えば温泉熱水噴出口付近のような高温環境下に生育できる好熱性微生物やpHが高い環境下でも生育できる好アルカリ性微生物などが研究されている<sup>1,2)</sup>。

一方、好塩菌は高い塩濃度の環境下に好んで生育する微生物であり、日本の伝統発酵食品である味噌・醤油や塩蔵食品加工などで活躍している我々になじみの深い極限環境微生物である。また、好塩菌の中には「塩田」や「塩湖」のような飽和塩濃度環境下でも生育できるものも存在し、最初これらは塩蔵魚にできた赤い斑点やなめし革にできた赤いしみなどから分離された。このように好塩菌は幅広い

塩濃度環境下に生息しているため、増殖に必要な塩濃度に応じて分類されている(表1)<sup>3)</sup>。その中で最適生育食塩濃度が2.5M以上で、飽和食塩濃度まで生育できる好塩菌を高度好塩菌と分類している。そのほとんどは、アーキア(古細菌)に分類され、細胞膜上にはレチナールと呼ばれる発色団を含有するレチナールタンパク質が存在するという特徴を持っている。最も研究の進んだ種である *Halo-bacterium salinarum* は、4種類のレチナールタンパク質を持ち、2種類は光駆動性イオンポンプとして、あとの2種類はこの菌の走光性に関わる光センサーとして働いている<sup>4)</sup>。

高度好塩菌が多数生息している塩湖の組成を見てみると、イスラエルとヨルダンの国境にある死海はNa<sup>+</sup>と

表1 生育に必要な食塩濃度による好塩菌の分類

分類	最適生育塩濃度 (M)
高度好塩菌	2.5～飽和濃度
中度好塩菌	0.5～2.5
低度好塩菌	0.2～0.5
非好塩菌	<0.2
耐塩性菌	非好塩菌ではあるが、高濃度塩存在下でも生育可能

鹿児島大学農学部応用分子微生物学研究室 (〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21-24)

Molecular mechanism of halophilic enzyme—learn from nucleoside diphosphate kinase from extreme halophile—  
Matsujiro Ishibashi, Masao Tokunaga (Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture Kagoshima University, 21-24 Korimoto 1, Kagoshima 890-0065, Japan)

Mg<sup>2+</sup>がほぼ同濃度であり、生息する高度好塩菌も生育に高濃度のMg<sup>2+</sup>を要求する。また、同じ塩湖であるアメリカのグレートソルト湖はほとんどMg<sup>2+</sup>を含まず、Na<sup>+</sup>がほとんどで、そこに生息する高度好塩菌は生育にMg<sup>2+</sup>を要求しない。さらにケニアのマガディ湖ではpH11というアルカリ性のためにMg<sup>2+</sup>やCa<sup>2+</sup>は水酸化物として沈殿するので、それらは存在せず、そこに生息する高度好塩菌はアルカリ性高度好塩菌である。このように高度好塩菌と言っても生育するイオン濃度やpHが様々である<sup>5)</sup>。

菌の周りの生育環境に高濃度の塩が存在すると、細胞内部の浸透圧を調整して、外界の浸透圧に対抗する必要がある。そのため、低度好塩菌や中度好塩菌はエクトイン、ヒドロキシエクトイン、グリシンベタイン、グルタミン酸、プロリン、グルコース、トレハロースなど、適合溶質と呼ばれる物質を細胞内に蓄積する<sup>6)</sup>。細胞内濃度は、電荷を持ったグルタミン酸などは0.4M以上になることはなく、0.5M以上蓄積されるものは、実質的には電荷を持たず溶解度の高いタンパク質と相互作用しにくい物質である。その結果、適合溶質は単に外界との浸透圧調節に使われるだけでなく、細胞やタンパク質などの高分子を凍結、乾燥、高温のストレスから守る働きもしている。このように低度好塩菌や中度好塩菌は菌体内に適合溶質を蓄積するため、菌体内の塩濃度は生育環境よりも低いと考えられており、細胞内酵素は高度好塩菌に比べると好塩性を示さないものが多い。

一方、高度好塩菌はこれらとは全く逆の浸透圧対抗機構を持っており、外界に匹敵する高濃度の塩を菌体内に蓄積させることによって、外界との浸透圧調節を行っている。そのため、DNAの複製や転写、翻訳、タンパク質の構造形成、代謝など、全ての生命活動が高濃度の塩存在下で行われており、高度好塩菌由来の酵素は安定性やその活性に高濃度の塩を必要とする。

