

- 6) Hirose, T. & Sugiura, M. (2001) *EMBO J.*, **20**, 1144–1152.
- 7) Miyamoto, T., Obokata, J., & Sugiura, M. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 627–634.
- 8) Kotera, E., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2005) *Nature*, **433**, 326–330.
- 9) Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K., Endo, T., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2004) *Nature*, **429**, 579–582.
- 10) Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Tacconat, L., & Small, I. (2004) *Plant Cell*, **16**, 2089–2103.
- 11) Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T., & Shikanai, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 37661–37667.
- 12) Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., & Shikanai, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8178–8183.
- 13) O'Tool, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Lineweber, C., Sugita, M., & Small, I. (2008) *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 1120–1128.
- 14) Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V., & Lurin, C. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 4132–4138.
- 15) Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2003) *Plant J.*, **36**, 541–549.

奥田 賢治, 鹿内 利治

(京都大学大学院理学研究科生物科学専攻植物科学系)

Genetic research of RNA editing in plastids

Kenji Okuda and Toshiharu Shikanai (Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Oiwakecho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606–8502, Japan)

## 好塩性酵素：マイナス荷電が決める好塩性

### 1. はじめに

多くの有用微生物の利用によって人々の日々の暮らしが支えられていることは自明の事実である。通常生物が生きてゆけないいわゆる“極限環境”に生息している微生物は、極端な環境条件でも生きてゆける特殊な能力を持っているわけで、この特殊能力を解明し利用することは重要な研究課題である。

### 2. 好塩菌と好塩性酵素

筆者らはこのような極限環境微生物の中でも特に“好塩菌”とそのタンパク質に注目して研究を進めている。好塩

菌は塩環境に適応するとともに塩を生育に要求する微生物であり、極端に高い塩濃度（～2.5M以上）を好む高度好塩菌と、最適生育塩濃度は1～2M程度であるが0.2M～飽和濃度と非常に幅広い塩濃度で生育可能な中度好塩菌に分類できる<sup>1)</sup>。高度好塩菌のほとんどは古細菌（Archaea）に属し、生育環境の高濃度塩に対抗する手段として、細胞内に外界に匹敵する高濃度の塩を蓄積する（salt-in）という通常の生物では見られない方法を用いている。細胞内はいわば「塩漬け」状態であるが、DNAの複製や転写、翻訳、タンパク質の構造形成、代謝等々、すべての生命活動がこのほぼ飽和塩濃度の細胞内で滞りなく行われている。そのため細胞構成成分は高濃度塩環境に適応して強い好塩性を示す。一方、中度好塩菌は細胞内に適合溶質を蓄積するため一般に細胞内塩濃度は生育環境よりは低い（salt-out）と考えられ、細胞内酵素は高度好塩菌ほど強い好塩性を示さないものが多い。また細胞外に分泌される酵素は高濃度塩の環境に適応して強い好塩性を示す。

### 3. 高度好塩菌由来酵素と中度好塩菌由来酵素の好塩性メカニズム

ひとくちに好塩性酵素といっても上記のようにそれらが働く生理的環境によって塩濃度は異なり、高度好塩菌由来のもの、中度好塩菌由来のもの（さらに中度好塩菌由来のものは細胞内酵素と細胞外酵素）で性質が異なり区別して考える必要がある。高度好塩菌由来の酵素は、一般に最低1M程度の塩がないと失活してしまい、酵素の安定性に高濃度塩環境を“利用”している。従って、好塩性メカニズムを考える際には、タンパク質-タンパク質の相互作用とともにタンパク質-溶液の相互作用、すなわちタンパク質と水分子や塩イオンとの相互作用の考察が必須である。これに比べると、中度好塩菌由来の酵素は、その安定性に塩を要求しないものも多く、細胞質酵素では、高濃度塩で活性が阻害されるものも多いので、溶液との相互作用も通常酵素により近いと考えられる。興味深いのは中度好塩菌の細胞外酵素である。高濃度塩存在下でもよく働く強い好塩性を示し、“通常酵素的性質”も持ち合わせているので、塩がなくても安定（耐低塩性＝安定なコア構造）なものがある。これは、自然界では0.2M～飽和濃度といった極めて幅広い塩濃度環境で働かなくてははいけないことを考えると合理的である。

### 4. 高度好塩菌タンパク質の好塩性メカニズム

典型的に強い好塩性を示す高度好塩菌酵素の好塩性メカ

ニズムは, Zaccai, Ebel, Madern らの *Haloarcula marismortui* (死海から分離された好塩性古細菌) 由来リング酸デヒドロゲナーゼ (HmMDH) の研究によって詳しく調べられている<sup>2,3)</sup>.

