

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07870

研究課題名(和文) 海洋好圧好冷菌の新奇な好圧性リパーゼとその圧力特性をもたらす構造の解析

研究課題名(英文) Structural feature of novel piezophilic lipases from marine piezophilic psychrophile

研究代表者

石田 真巳 (Ishida, Masami)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：80223006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋中層の細菌がもつ酵素の圧力特性を明らかにするため、Moritella sp. F1株とF3株が生産するリパーゼLip-IとLip-IIを調べた。これらのリパーゼは、耐圧性を示し、既知リパーゼと異なる新奇な構造をもっていた。Lip-IとLip-IIの遺伝子はゲノム上で隣接して存在し、他の海洋細菌にも類似の遺伝子対が存在し、両酵素が連携して働く新たな作用が示唆された。また、中層由来Vibrio sp. Pr21がもつPRプロテアーゼを調べ、高い好圧性を示すことが分かった。PRプロテアーゼと変異酵素との比較から、水素結合が高圧・低温での活性に影響すると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋中層(深度200～1,000 m)は何千mもの深海より試料採取が容易だが、微生物や酵素の資源としての価値が不明確だったので、中層由来微生物とその酵素を標的とした。リパーゼは産業的な利用価値があり、現在も新たな酵素が探索される。本研究では、中層細菌から発見した従来の報告が全くない2種の新奇リパーゼを主な研究対象とした。遺伝子解析から2種のリパーゼが対になって働く新たな機能が示唆された。酵素の高圧適応機構の報告は非常に少ないので、中層細菌のリパーゼとプロテアーゼで構造と圧力特性の解析を目指し、プロテアーゼで、高圧下の柔軟性によって好圧性に影響する水素結合の役割を示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the high-pressure characteristics of enzymes from marine bacteria inhabit intermediate water of deep sea, we determined the structure and properties of the novel lipases Lip-I and Lip-II from Moritella sp. strains F1 and F3. The lipases showed high-pressure resistance, and they had novel structures different from those of known lipases. The genes of Lip-I and Lip-II were present adjacently on the genomes of the strains F1 and F3, as well as similar gene pairs were on genomes of other marine bacteria, suggesting a new action in cooperation of both enzymes. Secondly, we determined the structure and properties of the PR protease from Vibrio sp. strain Pr21. The protease showed highly piezophilic activity. Based on comparison between PR protease and a mutant enzyme, the hydrogen bond might affect in the increased activity under high-pressure and low-temperature conditions.

研究分野：海洋生化学

キーワード：高圧適応 リパーゼ プロテアーゼ 海洋中層 未知遺伝子 遺伝子対 水素結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 海洋中層 (深度 200 m ~ 1,000 m) の細菌と酵素

極海、寒海、深海などの低温環境に適応した好冷菌・低温菌がつくる酵素は一般に低温高活性である。常圧環境である海洋表層の好冷菌・低温菌の酵素は、低温適応構造が精力的に研究され、利用も期待されている (Feller 総説 (2013) *Scientifica* 2013, 1-28; Mitsuya et al. (2014) *J. Biochem.* 155, 73-82)。一方、高圧環境である、深度 5,000 m ~ 11,000 m の深海に生息する好冷菌では、数種酵素で圧力特性や耐圧機構が報告 (加藤 総説 (2009) *生化学* 81, 1094-1100; Hamajima et al. (2016) *Extremophiles* 20, 177-186) されているが、酵素の好圧性をもたらす構造は未知である。さらに、海洋中層 (深度 200 m ~ 1,000 m) の好冷菌・低温菌の酵素については、圧力特性や高圧適応機構の報告はほとんどない。なお、海洋中層、深層、深海などの区分は学問分野などによって異なり、本研究課題では深度 200 m ~ 1,000 m の領域を海洋中層とする。

### (2) リパーゼなどの高圧適応酵素の有用性

一般に、生体高分子やエステルの分解酵素には有用酵素となる可能性がある。その中で脂質分解酵素リパーゼは、多様なエステル合成活性などの産業有用性から探索が続けられているが、好圧性リパーゼの報告はほとんどない。好圧性リパーゼは活性の圧力制御ができるので工業的にも魅力がある。申請者が海洋中層から発見した好冷菌 *Moritella* sp. F1 株と F3 株が生産する 2 種のリパーゼ Lip-I と Lip-II は、従来の報告がない新奇リパーゼの可能性があった。Lip-II については、F1 株由来酵素は好圧性を示し、F3 株由来酵素は好圧性を示さなかったため、構造比較から好圧性の分子機構を解析する好材料と考え、本研究課題開始時の主な研究材料とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 海洋中層細菌がもつリパーゼの高圧適応構造の解明