## 2. 好塩性タンパク質とは

好塩性酵素は高濃度の塩存在下のような水分活性の低い環境下でタンパク質立体構造の保持が可能である特徴的な酵素であり、新規反応系を開発するのに貴重である。さらに好塩性タンパク質は高い可溶性を持っているので、熱、有機溶媒に曝されても安定であるものが多く、産業利用という点でも期待できる。しかしながら、その有用性の反面、好塩性酵素は塩がない環境下では構造が保持できないものが多く、イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製が難しいため、生化学的に扱い難い研究素材の一つである。産業利用のためには好塩性酵素の詳細な好塩性メカニズムの解明を行うことが不可欠である。

一般的な高度好塩菌由来タンパク質の安定性には少なくとも1Mの塩が必要であると言われている。このような高

度好塩菌由来のタンパク質は明快な構造上の特徴が示されており、その最も際立ったものはタンパク質表面に酸性アミノ酸を多く有することである。Lanyiは、高度好塩菌と大腸菌のリボソームタンパク質のアミノ酸組成を比較して、高度好塩菌由来タンパク質には酸性アミノ酸が多く存在すること、Val, Leu, Ile, Pheといった疎水性アミノ酸が少なく、Ser, Thr残基が多いことを報告している<sup>7)</sup>。これらの結果、好塩性タンパク質は水分活性が低い環境下でもタンパク質表面に大量の水分子を保持することができ、さらにコア構造を安定化させることで機能すると考えられている。また近年、6種の高度好塩菌と24種の非好塩菌とのプロテオーム比較解析の結果でも高度好塩菌ではAsp, Glu, Val, Thr含有率の上昇が見られ、逆にLys, Met, Leu, Ile, Cys含有率の減少が見られたと報告されている<sup>8)</sup>。

個々のタンパク質の詳細な研究では、死海から分離された*Haloarcula marismortui* 由来リング酸デヒドロゲナーゼ(MalDH)<sup>9-11)</sup>や2Fe-2Sフェレドキシン(Fd)<sup>12)</sup>などについて詳しく調べられており、好塩性タンパク質の高濃度塩存在下での安定化メカニズムが検討されている。*H. marismortui* 由来MalDHは高濃度の塩存在下では四量体を形成し、活性を保持しているが、2M以下の塩濃度下では単量体に解離し、活性を失う典型的な好塩性酵素である。この酵素は、カチオンのタンパク質表面への非特異的な結合の他に、数箇所の特異的なイオン結合サイトを持っており、四量体の安定化にCl<sup>-</sup>の結合が寄与していると報告されている。

また、*H. marismortui* 由来Fdはよく研究されている植物タイプFdの構造と類似しているが、2Fe-2Sクラスターの近傍以外は酸性アミノ酸で表面が覆われ、さらに、N末端領域に2本の両親媒性ヘリックスが挿入されている。これらを構成している酸性アミノ酸に富むドメインが水分子と結合し、他の表面の可溶性に寄与していると考えられている。*E. coli* 由来ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の立体構造を基にした*Haloferax volcanii* 由来DHFRの立体構造モデルの解析でも同様に、酸性アミノ酸が豊富な領域は活性部位と反対側に局在していることが示されおり<sup>13)</sup>、全体的な酸性アミノ酸の増加よりもむしろ酸性アミノ酸の局在化による可溶性の向上が重要ではないかと考えられている。

## 3. 好塩性酵素ヌクレオシド二リン酸キナーゼの大腸菌での発現

筆者らは30°C以下では安定性や活性に塩を必要としない例外的な酵素ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(nucleoside diphosphate kinase: HsNDK)を高度好塩菌*Halobacterium salinarum*より見出した。さらに、この酵素の遺伝子のク

