

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580372

研究課題名(和文) 超安定化・変性ストレス耐性酵素への道—通常酵素の好塩性化と高機能化細胞への具体策

研究課題名(英文) Distinct way to prepare the hyper-stable and stress-tolerant enzymes --halophilic enzyme engineering and hyper-functional cell production

研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA MASAO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20112782

研究成果の概要(和文)：好塩性細菌が生産する好塩性酵素は、酸性アミノ酸に富み、net charge がマイナス荷電に偏っており(等電点が低い酸性タンパク質)、この性質が高い可溶性と、変性しても凝集しないで巻き戻る高い構造可逆性を保証している。通常生物由来酵素に酸性アミノ酸の導入、もしくは好塩性蛋白質と融合蛋白質をすることによって、好塩性を付与し、高い可溶性を持たせ、安定性を高めた蛋白質の分子育種に成功した。

研究成果の概要(英文)：The amino acid composition of halophilic enzymes is in general characterized by an abundant content of acidic amino acid leading to high aqueous solubility without aggregation in both native and denatured states and hence allowing efficient renaturation of halophilic proteins after heat or denaturant treatment. The replacement of neutral or basic amino acid residues in non-halophilic proteins with acidic amino acid residues converted non-halophilic to halophilic proteins which show higher aqueous solubility and stability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：蛋白質・糖鎖工学、極限環境微生物、蛋白質発現、高機能化

**1. 研究開始当初の背景**

通常生物がとも生きてゆけない特殊な環境で生息できる「極限環境生物」は、厳しい環境で生き抜く「極限能力」を持っている。高い塩分濃度を好む好塩菌は、味噌・醤油の

醸造・塩蔵食品加工など食品産業において重要であり、塩湖など自然界にも広く分布し、人の生活に比較的「身近な極限環境微生物」である。

中度好塩菌(主に真正細菌)は、0.2M～飽

和塩濃度という極めて広範囲の塩濃度に適応して生育する。一般的に細胞内塩濃度は高度好塩菌ほどは高くなく、浸透圧は「ケミカル・シャペロン」として機能する「適合溶質」で調整している。この菌の分泌型酵素は、外界の塩濃度に対応して、低濃度～高濃度の幅広い塩存在下で良く働き、安定性に塩を要求しないものが多く産業的利用には最適である。好塩性酵素は、アミノ酸組成に明快な特徴がある。それは、酸性アミノ酸に富み、net charge がマイナス荷電に偏っている（等電点が低い酸性タンパク質）ことで、この性質が高い可溶性と、変性しても凝集しないで巻き戻す高い構造可逆性を保証している。例えば、 $\beta$ -ラクタマーゼ(BLA)は、臨床的に重要な酵素で200種類以上の酵素の報告があるが、熱処理には強くなく、70°C程度の熱処理ですべて不可逆的に失活する。しかし、我々が中度好塩菌から分離したBLA (HaBLA)は、驚いたことに、煮沸しても温度を戻せば直ちに可逆的にまき戻す「超可溶性・超可逆性」を示した。すでに多くの研究や利用が進んでいる「好熱性酵素」は高い温度では良く働くが、通常温度ではほとんど働かない。好塩性酵素は、至適反応温度は通常酵素と同程度であるが、熱処理、変性剤などの変性作用に対して「高い可逆性・高い変性耐性」を示す。好塩性酵素が持つこれらの性質は産業酵素に極めて有利な性質であり、好塩性酵素の産業的利用と通常酵素の「好塩性化」は重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は通常酵素に以下の3. 研究の方法で述べる方法で好塩性を付与し、新規に「超可溶性・超可逆性・超安定化酵素」を育種することである。

## 3. 研究の方法

①通常酵素に酸性アミノ酸を導入（置換もしくは付加）することにより「好塩性」を付与し、より「変性耐性」の高機能化酵素を育種する。また、②通常酵素と好塩性酵素を融合蛋白質として連結して発現させる。

## 4. 研究成果

### 4-1. 非好塩性ヌクレオシド三リン酸キナーゼへの「好塩性の付与」

好塩性酵素の指標は次の3点である：(1)より高い至適塩濃度を持つ、(2)より高い可溶性と構造可逆性（変性からの巻き戻り）を持つ、そして(3)SDS-PAGE上における真の分子量よりも「遅い異常な移動度(真の分子量より大きく見える)」である。