海洋中層の好冷菌 *Moritella* sp. F1 株と F3 株が生産する 2 種のリパーゼ Lip-I および Lip-II の立体構造解明を第一の目的とした。組換え体による酵素の高効率生産を具体的な目的とした。

### (2) Lip-I、Lip-II の遺伝子構造の解明

F1 株と F3 株の全ゲノム配列を決定し、新奇リパーゼと予想された Lip-I、Lip-II の特徴を遺伝子構造から明らかにすることを第二の目的とした。

### (3) 海洋中層細菌がもつプロテアーゼの圧力特性の解明

海洋中層の低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 株が生産する PR プロテアーゼ (Ishida et al. 2016 *Fish. Sci.* 82, 675-683) の圧力特性、高圧適応構造を解明することを第三の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *Moritella* sp. F1 株の Lip-II、Lip-I 遺伝子のクローニング

本研究課題開始時に、F1 株の Lip-II 遺伝子が pLEAD5 にクローニング (pLEAD5-F1-*lipII*) されていた。pLEAD5-F1-*lipII* の Lip-II 遺伝子を、シグナルペプチドを除去して pET28a にクローニングし、pET28a-F1-*lipII* を作成した。F1 株のゲノム DNA は、F1 株を BPG 培地で 11、24h 培養し、ISOPLANT II (Nippon Gene) で抽出した。Lip-I 遺伝子は、研究成果(2) に示した全ゲノム配列の情報を基に pET28a にクローニングし、pET28a-F1-*lipI* を作成した。

### (2) Lip-I、Lip-II の生産のための組換え大腸菌の培養

F1 株の Lip-II 生産のため、*E. coli* JM109(pLEAD5-F1-*lipII*) と *E. coli* Rosetta2(DE3)(pET28a-

F1-*lipII*)を使用した。JM109株はYT培地 (Bacto tryptone 1.0%, Bacto yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%) に50 µg/mL ApとIPTGを加え、*E. coli* Rosetta2(DE3)は、LB培地 (Bacto tryptone 1.0%, Bacto yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%)に30 µg/mL Km、20 µg/mL Cm、IPTGを加えた。分子シャペロン共発現系 Chaperone Plasmid Set (製品コード: 3340、Takara)のpTf16とpET28a-F1-*lipII*を*E. coli* Rosetta2(DE3)に導入し、*E. coli* BL21 (DE3) (pTf16, pET-28a-F1-*lipII*)を作成した。培地はLB培地+ 30 µg/mL Km + 20 µg/mL Cmを用い、PPI誘導物質アラビノース、Lip-II誘導物質IPTGを加えた。F1株のLip-I生産のためには、*E. coli* BL21 (DE3)にpTf16とpLEAD5-F1-*lipI*を導入した。培地はLB培地+ 30 µg/mL Km + 20 µg/mL Cmを用い、アラビノース、IPTGを加えた。組換え大腸菌細胞を遠心集菌して、100 mM リウム緩衝液 pH 7.5に懸濁し、超音波破碎した。目的タンパク質生産はSDS-PAGEと活性測定にて確認した。

### (3) 組換え大腸菌で生産されたLip-II、Lip-Iの精製と活性測定

5~200 mLの培地で培養した組換え体を超音波破碎後、上清(可溶性)と沈殿(不溶性)に分け、SDS-PAGEと活性測定で調べた後、スケールアップ培養して、Ni-アフィニティーカラムで精製した。得られた目的酵素を透析して、ResourceQカラム(GE Healthcare)で更に精製した。リパーゼ活性測定は、Winkler and Stuckmann (1979, J. Bacteriol. 138, 663-670)の方法を参考に実施した。*p*-nitrophenyl laurate (終濃度 0.1mM)とTritonX-100の溶液50 µL、50mM Tris-HCl (pH 7.5) 940 µL、酵素液10 µLを混合し、Abs 410nmを5分間追跡した。

### (4) 全ゲノム配列解析方法

*Moritella* sp. F1株とF3株をMarine Broth 2216 + 1.5%寒天の固体培地で11、24 h培養し、ISOPLANT IIを用いてDNA抽出を行った。Nextera XT Library Prep KitによってDNA断片を作成し、次世代シーケンサーillumina Myseq (illumina)に供して全ゲノム配列決定を行った。参照配列として*Moritella marina* MP-1 (ATCC 15381)の全ゲノム配列(Kumar and Laura 2012, J. Bacteriol. 19, 6296-6297)を用いた。アノテーションと生体機能解析にはRASTサーバーおよびThe SEED Viewerを用いた。相同性検索にはblastn、blastp、tblastnを用い、遺伝子配列のアライメントにはCLUSTAL WおよびESPrpt3を用いた。