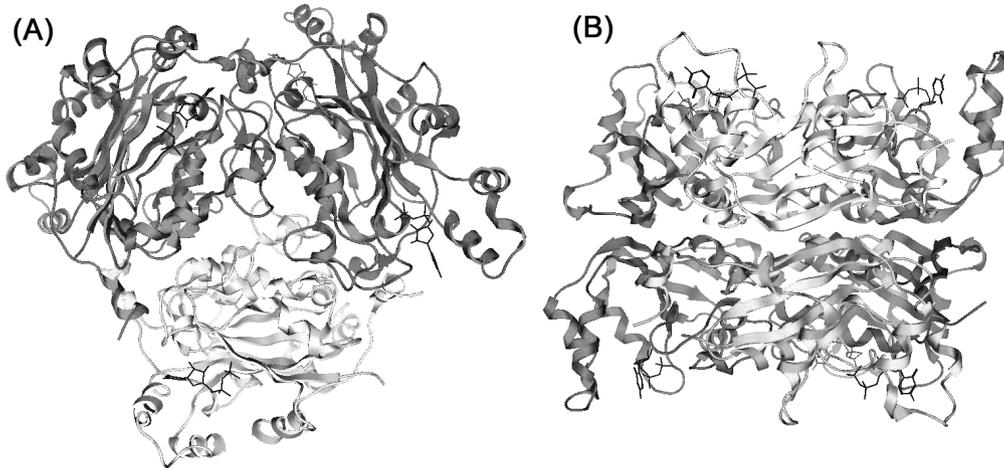


図1 HsNDKの立体構造(2AZ3)をリボンで描いた図

HsNDKは二量体ユニット(例えば(B)の上下に並んでるユニット)を形成し、その二量体ユニットが三つ会合して六量体を形成している。(A)上から見た図。(B)横から見た図。

ローニングに成功し、HsNDKのアミノ酸配列161残基を推定した。HsNDKのオープンリーディングフレーム(ORF)の前には少なくとも三つのORFが存在し、これらの遺伝子は互いにオペロンを形成していると予想された(accession number: AB036344)<sup>14)</sup>。HsNDKは他の生物由来のNDKと高い相同性を示し、FASTAで検索すると*Archaeoglobus fulgidus* (58.9%の同一性)、*Bacillus subtilis* (57.7%)、*Synechocystis* sp. (56.7%)、*Staphylococcus aureus* (53.3%)、*Drosophila melanogaster* (51.0%)であった。前述のとおり一般的な好塩性タンパク質は酸性アミノ酸が多いのが特徴であるが、このHsNDKも酸性アミノ酸が23.0%含まれ、他の生物*A. fulgidus* (16.7%)、*B. subtilis* (13.4%)、*Synechocystis* sp. (13.4%)、*S. aureus* (14.1%)、*D. melanogaster* (11.9%)由来のNDKより、顕著に多く含まれていた。

酵素の諸性質検討を目的に、このHsNDKの遺伝子をpET3a(Novagen)に組み込み、大腸菌BL21(DE3)で発現させたところ、残念ながら大腸菌細胞内では活性を保持していなかった。しかし、3.8M NaCl存在下でHsNDKは活性化した。*H. marismortui*由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼも同様に、大腸菌細胞内で発現させると活性を持たないが、NaCl濃度を3Mに増加させると活性化されることが報告されている<sup>15)</sup>。このように高度好塩菌由来HsNDKも活性化には高濃度の塩が必要であることを示した。また、HsNDKは一旦高次構造をとると構造の維持には必ずしも塩を必要とせず、一般的な好塩性酵素とは異なっていた。

次に高純度の標品を容易に得るために、N末端側にHisタグ配列を付加したHsNDK(HisNDK)の発現を試みた。驚いたことに大腸菌での発現量は約60倍増加した。恐らくこれはHisタグを含むフラグメントの配列がmRNAを

安定化させたためだと考えられる。さらにまた発現したHisNDKは、一旦高濃度の塩にさらされなくても、ATPアフィニティーカラムに結合した<sup>16)</sup>。このことはHisNDKが大腸菌細胞内で正しく構造を形成できたことを示唆している。筆者らが知る限りでは、これは高度好塩菌由来の酵素が通常生物である大腸菌細胞内で活性を保持したまま発現した最初の例である。HisNDKはHisタグが付いていないHsNDKに比べ大腸菌細胞内で約60倍発現しており、これは高濃度高分子物質存在下ではタンパク質は安定化されるクラウディング効果<sup>17,18)</sup>と正の電荷が六つ連続したHisタグ配列により大腸菌細胞内のような低い塩濃度下でもHsNDK自体の安定化が促進されたためと考えられる(投稿準備中)。このようにして大量発現させて調製したHisNDKを用いて、X線構造解析にも成功した(図1)<sup>19)</sup>。