ヌクレオシド三リン酸キナーゼ（以下NDKと略す）はヌクレオシド三リン酸ガンマ位リン酸基をヌクレオシド二リン酸へ転移する働きをする酵素である。ヌクレオシド三リン酸の細胞内プールを制御するという重要な働きを持つだけでなく、細胞増殖、分化、G蛋白質を介した情報伝達、がん転移抑制、DNA修復など広い機能を有した多機能蛋白質として知られるようになってきている。また動物、植物、微生物にわたり広く見出され、そのアミノ酸配列一次構造はよく保存されている。

好塩性蛋白質は酸性アミノ酸残基を多く含むが故にSDS-PAGE上で本来の分子量から期待される位置より遅れて泳動される。中度好塩菌*Halomonas*由来の好塩性蛋白HaNDKは非好塩性菌*Pseudomonas*由来の非好塩性蛋白PaNDKに比べて泳動位置が異常に遅れる。野生型HaNDK, PaNDKの133, 134番目残基に変異を導入してゆくとSDS-PAGE上の位置がそれに伴い大きく動くことがわかる。これら変異体のうちHaNDK, PaNDKそれぞれの133, 134番目残基とも相手方のそれらと置き換えた場合、つまりHaAA, PaEE変異体ではそれぞれPaNDK, HaNDK野生株に匹敵する移動度を示した。このことは、変異体

HaAA は「好塩性」を失い、PaEE 変異体は逆に「好塩性」を獲得しているのではないかと予想された。HaNDK は希薄蛋白濃度溶液では不安定であるが、塩が存在すると安定性が向上する。野生型 PaNDK は塩がある・なしにかかわらず安定性に変化はないが、PaEE 変異体では安定性に対する塩の添加効果が出現した。一方 HaAA 変異体はこの塩添加効果を消失していた。また至適反応塩濃度に関しても PaEE 変異体は 50mM NaCl 存在下で最大活性を示し HaNDK 野生型と同じようなパターンとなった。HaNDK は 85°C、5 分の熱処理後でも約 80%以上の酵素活性を示す。これは熱変性後の蛋白巻き戻り活性であり、好塩性蛋白質が示す興味ある性質の一つである。この巻き戻り活性が蛋白濃度に依存せずに PaEE 変異体でもみられるようになった(図 1)。以上のように、非好塩性の PaNDK に酸性アミノ酸 2 残基を導入することによって、好塩性を付与することに成功し、その結果、不可逆的に熱変性していた酵素を、可逆的に巻き戻りより高機能性の酵素に分子育種することに成功した。

#### 4-2. キメラ型ヌクレオチド二リン酸キナーゼの塩基性アミノ酸を減少させることによる酸性化法を用いた「好塩性の付与」

通常細菌由来のヌクレオチド二リン酸キナーゼ (PaNDK) と好塩性のヌクレオチド二リン酸キナーゼ (HaNDK) のアミノ酸配列を比較して PaNDK の塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に部位指定変異で変換することにより、好塩性が付与できるか、すなわち、変性後のより高い巻き戻り (活性回復) 効率が付与できるかを検討した。この実験を実施するにあたり、より微細な変化の検出を可能にするために、N 末端からの半分が PaNDK で、C 末端側半分が HaNDK である PaHa キメラ NDK をまず構築した。このキメラタンパク質の二つの塩基性アミノ酸残基に注目し、中性アミノ酸や酸性アミノ酸に変換して変性後の巻き戻り

効率を測定した。その結果、図 2 に示したように、巻き戻り効率は、野生型 (WT) の 5.9% から、酸性アミノ酸が増加するにつれて明らかに増加し、塩基性アミノ酸 2 個を酸性アミノ酸 2 個に置き換えものでは、74%に達し、巻き戻り効率が 12 倍以上向上するという良好な結果を得た。これら変異体の比活性は、野生型とほとんど同様に増加するものも認められた。

#### 4-3. 融合蛋白質法による有用蛋白質の可溶性発現

好塩性蛋白質と融合蛋白質を作らせることにより、封入体を形成しやすい有用異種蛋白質を生物活性のある可溶性の形で発現精製することに成功した(図 3)。大腸菌発現では封入体を形成するヒトインターロイキン 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) を好塩性 HaBLA と融合蛋白質を形成させ発現させたところ、完全に可溶性画分に発現した(図 4)。スロンピンで HaBLA を切り離したのちに IL1 $\alpha$  の生物活性を測定したところヒト由来のものと同じ比活性を示した(図 5)。また、大腸菌では分解してしまうペプチド性のヒト・ディフェンシンを同様な方法で活性のある状態で発現させることに成功した。同様に大腸菌における直接発現では完全に不溶性の封入体を形成するヒト脳由来セリンラセマーゼも好塩性 HaBLA と融合蛋白質として発現させることによって可溶性に発現させることができた。その他、いくつかの異種有用蛋白質の可溶性発現に成功しており、好塩性 HaBLA 融合蛋白質発現法の有用性が明らかになった。さらに HaBLA に代わる好塩性の融合蛋白質パートナー蛋白質候補を検索した。その結果、有望と考えられる 3 種類について、予備的な結果であるが、良好な結果を得ることができた。今後は、新しい発現ベクターの開発につながるものと期待できる。