### (5) 組換え大腸菌を用いるPRプロテアーゼおよびQ301P変異酵素の生産と精製

PRプロテアーゼの生産には、*E. coli* JM109(pSD3)を、Q301P変異酵素の生産には*E. coli* JM109(pQ301P)を用いた。YT培地に50 µg/mL Apと1 mM IPTGを添加して25、24 h培養した。遠心集菌後、50 mM リ酸カリウム緩衝液 pH 7.5に懸濁して超音波破碎し、遠心上清中の酵素を、60%飽和硫酸アンモニウム沈殿、透析、TOYOPEARL SuperQ650Mカラム、限外ろ過濃縮、SephacrylS-300 HRカラムの順で精製した。

### (6) RRプロテアーゼの加圧下の活性測定

蛍光合成基質3163-v(ペプチド研究所)を用い、30 で活性を調べた。基質溶液(0.1 M Tris-HCl pH 7.5、0.1 M NaCl、10 mM CaCl<sub>2</sub>、0.05% triton-x、2.5 µM 3163-v) 1.90 mLに酵素液100 µL(50 mM Tris-HCl pH 7.5、タンパク濃度 0.01 mg/mL)を添加し、インナーセル型高圧光学測定セルPCI-400(テラメックス)で加圧して分光蛍光光度計(Ex 328 nm、Em 393 nm)で蛍光強度増加を追跡した。

## 4. 研究成果

### (1) 好冷菌*Moritella* sp. F1株のLip-IおよびLip-IIの組換え大腸菌による生産

### ① 組換え大腸菌による Lip-II の生産

*E. coli* JM109(pLEAD5-F1-*lipII*)では、目的 80kDa バンドが検出できなかった。*E. coli* Rosetta2 (DE3)(pET28a-F1-*lipII*)を 37 °C または 28 °C で培養した結果、沈殿画分のみで大量の 80kDa バンドが認められ、好冷菌の生育温度より高温のために酵素が凝集したと考えられた。温度を 20 °C に下げると 80kDa バンドは沈殿画分と上清画分にほぼ等量認められたが、活性が検出されなかった。15 °C または 11 °C まで下げると、ほぼ全量の 80kDa バンドが上清画分に見られたが、活性は検出されず、低温培養で Lip-I は可溶化するが正しい折り畳みにならないと判断した。次に、PPI 共発現系で条件検討し、培養温度 15 °C、0.5 mg/mL L-arabinose、活性測定に 1 mM ZnCl<sub>2</sub> 添加の条件で、200 mL 培養から約 1 mg の Lip-II を得たが、結晶化には不十分と判断された。

#### 組換え大腸菌による Lip-I の高効率生産

Lip-I も従来の報告のないリパーゼなので、Lip-II 生産で最も成績が良かった PPI 共発現系を利用して生産条件を調べた。*E. coli* BL21 (DE3) (pTf16) (pET-28a-F1-*lipI*)を使用し、0.1% L-arabinose 添加して 37 °C で OD=0.5 まで培養し、0.1 mM IPTG 添加して 20 °C で 24h 培養すると上清画分と沈殿画分にほぼ同量の Lip-I に相当する 43kDa タンパク質が確認された。培養スケールを 5 L にし、His-tag 結合状態で培養体積 1 L 当たり 5.9 mg の Lip-I を得ることができた。His-tag を除去し、一部を ResourceQ カラムで精製し、比活性 0.0106 U/mg の精製 Lip-I が得られた。基質特異性も C14 の脂肪酸エステルを最もよく分解し、F1 株から直接単離した Lip-I と類似していた。本研究課題期間中に立体構造解析まで達成できなかったが、安定に取得できる精製 Lip-I を試料として、次年度、結晶化と立体構造解析を実施する。

## (2) Lip-I および Lip-II の遺伝子構造と分布の解析

### ① *Moritella* sp. F1 株と F3 株の全ゲノム配列

Lip-I、Lip-II の遺伝子構造を解明するため、*Moritella* sp. F1 株と F3 株の全ゲノムのドラフト配列を決定した。得られた両株の全ゲノムドラフト配列は、DDBJ に登録した（現在は、まだ未公開中）。F1 株ゲノムには、4,722 個の coding sequence と 79 個の RNA が含まれており、F3 株ゲノムには、4,664 個の coding sequence と 80 個の RNA が含まれていた。