#### 4. ヌクレオシドニリン酸キナーゼの構造形成メカニズム

好塩性タンパク質は酸性アミノ酸に富み、比較的大きな側鎖の疎水性アミノ酸が減少している<sup>7,20,21)</sup>ため、塩濃度が低い環境下ではタンパク質表面の負の電荷同士が反発し、さらにコア構造も緩み、構造が不安定になると考えられる。塩には負電荷の遮蔽効果やイオン結合効果と疎水的相互作用を強くする塩析効果があるので、高濃度の塩存在下では塩がタンパク質表面の負電荷を遮蔽し、さらに弱いコア構造を正しく形成させることによって安定化させていると考えられる。そこで本好塩性酵素に対する塩の効果調べる目的で、まず塩による負電荷の遮蔽効果やイオン結合効果と疎水的コア構造を強くする効果の違いを見分けるために、trimethylamine *N*-oxide (TMAO)とNaClによるタンパク質の構造形成の影響の違いを比較した。TMAOはケミカルシャペロンとも呼ばれ、非イオン性の物質で電荷を持っておらず、負電荷の遮蔽効果やイオン結合効果がな

い。TMAOは微生物細胞内に蓄積され、浸透圧効果をあげたり、腎臓などで尿素から酵素を保護する作用を持っている<sup>22-24</sup>。タンパク質のとても強い安定化剤で熱安定性やタンパク質の構造形成を促進する。いくつかのタンパク質は変異を受けると、正しい構造をとれなくなり、様々な病気を引き起こす<sup>25</sup>。TMAOは構造を回復させ、タンパク質を活性化させる<sup>26,27</sup>。TMAOはタンパク質分子に結合したり構造内に侵入したりするのではなく、タンパク質の水和殻から排除される。TMAOのタンパク質分子からの排除はエントロピーの低下につながるため、その低下を少なくするために、タンパク質はより溶媒との接触面を減らしてエネルギー的に安定な状態、すなわちよりコンパクトで安定な構造を取るよう強いられる<sup>22</sup>。

我々は熱や尿素で変性したHsNDKを4M TMAOで処理することによってリフォールディングさせ、非イオン性物質によってはじめて高度好塩菌由来の酵素を活性型にリフォールディングさせることに成功した。但し、2.0M以下ではその効果はなく高濃度を必要とした<sup>28</sup>。また、NaClを含むバッファー中でHsNDKは、pH7.0からpH8.0ではpHに依存せず構造形成するのに対して、TMAOを含むバッファー中ではpH8.0で構造形成することができなかった。これから疎水の相互作用の強化だけでは巻き戻らないと解釈できる。そこで4M TMAO (pH8.0)を含むバッファー中にタンパク質表面の負電荷の遮蔽効果しか持たないようにNaClを0.2Mだけ加えて構造形成実験を行った。その結果巻き戻りを確認できた(図2)<sup>28</sup>。以上のことを総

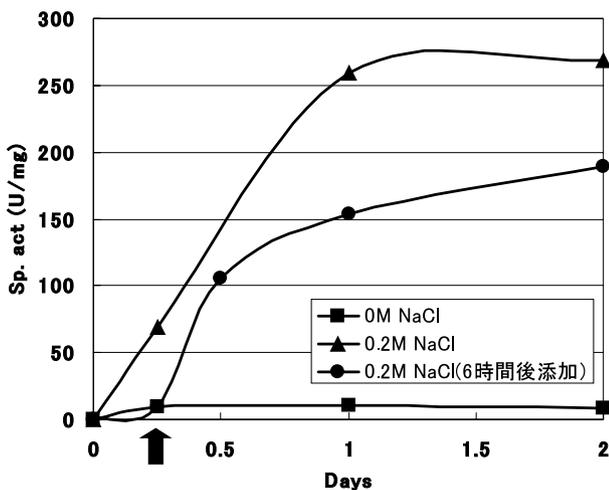


図2 4M TMAO (pH8.0) 存在下でのHsNDK構造形成における塩の効果

6M尿素で変性させたHsNDK (0.74mg NDK/ml) (0時間)を4M TMAO, Tris-HCl (pH8.0) バッファーに0.2M NaClを添加したもの、もしくはしてないもので6時間透析後、構造形成の指標として活性を測定した。また、4M TMAO, Tris-HCl (pH8.0) バッファーに6時間透析後、矢印の時間(6時間後)に終濃度0.2MになるようにNaClを加え、同様に活性を測定した。

