

令和元年5月23日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07677

研究課題名(和文)食塩によって構造変化する耐塩性グルタミナーゼの耐塩化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of salt-tolerant mechanism of glutaminase which alters its partial conformation by addition of NaCl

研究代表者

吉宗 一晃 (YOSHIMUNE, Kazuaki)

日本大学・生産工学部・教授

研究者番号：50325700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：耐塩性グルタミナーゼは4.3 M NaCl添加によって活性中心近傍の構造が変化する。一方、この相同酵素である食塩感受性グルタミナーゼはNaCl添加によって構造変化しない。この構造変化と耐塩化機構の関係を明らかにするために、構造変化する領域に部位特異的変異を導入した。この変異型酵素は耐塩性が低下していたことから、この構造変化と耐塩化機構の相関を示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素は室温で作用する副産物の少ない触媒であり、食品工業やファインケミカル業界で用いられている。一般的に酵素は高濃度の塩存在下で活性を失うため、食品に含まれる食塩や生産効率を上げるために高濃度に添加した基質によって活性を失ってしまう。このため一般的な酵素に高濃度の塩環境でも活性を失わない耐塩性を付与する技術は、酵素の新しい可能性を広げることが期待される。酵素の新しい耐塩化機構を提案する本研究の成果は酵素に耐塩性を付与する技術の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Salt-tolerant glutaminase, which shows high activity even in the presence of 4.3 M NaCl, alters its conformation in response to salt concentration. On the contrary, salt-labile glutaminase which is inhibited in the presence of 1 M NaCl, does not change its conformation upon the addition of NaCl. Though their salt-tolerance differs, they share similar structure with superposition RMSD value 1.5 Å. To reveal salt-tolerant mechanism of the salt-tolerant glutaminase, amino acid residue of the loop which alters its conformation of salt-tolerant glutaminase was substituted by site-directed mutagenesis. The mutant glutaminase showed decreased salt-tolerance. This fact suggests that the conformational change contribute the salt-tolerance of salt-tolerant glutaminase.

研究分野：酵素工学

キーワード：耐塩性酵素 グルタミナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Micrococcus luteus K-3 株由来グルタミナーゼ (Mglu) は 4M NaCl 存在下でも NaCl 非存在下での活性と同等の活性を示す耐塩性グルタミナーゼである。一般的な酵素は高濃度食塩存在下で失活する。例えば *Bacillus subtilis* 由来グルタミナーゼ (Bglu) は Mglu とアミノ酸レベルで約 36% の相同性を有し、Mglu と同様の活性中心アミノ酸残基を持つが、1M NaCl 存在下でほとんどの活性を失う。高度好塩菌は菌体内部にも高濃度の塩が存在するため、それらが持つ酵素はほとんど好塩性酵素である。好塩性酵素は高濃度食塩存在下で高い活性を有するが、食塩非存在下で失活するものが多い。多くの好塩性酵素はその表面に酸性アミノ酸を多く持つことから、これらの負電荷によって三次元構造および四次元構造を維持していることが予想されている。耐塩性酵素は好塩性酵素とは異なり低濃度の塩存在下でも活性を有する酵素で、偶然に発見されることも多いが、近年報告数が増えている。耐塩性酵素の立体構造が数例報告されており、その食塩感受性ホモログの表面アミノ酸残基組成と比較して酸性アミノ酸残基が多いという特徴が見られない。このことから耐塩性酵素は好塩性酵素の様な表面アミノ酸残基組成を変化させる戦略とは異なる高濃度食塩環境適応機構を持つ可能性もある。耐塩性酵素のこの様な耐塩性酵素を研究する上で、Mglu はトリスによって耐塩性が向上するため同一分子で食塩による影響を比較できること、比較的結晶化しやすいこと、酵素反応が比較的単純な加水分解反応であるという耐塩性酵素の研究に適した性質を持っている。

2. 研究の目的

これまでに耐塩性酵素 Mglu 及び塩感受性酵素 Bglu の結晶構造を 4M NaCl 存在下及び非存在下で明らかにしたところ、Bglu の立体構造は NaCl の有無でほとんど変化がなかった。一方で Mglu は NaCl 添加によって、Salt-loop と名付けた活性中心残基を含む 242 から 248 番目のアミノ酸残基からなる領域の構造が大きく構造変化することが分かった。これらの結果から、耐塩性獲得に必要な特徴は NaCl 濃度に応じた構造変化であることが考えられた。本研究では耐塩性酵素 Mglu および塩感受性酵素 Bglu に注目し、その耐塩化機構および食塩による阻害機構について考察する。

3. 研究の方法

Mglu の salt-loop は 4M NaCl 添加によって構造変化するが、この構造変化と Mglu の耐塩性との相関関係を明らかにするために以下に示す実験を行う。様々な NaCl 濃度で結晶構造解析を行うことで、構造変化が起こる NaCl の最低濃度を明らかにする。この結果と各 NaCl 濃度における動力学的パラメータ等の生化学的データを比較することで構造と耐塩性の相関を明らかにする。部位特異的変異の導入によりこの構造変化を起こさないもしくは耐塩性が変化した変異型 Mglu を作成し、その構造と機能の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 構造変化する NaCl 濃度の決定