### ② Lip-I と Lip-II は新奇リパーゼ

両株のゲノム配列上に、Lip-I および Lip-II の遺伝子は各々 1 個、hypothetical protein として存在した。Lip-I と Lip-II のコード領域は、上流側が Lip-I、下流側が Lip-II で同方向に隣接して存在していた（図 1）。周辺の遺伝子の方向が Lip-I・Lip-II とは異なり、Lip-I と Lip-II は同じオペロンの可能性が考えられた。アノテーション結果の Fatty acids, Lipids, and Isoprenoids グループに、Lip-I は hypothetical protein として含まれ、Lip-II は含まれていなかった。さらに、従来の微生物リパーゼ分類の 8 family (Arpigny and Jaeger 1999, Biochemical Society 343, 177-183) との比較で、Lip-I と Lip-II は各 family に共通なモチーフは殆んど検出されなかった。Lip-I には family II リパーゼの catalytic triad の一つである Ser 残基が含まれる GDSL 配列が存在したが、残る二つの Asp 残基と His 残基を含む共通配列は存在しなかった。family I.1、I.2、

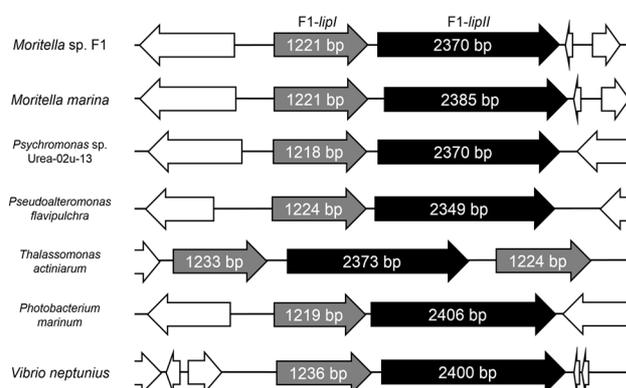


図 1 隣接する Lip-I (灰色) Lip-II (黒) 遺伝子と類似遺伝子の広範な細菌ゲノム上の分布

および III~VII の catalytic triad の Ser 残基が含まれる GX SXG モチーフも検出されなかった。これらの結果、Lip-I と Lip-II は、従来のリパーゼ family にも該当しない新奇リパーゼと判断された。同じオペロンで発現し、互いに連携して働く新たな機能の可能性が示唆される。

#### Lip-I と Lip-II 遺伝子対の分布

Lip-I と Lip-II の類似遺伝子が他種の生物にも存在するか blastp 検索し、両遺伝子とも主に海洋細菌に分布していた。Lip-I、Lip-II との相同性が高い (80%以上) グループは、*Moritella* 属と *Psychromonas* 属に存在し、両遺伝子が同方向に隣接して存在していた (図 1)。これらの菌種は系統も近縁なので、Lip-I と Lip-II と似た立体構造や生理機能をもつと推定された。一方、相同性があまり高くないグループとして、*Pseudoalteromonas* 属、*Thalassomonas* 属、*Photobacterium* 属に存在する相同性 31.0-41.7%のグループ、*Vibrio* 属に存在する相同性 33.1%以下のグループがあった。このグループの類似遺伝子も同方向に隣接して存在していた (図 1)。

#### F1 株と F3 株の脂質分解に影響し得る因子

本研究課題開始時には、F1 株と F3 株の Lip-II の好圧性の違いは、酵素の構造の違いのためと予想したが、全ゲノム解析の結果、Lip-II のアミノ酸配列は両株で一致した。そこでリパーゼ活性に影響し得る他の因子を調べ、脂質誘導培養時に F3 株だけに培養上清が白濁して白色クリーム状浮遊物が現れ、F1 株には現れない違いを発見した。この白濁の原因がバイオサーファクタント (生物界面活性剤) ではないかと推測し、培養上清や白色浮遊物を有機溶媒抽出したところ乳化活性があり、候補の物質が見つかった。従来、*Moritella* 属ではバイオサーファクタントの報告はない。新たな展開として、次年度、この物質の Lip-II 活性に対する影響を調べる。

#### (3) 低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 由来 PR プロテアーゼの圧力特性

海洋中層の低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 は低温高活性なプロテアーゼ (PR プロテアーゼと命名) をつくる。この酵素は組換え大腸菌で生産 (野生型) され、遺伝子ランダム変異によって比活性が 3 倍に向上した高活性変異型 Q301P (Gln301 Pro) も作出されていた。PR プロテアーゼの野生型と Q301P 高活性変異型の圧力特性を調べた結果が図 2 である。両酵素とも加圧に従って活性が増加し、野生型は 250 MPa で常圧時の 7.2 倍、高活性変異型は 200 MPa で常圧時の 3.2 倍の最大活性を示す好圧性酵素であった。両酵素とも 350 MPa でも常圧より高い活性を示し、低温高活性、且つ高压高活性であることが分かった。