さらに今後期待できる方法として、融合蛋白質に用いるパートナー蛋白質において、その高次構造解析を行なうことによって機能的・構造的ドメイン構造を明らかにし、パートナー蛋白質全体を用いるのではなく、特に、高い可溶性、高い構造可逆性に貢献していると思われるドメインを特定し、このドメインをパートナーとして融合蛋白質を発現させるという手法を進展させたいと思っている。パートナー蛋白質は、よりコンパクトであるほど、高い発現効率が期待できると考えている。3年間に渡った本研究では、主な実験は *in vitro* の蛋白質レベルの実験が多く、最終目標としている細胞内により高機能化した蛋白質を発現させ、「より高機能化した細胞」を育種するという研究は、その緒についたばかりで、大きな成果を得るところまでは至っていない。ただし、融合蛋白質法で安定化したルシフェラーゼに関しては、細胞内での不安定性をカバーできることを示唆するものも得られているので、この辺りを突破口にして、細胞内での反応の可視化をより効率的に行える「高機能化細胞」の育種につなげたいと思っている。

(図は、最終頁(5頁)に示します。)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1) Halophilic beta-lactamase as a new solubility- and folding-enhancing tag protein: production of native human interleukin 1alpha and human neutrophil alpha-defensin. Tokunaga H, Saito S, Sakai K, Yamaguchi R, Katsuyama I, Arakawa T, Onozaki K, Arakawa T, Tokunaga M. Appl Microbiol Biotechnol. 2010, 86(2):649-658. 査読有り

2) Dimer-tetramer assembly of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*

DSM3043: both residues 134 and 146 are critical for the tetrameric assembly. H. Tokunaga, K. Izutsu, S. Arai, Y. Yonezawa, R. Kuroki, T. Arakawa, and M. Tokunaga. Enz. Microbiol Technol. 2010, 46, 129-135. 査読有り

3) Engineering of halophilic enzymes: two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. Tokunaga, H., Arakawa, T., Tokunaga, M. Protein Sciences 2008, 17, 1603-1610. 査読有り

[学会発表] (計7件)

1) 2010 日本農芸化学会大会  
2010年3月29日(東京)  
好塩性β-ラクタマーゼを可溶性タグとした融合蛋白質発現系の開発: 山口 類、徳永廣子、齋藤尚子、逆井一樹、勝山巖、荒川友博、小野崎 菊夫、荒川力、徳永正雄

2) 2010 日本農芸化学会大会  
2010年3月28日(東京)  
高度好塩菌由来 nucleoside diphosphate kinase 変異体 G114R の解析: 石橋松二郎、岩佐達也、徳永正雄

3) 2009年 日本農芸化学会大会  
2009年3月28日(福岡)  
好塩性付与蛋白質の分子育種: 徳永 廣子、荒川 力、山口 類、徳永 正雄

[その他]

ホームページ等  
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  
<http://chem.agri.kagoshima-u.ac.jp/Oyos-eika/oubi/HP060703/top-040621.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳永 正雄 (TOKUNAGA MASAO)  
鹿児島大学・農学部・教授  
研究者番号: 20112782

### (2) 研究分担者

石橋 松二郎 (ISHIBASHI MATSUJIRO)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 20305163