合するとNaClのような塩はタンパク質表面の負電荷の遮蔽効果と疎水の相互作用を強化する効果の二つの働きによって好塩性タンパク質を構造形成させることが実験的に証明されたといえる。

また、同様な実験で塩析効果(タンパク質の疎水的コア構造を強める効果)が強い $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ は、他の塩に比べてHsNDKの巻き戻り効率がよかったのに対し、塩入効果(タンパク質の疎水的コア構造を弱める効果)を持つ $\text{MgCl}_2$ 中での構造形成実験では、1.0Mの濃度までは濃度に依存して巻き戻り効率が促進されたが、それ以上の濃度になると逆に阻害された<sup>29</sup>。低い濃度での $\text{MgCl}_2$ はタンパク質の負電荷の遮蔽やイオン結合などにより巻き戻りを促進しているが、 $\text{MgCl}_2$ は塩入効果を持っているので、濃度が上昇するとタンパク質の疎水的コア構造を弱め不安定化させる。結果として正の効果と負の効果の差し引きにより、ベル型の効率を示したのだと推察された。

以上の結果より、好塩性タンパク質の安定化に対する塩の役割は、低い塩濃度ではタンパク質表面の負電荷の遮蔽を行い、高い濃度では疎水的コア構造の形成に寄与していることが明らかになった。

#### 5. ヌクレオシドニリン酸キナーゼサブユニット間の相互作用と好塩性

筆者らは、塩濃度に依存するHsNDKの構造形成能を指標として、変異が入りやすい条件下でのPCRを行い、*ndk*遺伝子にランダムに変異を入れ、低い塩濃度でも構造形成ができる114番目のグリシンがアルギニンに変異したG114R変異体を取得した<sup>30</sup>。熱失活後、野生型では構造形成に2M以上のNaClが必要であるのに対して、この変異体は高濃度塩存在下では構造形成効率が若干落ちているものの1M以上で効率よく構造形成ができた(図3)。熱安定性も野生型と比較して約 $10^\circ\text{C}$ 上昇した。驚いたことに野生型ではプリン塩基を持つGTPに基質特異性が高かったのに対し、変異体ではピリミジン塩基を持つCTP, TTP, UTPに基質特異性が高くなった。恐らく変異により活性中心付近の電荷が正電荷になったため、大きな基質であるGTPが結合し難くなったと考えられる。これに関しては詳細なデータを得るために、現在構造解析を行っている。

この変異体の114番目の残基とその近傍の残基との距離をMOEソフトウェア(Cheical Computing Group Inc.)で解析したところ、この114番目の残基は、二量体ユニットに隣接したサブユニットの155番目のグルタミン酸と非常に近い位置にあることが判明した。この結果より114番目のアルギニンと155番目のグルタミン酸との間に相互作用があることが推察された。そこで、サブユニットの安定性