野生型では 301 番 Gln 残基と 234 番 Asn 残基の間ある水素結合が、高活性変異型酵素では欠失した。その結果、基質結合ポケットを支えるシート構造が柔軟になって常圧時の比活性が上がったと考えられる。高压下では、高活性変異型酵素の方が シートの柔軟性の増加程度が弱まり、好圧性は野生型酵素より下がる と推定した。

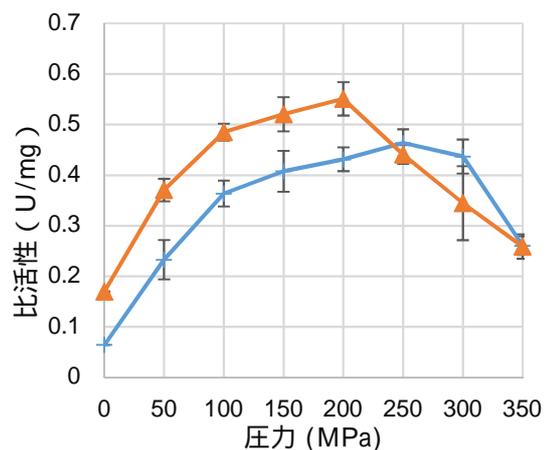


図 2 PR プロテアーゼの野生型 (水色) と高活性変異型 (橙色) の圧力特性

#### (4) まとめ

本研究課題では、海洋中層の細菌がつくる酵素、リパーゼとプロテアーゼを中心に研究し、新奇酵素、高压適応酵素であることを確認することができた。海洋中層は、有用微生物や有用酵素などを探索する価値がある領域と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masahiko Okai, Chiori Onoue, Ryo Tsuda, Chihiro Ishigami, Chie Yoshida-Mishima, Naoto Urano, Chiaki Kato, Masami Ishida	4. 巻 -
2. 論文標題 Q301P mutant of Vibrio PR protease affects activities under low-temperature and high-pressure conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加賀谷慧、岡井公彦、浦野直人、加藤千明、石田真巳
2. 発表標題 海洋好冷菌Moritella sp. F1由来Lip I リパーゼの配列分析とLip I・Lip II 遺伝子対の分布
3. 学会等名 第19回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木暮梨花、清水拓真、岡井公彦、浦野直人、加藤千明、石田真巳
2. 発表標題 Moritella sp. F1好圧性リパーゼとF3非好圧性リパーゼの一次構造と組換え酵素の性質の比較
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水 拓真, 下川 賢大, 岡井 公彦, 浦野 直人, 関口 峻允, 能木 裕一, 加藤 千明, 石田 真巳
2. 発表標題 新規Moritella sp. F1・F3株の同定及びF1株由来好圧性リパーゼ 遺伝子の腸菌での発現
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水 拓真, 岡井 公彦, 浦野 直人, 加藤 千明, 石田 真巳
2. 発表標題 Moritella sp. F1株由来好圧性リパーゼF1-Lip の大腸菌における生産条件の検討
3. 学会等名 第18回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水拓真、木暮梨花、岡井公彦、浦野直人、加藤千明、石田真巳
2. 発表標題 海洋好冷菌 Moritella sp. F1由来好圧性リパーゼF1-LipIIの大腸菌を用いる高効率生産
3. 学会等名 第20回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾上千桜里、石上千尋、岡井公彦、浦野直人、加藤千明、石田真巳
2. 発表標題 海洋低温菌PRプロテアーゼおよびQ301P変異型酵素の推定構造・活性・熱安定性・圧力特性の比較
3. 学会等名 第20回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加賀谷慧、岡井公彦、浦野直人、加藤千明、石田真巳
2. 発表標題 海洋好冷菌Moritella sp. F1由来の新規リパーゼLip I : 組換え大腸菌での高効率生産と基質特異性
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

海洋中層由来の好冷耐圧細菌 *Moritella* sp. F1株およびF3株の全ゲノム配列を決定し、ドラフト全ゲノム配列をDDBJに登録した。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡井 公彦  (Okai Masahiko)  (00596562)	東京海洋大学・学術研究院・助教    (12614)	
連携研究者	加藤 千明  (Kato Chiaki)  (90360750)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・シニアスタッフ    (82706)	