高度好塩性酵素のアミノ酸組成には明快な特徴があり, アスパラギン酸, グルタミン酸など酸性アミノ酸含量が目立って高い. 一方, 塩基性アミノ酸含量は少なく, 総電荷が大きくマイナスに偏った酸性タンパク質である. 幾種類かの高度好塩性菌のゲノム解析, プロテオーム解析からもこの傾向は明らかである<sup>4)</sup>. 極限環境生物由来で最もよく研究されている好熱性タンパク質の表面には, 荷電を持った酸性・塩基性アミノ酸両者の含量が高く, 空間的には酸性・塩基性アミノ酸が近くに位置する頻度が高い<sup>5)</sup>. つまりこれらアミノ酸残基の静電的な相互作用がタンパク質の安定化の一つの要因と考えられている. 好塩性タンパク質はこれと好対照で, 空間的に酸性アミノ酸の近くに位置するアミノ酸の頻度は, 塩基性アミノ酸が一番低く, 酸性, 非極性, 極性, その他のアミノ酸の順に高くなると報告されている<sup>5)</sup>. 豊富な酸性アミノ酸残基は好塩性タンパク質

の表面を負電荷でおおっている. この表面の負電荷に塩イオン(カチオン)とそれに結合した水分子が多量に群がり, hydrated ion network を形成して水和殻を作り, 高濃度塩存在下でのタンパク質の安定性と機能性を維持していると考えられている. また, HmMDH においては, このようなカチオンの非特異的な結合とは対照的に, Cl<sup>-</sup>アニオンが数箇所の特異的な結合サイトに結合し, タンパク質の構造安定性を高めていることが分かっている. 四量体を形成している HmMDH においては, 高濃度塩存在下においてもサブユニット間の結合には静電的な塩橋が大きく関与しているらしく, ここに Cl<sup>-</sup>アニオンが結合してサブユニット構造を安定化していると報告されている<sup>2,3)</sup>.

一般に高度好塩性酵素は, 低い塩濃度環境には耐えられず失活する. これは多量のマイナス荷電どうしの静電的反発と, (おそらく通常酵素に比べるとともに強固でない) コア構造のゆるみによって変性に向かうと考えられる. このコア構造の弱さは強い疎水性を示すアミノ酸の含量が低いことに起因している. 高度好塩菌は塩の塩析効果を利用してコア構造を維持している.



図1 HsNDKとショウジョウバエNDKの三次元構造比較

HsNDKはリボンで, ショウジョウバエNDKは線で描き, 重ね合わせた.  $\alpha 1$ - $\alpha 10$ はヘリックス構造,  $\beta 1$ - $\beta 4$ はベータ構造をとる領域を示している. NはN末端, CはC末端を表す. 小さい丸は結合した基質. 四角で囲んだ $\alpha 3$ - $\alpha 4$ ,  $\alpha 8$ - $\alpha 10$ 領域は, 酸性アミノ酸残基が特に集中している「酸性クラスター」領域.