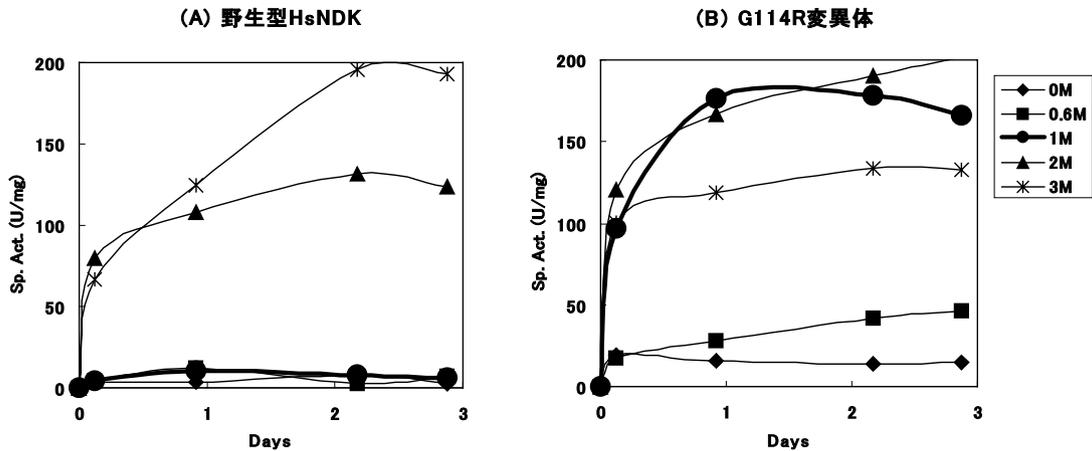


図3 熱変性させた野生型 HsNDK と G114R 変異体の構造形成における NaCl 濃度の効果  
 熱変性させたサンプルを NaCl が含まれている Tris-HCl (pH8.0) バッファーに加え (0.37mg NDK/ml),  
 構造形成の指標として活性を測定した。

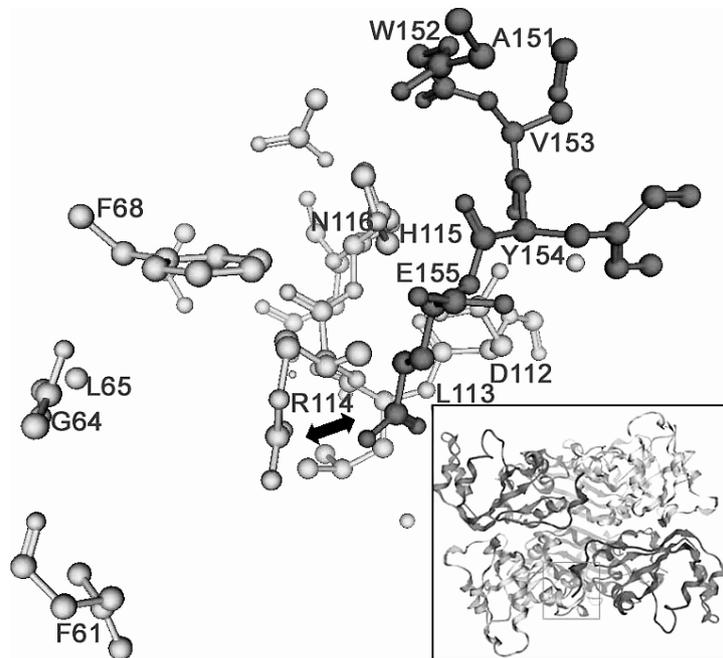


図4 G114R 変異体の六量体構造モデリングと二量体ユニット間の接触領域

四角で囲った部分を拡大した。変異した R114 は隣接したサブユニット (濃い灰色) の E155 と静電的相互作用 (矢印) を生じさせ、二量体-二量体ユニット間を安定化させている。

を測定するためにサイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography) -多角度光散乱計 (multi-angle laser light scattering photometer) 分析 (SEC-MALLS) を行った。その結果、0.2M NaCl 存在下 25°C では野生型、変異体共に六量体であるのに対し、35°C では野生型は二量体に解離したが、変異体は六量体のままであった。このことは、変異体のサブユニット構造が低い塩濃度下で安定化していることを示している<sup>30)</sup>。

そこで 114 番目のアルギニンと 155 番目のグルタミン酸

との相互作用を詳細に調べる目的で、114 番目の残基を正の電荷を持つリジン、負の電荷を持つアスパラギン酸、電荷を持たないセリンに変異させた G114K, G114D, G114S 変異体を用いて解析した。残念ながら G114D はサブユニット構造の解離のためか活性を保持していなかったが、他の変異体は野生型と同等の活性を保持していた。native-PAGE で解析したところ、G114K は G114R と同じバンドの位置を示し六量体であること、G114S は野生型と同様に解離していることが示され、G114K も G114R と同様に

サブユニット構造が安定化されることが明らかになった。次に1M NaCl存在下での構造形成実験や0.2M NaCl存在下での温度安定性実験を行ったところ、予想どおりG114KはG114Rと、G114Sは野生型と同等の性質を有していた<sup>31)</sup>。