Mglu の 2M NaCl 存在下での結晶を作製し、立体構造解析を行った。分解能が 3.3 Å の回折データしか得られなかったが、その主鎖構造は salt-loop (242 から 248 番目のアミノ酸残基からなる領域) の構造も含め 4 M NaCl 存在下での構造 (塩型) とほぼ同じであった。更に 1 M NaCl 存在下の構造は NaCl 非存在下でのもの (無塩型) とほぼ同じであった (図 1)。NaCl を 1.76 M 添加すると塩型と無塩型の構造の存在割合が 1:1 となる電子密度が得られた。このことから

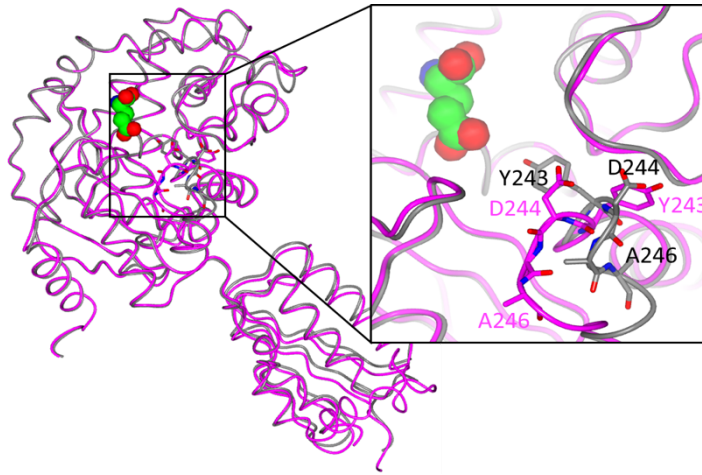


図 1. Mglu は NaCl 添加によって活性中心残基 (Y243) を含む Salt-loop が構造変化する。生成物グルタミン酸は球状で、塩型構造をマゼンタ、無塩型構造を灰色で示す。

Mglu は 1.76 M NaCl 添加で構造変化するものの割合が高いことが明らかとなった。この NaCl 添加による Mglu の構造変化にもかかわらず、Mglu の動力学的パラメータは大きく変化しない。また構造変化する Salt-loop に含まれる活性中心残基 Y243 をフェニルアラニンに置換した Y243F に活性が認められない。しかしながら塩型構造において、Y243 は活性中心とは大きく離れた場所に位置する。これらのことから、塩型の構造は Mglu が活性を示す時の構造では無いことが考えられる。構造変化そのものより、構造変化のしやすさが、その耐塩化機構に貢献している可能性がある。

(2) 構造変化しない変異酵素の作製

Mglu の Salt-loop を構成するアミノ酸残基を部位特異的変異の導入により置換した変異酵素を複数作製した。この中で、244 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異酵素 D244A の耐塩性が低下した。この変異酵素の NaCl 添加による構造変化を明らかにするために現在はこの変異酵素の 4.3 M NaCl 存在下での結晶を作成し、その変異導入が構造変化に与える影響を調べている。

(3) リン酸緩衝液による耐塩性への影響

Mglu は緩衝液であるトリス存在下で高濃度 NaCl 存在下での活性が上昇する。一方で、リン酸緩衝液中で耐塩性が著しく低下する。Mglu の Salt-loop に部位特異的変異を導入した変異酵素の中で、246 番目のアラニン残基をセリン残基に置換した変異酵素 A246S はリン酸緩衝液中において野生型の場合と比較して相対的に高い耐塩性を持つことが分かった。このことから、リン酸イオンによる耐塩性の低下は、リン酸イオンによる Salt-loop の構造変化への影響に依存する可能性も考えられる。これらを明らかにするためにリン酸緩衝液中の野生型 Mglu および、リン酸緩衝液中で耐塩性が低下しない変異酵素の立体構造解析を進めている。

(4) 不可逆的阻害剤 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) の阻害に対するリン酸イオンの影響

Mglu の耐塩性に対するリン酸緩衝液の影響を調査する中で、リン酸緩衝液中でグルタミンナーゼの不可逆的阻害剤である DON が Mglu を阻害しないことを発見した。トリス緩衝液中において DON は Mglu を阻害することから、リン酸緩衝液が Mglu の活性中心構造を変化させていることが考えられる。リン酸緩衝液は Mglu の耐塩性を低下させることから、DON による阻害を指標にして、構造変化と耐塩性との関係を明らかにできる可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計2件）

- ① 大橋颯斗, 吉宗一晃、耐塩性グルタミナーゼの NaCl 添加による構造変化、日本生物高分子学会 2018 年度大会（2018）
- ② 大橋颯斗, 吉宗一晃、*Micrococcus luteus* K-3 株由来耐塩性グルタミナーゼに対するリン酸イオンの影響、酵素補酵素研究会 2018（2018）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

無し

(2) 研究協者

研究協力者氏名：後藤 勝

ローマ字氏名：GOTO masaru

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。