筆者らは、高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* から塩がなくても活性を保持している耐低塩/高度好塩性酵素ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (HsNDK) を見つけた<sup>9)</sup>。本酵素は、30℃以下であれば塩がなくても六量体構造と活性を保持している。しかし大腸菌内で発現した不活性型酵素や熱処理などによる変性型酵素の巻き戻りには、2M以上の塩か、4Mの適合溶質 (trimethylamine-*N*-oxide) の助けが必要である<sup>7)</sup>。現在までの結晶解析<sup>8)</sup>では、結合した水分子や塩イオンを特定できる解像度は得られておらず詳細な安定化のメカニズムの解明は今後の課題である。一方、結晶解析で得られた HsNDK の主鎖の三次元構造は、塩基性タンパク質 (等電点 8.55) であるショウジョウバエ NDK の構造と重ね合わせてみるとほぼぴったりと重なる (図 1)。HsNDK の  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  領域と  $\alpha 8$ - $\alpha 10$  領域は酸性アミノ酸が特に集中した酸性クラスター領域であるが、この領域でも主鎖の構造がほぼぴったり一致していることは興味深い。

筆者らは、さらに低濃度の塩で巻き戻る HsNDK 変異体を選抜し、114番目のグリシンがアルギニンに変異した G114R 変異体を得た<sup>9)</sup>。G114RHsNDK は、0.6~1M の塩存在下で熱変性から巻き戻り、熱安定性も 10℃ 程度増加していた。この 114 番目残基は、六量体を形成する隣のサブユニットの 155 番目のグルタミン酸のごく近傍位置にあり、G114RHsNDK では隣どうしのサブユニット間のグルタミン酸-アルギニンによる塩橋によって、低塩濃度環境下において直接サブユニット間の相互作用が安定化されたものと考えられる。

## 5. 中度好塩菌 *Halomonas* 由来 NDK (HaNDK) の構造と安定性

筆者らは未だ詳細な研究が少ない中度好塩菌タンパク質の好塩性メカニズムを解明すべく、多くの好塩性タンパク質遺伝子を分離し、大腸菌での発現・精製により、安定性や可溶性、変性からの活性回復などの機能解析、二次構造やサブユニット構造解析などを行ってきた。中度好塩菌細胞質酵素である HaNDK<sup>10)</sup> は、(i) 活性については弱い好塩性を示したが、高濃度塩存在下では活性が阻害された。(ii) 4℃ 保存においては、塩の添加のあるなしに関係なく安定であった。また (iii) 熱による二次構造の融解については、50mM の NaCl 存在下では 38 (融解開始)-51 (融解終了)℃ であるのに対し、0.2M では 40-50℃、2M 以上では 41-63℃ と塩による安定化が観察された。HaNDK と最も相同性が高い (78% identity, 89% similarity) 通常細菌 *Pseu-*

*domonas aeruginosa* 由来の NDK (PaNDK) における同様の実験では、塩による安定化は見られなかった。(iv) 酸性アミノ酸残基数/塩基性アミノ酸残基数の比は、HaNDK で 1.64 (等電点 4.56)、PaNDK では 1.16 (等電点 5.36) と HaNDK のほうがより酸性タンパク質であるが、アミノ酸数で比べると酸性アミノ酸は HaNDK のほうが 1 個多いだけで、大きな差はなく、上記比率の違いは、HaNDK の塩基性アミノ酸数が少ないことに起因していた。ちなみに高度好塩菌由来 HsNDK の比は 2.64、等電点は 4.22 である。(v) HaNDK は、0~2M の NaCl 存在下で二量体を形成し、現在までに報告されていた種々生物の NDK は四量体もしくは六量体を示すとされているのに対して新規なサブユニット構造であった (図 2-1)。既報の四量体、六量体の基本構造は共通した二量体構造であり、HaNDK の結晶構造はこの基本構造と同一の構造であった (S. Arai, T. Tamada, R. Kuroki ほか: 未発表)。(vi) PaNDK と比較して HaNDK が示した最大の特徴は、80℃ で熱変性処理し冷却した後の構造の巻き戻り効率である。PaNDK が不可逆的に変性したのに対し、HaNDK は瞬時に 80% の活性を回復するという高い巻き戻り効率を示した。この変性後の高い巻き戻り効率は、筆者らが分離した中度好塩菌ペリプラズム由来の  $\beta$ -ラクタマーゼ (BLA) と同様の性質であった<sup>11)</sup>。ほとんど全ての BLA は、熱処理により不可逆的に変性するのに対して、中度好塩菌由来の BLA (HaBLA) は、瞬時に ~80% 程度の活性を可逆的に回復した。HaBLA は、酸性/塩基性アミノ酸の比が 2.1、等電点が 4.22 という典型的な好塩性酵素である。これらの結果は多くの好塩性酵素の構造的特徴に由来する共通の性質と考えられ、好塩性タンパク質は総電荷の偏りのため変性状態でも可溶性が高く、またマイナス荷電どうしの反発もあって、不可逆的な凝集体を作りにくいので、変性状態からの可逆的な巻き戻りに優れているものと考えられる (図 3)。この好塩性酵素が持っている高い構造可逆性は、酵素の応用面から考えても極めて有利な性質である。