このことから今回得られた変異体G114Rのサブユニット構造の安定化は114番目のアルギニンとその隣接したサブユニットの155番目のグルタミン酸との静電的相互作用によるものであることが明らかになった(図4)。これにより低い塩濃度下でもサブユニット同士の会合が可能になり、活性が回復したのではないかと考えられる。また、G114R変異体は野生型と違って大腸菌細胞内の発現でも活性を保持していた。このことも同様に、G114R変異体はサブユニット構造が静電的相互作用により安定化しているため、大腸菌細胞内のような低い塩濃度下でも六量体構造が安定であり、活性を保持していたと考えられる。

さらに、至適塩濃度がそれぞれ1M NaClと2M NaClで異なるが、一次構造は1アミノ酸残基しか違いがない*Halococcus quadrata*と*H. sinaliensis*のNDK(*H. quadrata*は31番目のアミノ酸残基がアルギニン、*H. sinaliensis*はシステイン)の比較でも、結晶解析の結果、*H. quadrata* NDKはArg31により生じた水素結合と静電的相互作用により六量体サブユニット構造が安定化されていることが示された。この結果、*H. sinaliensis* NDKは2M NaCl以上の存在下でないと六量体を維持できないが、(*H. quadrata* NDKは0.2M NaCl存在下でも六量体を維持できるようになっていることが明らかになった<sup>32)</sup>。このことからサブユニット構造の安定性は、好塩性タンパク質の好塩性と深く関わっていることが示唆される。

## 6. 好塩性酵素の分子育種

好塩性酵素は前述のとおり酸性アミノ酸が増加しているという明快な特徴がある。また、酸性アミノ酸の増加は単にタンパク質表面の数が増加することが重要なのではなく、その局在性が重要ではないかとも考えられている。

実際に中度好塩菌*Halomonas*属由来のNDK(HaNDK)と相同性が非常に高い通常細菌*Pseudomonas aeruginosa*由来NDK(PaNDK)(78%同一性)の134,135番目残基をHaNDKはEEからAA,PaNDKはAAからEEに変異させると、HaNDK変異体は至適塩濃度の低下、さらに安定性に対する塩の添加効果も失っていた。逆にPaNDK変異体は至適反応塩濃度の上昇、安定性に対する塩の添加効果の出現、及び熱変性後の巻き戻り効果の上昇など好塩性効果が付与されていた<sup>33)</sup>。このように負電荷の局在性を考慮することにより2残基のみの変異で好塩性効果の付与が可能である。

すなわち酸性アミノ酸の局在性に注目して好塩性酵素の

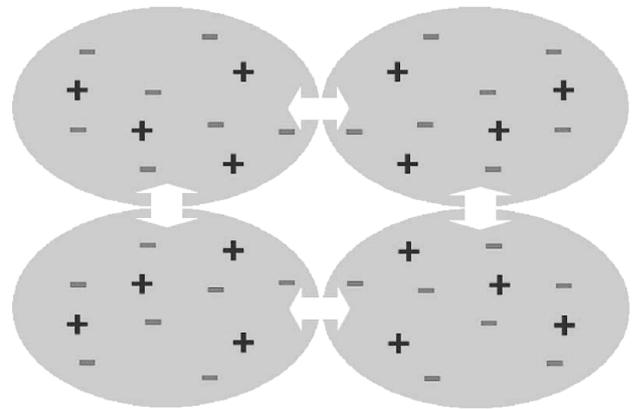


図5 好塩性酵素の分子育種の概略図

サブユニット間の相互作用をコントロールする手法とタンパク質表面の電荷をコントロールする手法を組み合わせることで、好塩性酵素の分子育種が簡単に素早くできる。

分子育種をしていくことは非常に合理的であり、幅広い塩濃度に適応した好塩性酵素の分子育種が可能であると考えられる。一方でこの育種法は保存性が高い比較配列の存在、構造の熟知などが必要であり、変異させるアミノ酸の特定に時間を要することも考えられる。

それに対してサブユニット間の相互作用は水素結合、疎水的相互作用、静電的相互作用、芳香族側鎖間の相互作用などがあるが、構造の知見もしくはモデリング構造があれば、素早く簡単にサブユニット間の相互作用に関係するアミノ酸を特定し、分子育種することが可能である。ただし、幅広い塩濃度に適応した好塩性酵素の分子育種が可能であるかはまだ未知数である。今後さらなるサブユニット間の安定化に関わるアミノ酸残基の変異体を取得し、詳細に調べる必要がある。