徳永 廣子 (TOKUNAGA HIROKO)  
鹿児島大学・農学部・技能補佐員  
研究者番号: 60381191

以下、研究成果の項の図を示します。

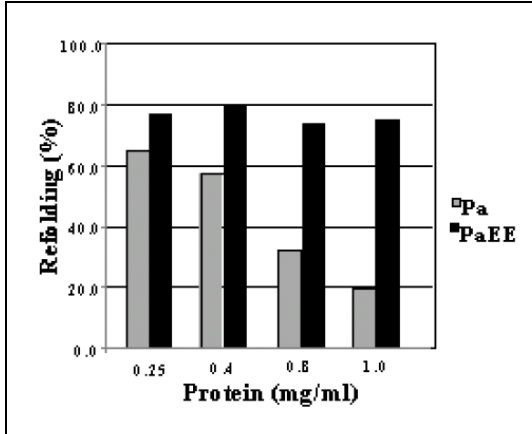


図1 PaNDK と PaEE 変異体の巻き戻り効率比較。PaEE は、すべての蛋白濃度で高い巻き戻り効率を示した。

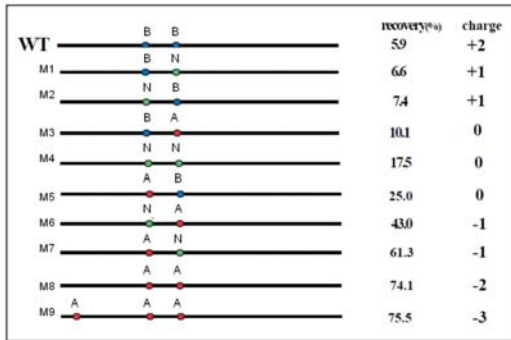


図2 塩基性アミノ酸を中性・酸性アミノ酸に変換した好塩性の付与。B:塩基性、N:中性、A:酸性の各アミノ酸残基を表している。

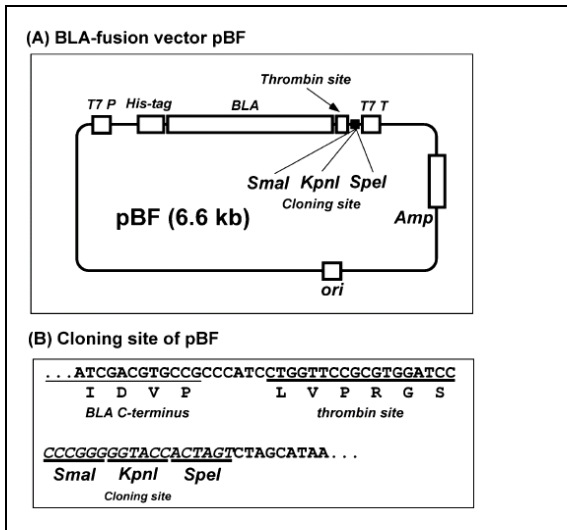


図3 好塩性 BLA との融合蛋白質発現ベク

ター。ベクターの全体構造 (A) と標的遺伝子を挿入するマルチクローニングサイトの構造 (B)。

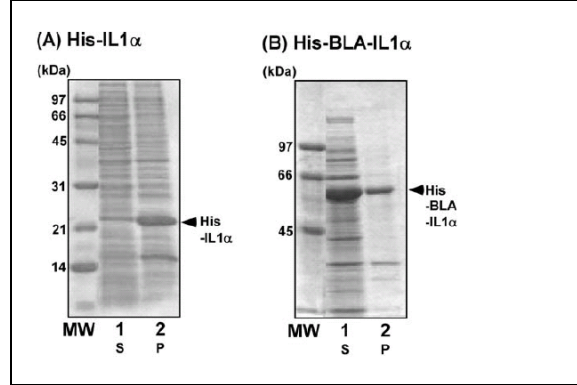


図4 IL1αの直接発現 (A) と BLA 融合蛋白としての可溶性発現 (B)。S:可溶性画分、P:不溶性画分。融合蛋白はそのほとんどが可溶性画分に発現している。

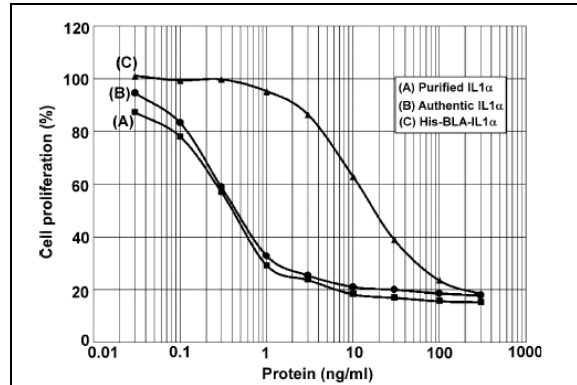


図5 IL1αの生理活性測定結果。

今回の精製標品 (A) は、標準品 (B) と同等の活性を示している。スロンビンで切断していない融合蛋白の生理活性 (C) は、標準品より低く、HaBLA は可溶性・構造形成を助けるが、この例では生理活性を低下させている。この活性測定法は、IL1αに感受性を示す細胞の生育を指標にしているので、BLA 部分が細胞表面の受容体との相互作用の立体障害になっているなどの理由が考えられる。