## 6. HaNDK と PaNDK の二量体/四量体変換

グラム陰性細菌由来の NDK は一般に四量体構造 (二量体の二量体構造)、その他の真核生物や古細菌、グラム陽性細菌の NDK は六量体構造 (二量体の三量体構造) をとっているのに、なぜ HaNDK は基本構造の二量体構造のまま存在しているのだろうか? HaNDK と PaNDK のキメラタンパク質を作成して調べた結果、C 末端近傍領域がサブユニット構造を支配していることが分かり、*Mycococcus*

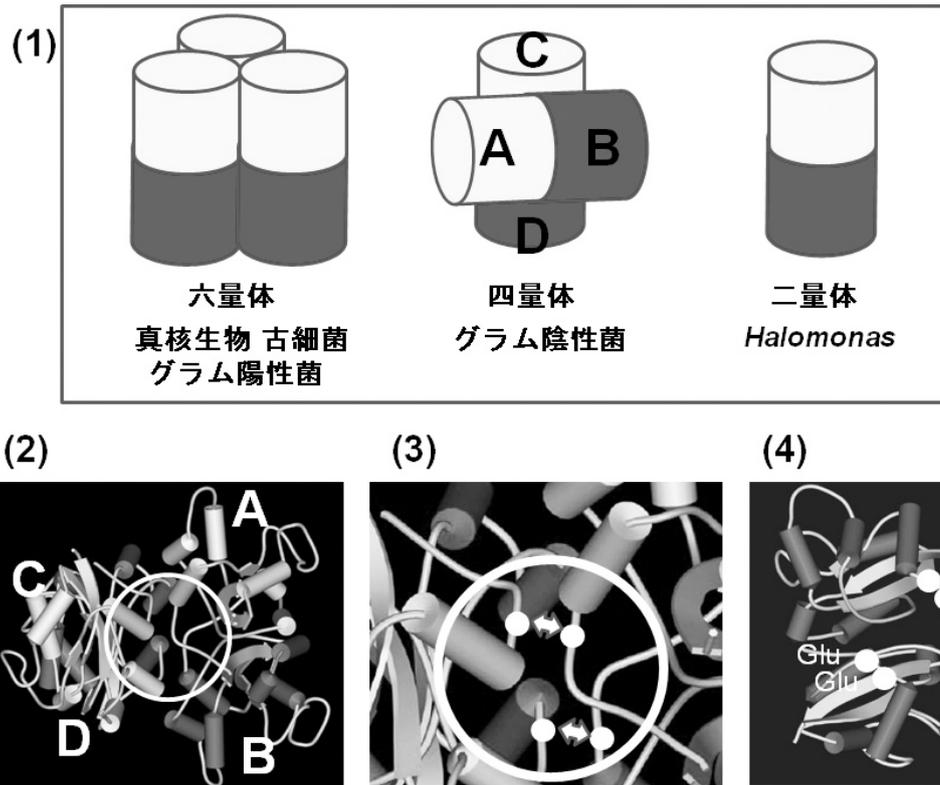


図2 NDKのサブユニット構造と好塩性を支配するC末端領域のグルタミン酸残基

(1)NDKのサブユニット構造。MxNDKでは、AB二量体とCD二量体で図のような四量体を形成している。(2)MxNDKの結晶構造をもとに組み立てたHaNDKの四量体仮想モデル。四量体構造の接着中心部分に各サブユニットのC末端領域が集中している。(3)中心部の拡大図。白丸は、134番目のGlu残基を示している。(4)HaNDK二量体モデルで、白丸はC末端領域の134、135番目のGlu残基を示し、この酸性アミノ酸が好塩性を支配している。