近い将来、サブユニット間の相互作用をコントロールすることによって好塩性酵素の分子育種をするというこの新しい手法と、タンパク質表面に酸性アミノ酸を増加させる手法を組み合わせることにより(図5)、好塩性酵素の分子育種技術がますます進むことを期待している。

## 謝辞

Alliance Protein Laboratories 荒川力先生、国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一先生、並びにソルトサイエンス研究財団に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., & Stetter K.O. (1997) *Extremophiles*, 1, 14-21.
- 2) Takami, H., Akiba, T., & Horikoshi, K. (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 519-523.
- 3) 亀倉正博 (1991) 極限環境微生物ハンドブック (今中, 松沢編), pp. 331-334, サイエンスフォーラム, 東京.

- 4) 井原邦夫 (1998) 古細菌の生物学 (古賀, 亀倉編), pp. 206–216, 東京大学出版会, 東京.
  - 5) 中村 聡 (2000) 極限微生物とその利用 (堀越, 関口, 中村, 井上編), pp. 70–92, 講談社サイエンティフィック, 東京.
  - 6) Ventosa, A., Nieto, J.J., & Oren, A. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 504–544.
  - 7) Lanyi, J.K. (1974) *Bacteriol. Rev.*, **38**, 272–290.
  - 8) Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T., & Dutta, C. (2008) *Genome Biol.*, **9**, R70.
  - 9) Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000) *Extremophiles*, **4**, 91–98.
  - 10) Irimia, A., Ebel, C., Madern, D., Richard, S.B., Cosenza, L.W., Zaccai, G., & Vellieux, F.M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **326**, 859–873.
  - 11) Madern, D. & Ebel, C. (2007) *Biochemistry*, **89**, 981–987.
  - 12) Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M., & Shoham, M. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 452–458.
  - 13) Böhm, G. & Jaenicke, R. (1994) *Protein Eng.*, **7**, 213–222.
  - 14) Ishibashi, M., Tokunaga, H., Hiratsuka, K., Yonezawa, Y., Tsurumaru, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2001) *FEBS Lett.*, **493**, 134–138.
  - 15) Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai, G., Eisenberg, H., & Mevarech, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 4308–4313.
  - 16) Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2004) *FEBS Lett.*, **570**, 87–92.
  - 17) van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C.M., & Ellis, R.J. (2000) *EMBO J.*, **19**, 3870–3875.
  - 18) Ellis, R.J. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 114–119.
  - 19) Besir, H., Zeth, K., Bracher, A., Heider, U., Ishibashi, M., Tokunaga, M., & Oesterhelt, D. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6595–6600.
  - 20) Kushner, D.J. (1978) in *Microbial Life in Extreme Environments*, pp. 317–368, Academic Press, Inc., London.
  - 21) Kushner, D.J. (1985) in *The Bacteria*, Vol. VIII, 99, pp. 171–214, Academic Press, Inc., London.
  - 22) Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1985) *Biophys. J.*, **47**, 411–414.
  - 23) Liu, Y. & Bolen, D.W. (1995) *Biochemistry*, **34**, 12884–12891.
  - 24) Wang, A. & Bolen, D.W. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9101–9108.
  - 25) Kopito, R.R. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, S167–S173.
  - 26) Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., & Welch, W.J. (1997) *J. Clin. Invest.*, **99**, 1432–1444.
  - 27) Smith, M.J., Crowther, R.A., & Goedert, M. (2000) *FEBS Lett.*, **484**, 265–270.
  - 28) Ishibashi, M., Sakashita, K., Tokunaga, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2003) *J. Protein Chem.*, **22**, 345–351.
  - 29) Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2003) *Protein Pept. Lett.*, **10**, 575–580.
  - 30) Ishibashi, M., Tatsuda, S., Izutsu, K., Kumeda, K., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 4073–4079.
  - 31) Ishibashi, M., Iwasa, T., Kumeda, K., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2009) *Int. J. Biol. Macromol.*, **44**, 361–364.
  - 32) Yamamura, A., Ichimura, T., Kamekura, M., Mizuki, T., Usami, R., Makino, T., Ohtsuka, J., Miyazono, K., Okai, M., Nagata, K., & Tanokura, M. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 4692–4700.
  - 33) Tokunaga, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2008) *Protein Sci.*, **17**, 1603–1610.
-