由来四量体NDK (MxNDK) の結晶構造を参考にしてその重要な領域を130~137番残基配列に絞り込んだ。この配列はHaNDKにおいてはAYFFEESE, PaNDKではAYFFAATEであり、下線を付けた134、135番残基が特徴的に異なっていた。そこでHaNDKのEをAに、逆にPaNDKのAをEに変えた変異型NDKを作成したところ、E134A HaNDKは四量体に、A134E PaNDKは二量体に変換された。135番残基の変異は影響がなかった。四量体構造中では134番残基どうしが極めて近接した位置にあると考えられ、ここがグルタミン酸残基であると立体障害 (Gluの側鎖と向かいのサブユニットの主鎖がぶつかる) とさらにマイナス荷電の反発で安定した四量体構造がとれないと推測された (図2-2, 3)<sup>12)</sup>。

## 7. 非好塩性酵素 PaNDK への「好塩性」の付与と構造可逆性の向上

好塩性酵素の指標は、(i)酵素活性や酵素の安定性が塩の添加によって向上すること、(ii)変性からの可逆的な巻き戻り効率が高いこと、そして、(iii)SDS-ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) でのバンドの移動度が本来の分子量から予想される位置より異常に遅れる (見掛け上、大きな分子量にみえる) ことである。上記の変異型NDKのサブユニット構造を調べている過程で、筆者らは変異を導入することによってSDS-PAGE上での移動度が大きく変化することに気付いた<sup>13)</sup>。PaNDK野生型の134/135番残基をAからEに変えると「好塩性」の指標である移動度の減少が認められ、PaNDK<sup>EE</sup>ではほぼHaNDK野生型に匹敵する異常に遅い移動度を示した。HaNDKのEをAに変換してゆくとちょうど逆の現象が見られ、好塩性の消失が予想され

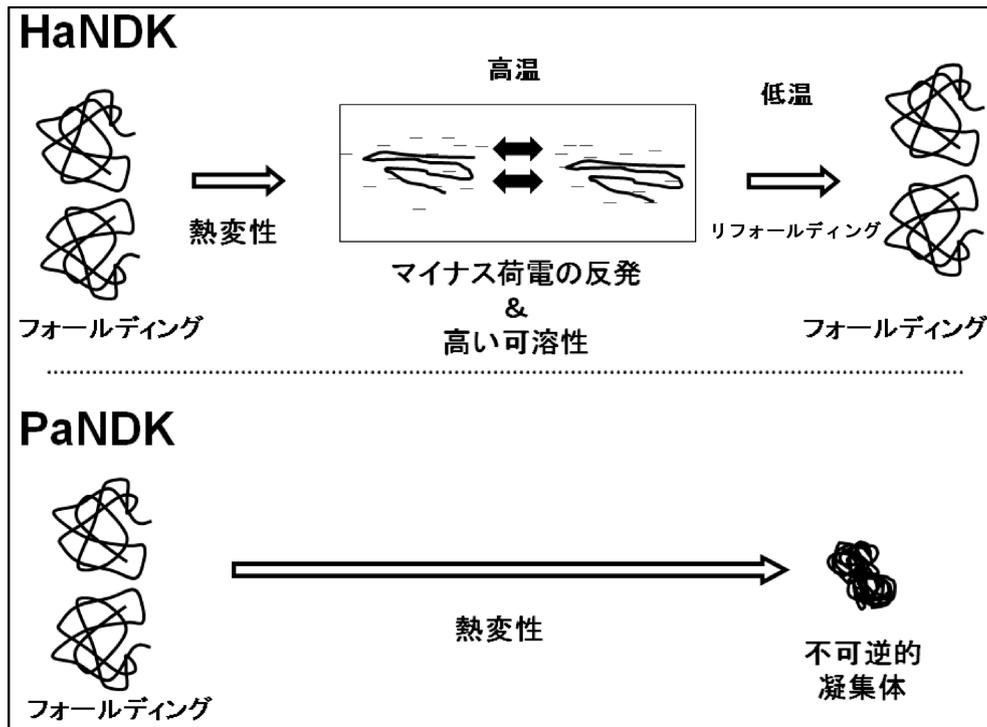


図3 好塩性酵素の可逆的構造巻き戻りモデル

た。そこで PaNDK<sub>KEE</sub> と HaNDK<sub>KAA</sub> の両変異型について、他の好塩性の指標を調べたところ、PaNDK<sub>KEE</sub> に関しては、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率の上昇などすべての指標で好塩性が付与されていた。HaNDK<sub>KAA</sub> は、逆に至適塩濃度、安定性に対する塩の添加効果とも好塩性を失っていた。ただ巻き戻り効率は、依然として高い効率を示して測定範囲内では変化を検出できなかった。HaNDK<sub>KAA</sub> の等電点は 4.70、PaNDK<sub>KEE</sub> の等電点は 5.01 と計算される。構造可逆性は、他の好塩性の指標に比べて総荷電の偏り（等電点の低さ）により強く依存しているものと思われる。一方、PaNDK<sub>KEE</sub> は、HaNDK<sub>KAA</sub> よりも高い等電点を持つにもかかわらず、活性・安定性・移動度の三つの指標でより高い好塩性を示したことは、もちろんマイナスの総荷電が「好塩性」に大きな役割を果たしていることは間違いないが、さらに特定の位置のマイナス荷電が重要であるということを示唆している（図2-4）<sup>13)</sup>。上記の結果は、通常酵素 PaNDK に「好塩性」を付与できたことを示している。好塩性菌の知恵に学び、産業的に有用な酵素の開発（好塩性酵素工学）を進めたい。

#### 謝辞

国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一先生、東京工業大学 有坂文雄先生、大阪府立大学 深田はるみ先生、原子力研究機構 新井栄揮先生、玉田太郎先生、黒木良太先生、並びにソルトサイエンス研究財団に感謝申し上げます。

- 1) Ventosa, A., Nieto, J.J., & Oren, A. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 504-544.
- 2) Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000) *Extremophiles*, **4**, 91-98.
- 3) Irimia, A., Ebel, C., Madern, D., Richard, S.B., Cosenza, L.W., Zaccai, G., & Vellieux, F.M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **326**, 859-873.
- 4) Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T., & Dutta, C. (2008) *Genome Biol.*, **9**, R70.
- 5) Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M., & Nishikawa, K. (2003) *J. Mol. Biol.*, **327**, 347-357.
- 6) Ishibashi, M., Tokunaga, H., Hiratsuka, K., Yonezawa, Y., Tsurumaru, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2001) *FEBS Lett.*, **493**, 134-138.
- 7) Ishibashi, M., Sakashita, K., Tokunaga, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2003) *J. Pro. Chem.*, **22**, 345-351.
- 8) Besir, H., Zeth, K., Bracher, A., Heider, U., Ishibashi, M., Tokunaga, M., & Oesterhelt, D. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6595-6600.

- 9) Ishibashi, M., Tatsuda, S., Izutsu, K., Kumeda, K., Arakawa, K., & Tokunaga, M. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 4073–4079.
- 10) Yonezawa, Y., Izutsu, K., Tokunaga, H., Maeda, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2007) *FEMS Microbiol. Lett.*, **268**, 52–58.
- 11) Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2004) *FEBS Lett.*, **558**, 7–12.
- 12) Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arisaka, F., Arai, S., Kuroki, R., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 1049–1054.
- 13) Tokunaga, H., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2008) *Protein Sci.*, **17**, 1603–1610.

徳永 正雄<sup>1</sup>, 徳永 廣子<sup>1</sup>, 石橋 松二郎<sup>1</sup>, 荒川 力<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿児島大学農学部生物資源化学科  
応用分子微生物学研究室;  
<sup>2</sup>アライアンス プロテイン ラボラトリーズ)

Halophilic enzymes: negative charges determine halophilicity

Masao Tokunaga<sup>1</sup>, Hiroko Tokunaga<sup>1</sup>, Matsujiro Ishibashi<sup>1</sup> and Tsutomu Arakawa<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan; <sup>2</sup>Alliance Protein Laboratories)