

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20780074
 研究課題名(和文) “環境的要因”が関わる低温活性金属酵素の低温適応機構の解明とその応用
 研究課題名(英文) “Environmental factor” for cold-adaptation of psychrophilic metalloenzyme
 研究代表者
 鶴田 宏樹 (TSURUTA HIROKI)
 神戸大学・連携創造本部・准教授
 研究者番号：20346282

研究成果の概要(和文)：

好冷菌産生酵素の低温での高い活性発現を導く“環境的要因”を明らかとすることを目的として研究を進展させた。その結果として、実験材料とした好冷性海洋細菌 *Shewanella* sp. のフォスファターゼがマグネシウムなどを高濃度を含む環境下でフォールディングすることによって分子表面に高い揺らぎを示す部位を獲得でき、この部位の存在が本酵素の低温での効率よい活性発現に重要であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：

For the construction of structure leading high cold activity of psychrophilic phosphatase, the magnesium concentration during folding of this enzyme protein was an important environmental factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：低温活性酵素、好冷性細菌、低温適応、X線結晶構造解析、触媒反応効率、フォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

低温活性酵素の機能特性を導く構造要因の解明は、極限環境に生育する生物の適応戦略の解明に繋がると考えられることから、国内外においても幾つかのグループにより、低温活性酵素についての研究が進められている。しかし、この種の酵素の低温活性発現機構は十分に理解されていないのが現状である。一般に、低温活性酵素の低温活性発現能は、低温において活性中心近傍部位に高い「柔軟性」が維持されていることが重要であ

ると考えられている。申請者は、これまで、好冷性海洋細菌 *Shewanella* sp. のペリプラズム画分局在性金属酵素である低温活性プロテイン-チロシン-フォスファターゼ (CAPTPase) の「低温活性発現能」を導く「柔軟性」の維持に重要な構造特性の解明を試みた。その成果として、本酵素の触媒部位において、求核基 (-OHイオン) を含む2核金属中心背後に位置する疎水性部位 (Zn-1 部位) の「化学結合力」が本酵素の「柔軟性」の維持に重要であることを見出し、このことが

「低温活性発現能」を導く遺伝的要因であると結論した。

さらに、申請者は *Shewanella* sp. 由来の天然型 CAPTPase はマグネシウム (Mg)、カルシウム (Ca) イオンによって活性化するのに対して、大腸菌を発現誘導して得られた組換え CAPTPase が2個の亜鉛 (Zn) を配位金属として含んでいることを明らかとした。そこで、組換え CAPTPase の配位金属を Mg に置換した金属置換型酵素を作製し、その機能特性を解析したところ、Mg 型酵素は Zn 型酵素よりも、高い低温活性発現能を示した。この事実は、低温活性金属酵素の「低温活性発現能」に、2 核金属中心背後の「化学結合力」だけでなく、「配位金属種」が影響することを示唆するものであった。*Shewanella* sp. が、Mg、Ca を高濃度 (130mM、10mM) に含む海水中で生育する好冷性海洋細菌であることを考えれば、本酵素を含む低温活性金属酵素が「低温活性発現能」を獲得するには、遺伝的要因だけでなく、フォールディングの際に Mg、Ca などの「軽い」金属が取り込まれる機構が関与する「環境的要因」も重要であることが十分予想できた。

2. 研究の目的

低温活性発現能を有する有用酵素の作出は、さまざまな産業分野での物質生産の低コスト化における酵素機能のさらなる活用に繋がる。そこで、本研究課題では、環境要因が関与する低温活性金属酵素の低温活性発現能を導くメカニズムを明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 配位金属置換型 CAPTPase の作製
これまで申請者によって、金属酵素である CAPTPase の配位金属種は遺伝子翻訳後のポリペプチド鎖のフォールディング過程において決定されることが明らかとされている (データ未公表) ことから、大腸菌などで発現・構築させた組換え酵素 (Zn 型酵素) の配位金属の置換は困難であると考えられる。そこで、申請者によって既に構築した変性タンパク質からのリフォールディング系を利用し、配位金属をマグネシウムに置換した Mg 型 CAPTPase (金属置換型酵素) を作製した。再生した Mg 型酵素は種々のカラムクロマトグラフィーを駆使することで分離精製した。

(2) Mg 型酵素の機能解析
作製した金属置換型酵素について、低温活性発現能を含む酵素学的特性を速度論的に解析した。

(3) Mg 型酵素の構造解析

「配位金属種」の相違による Mg 型酵素の触媒部位構造 (金属結合部位周辺構造、金属イオン、求核基) の“揺らぎ”に与える影響を、高分解能結晶構造解析で得られる異方性温度因子の算出とそれらのデータを Zn 型酵素についての比較によって解析した。高分解能結晶構造解析は、大型放射光施設 SPring-8 における回折像の収集と、高速 PC を利用したリファイメントにより行った。

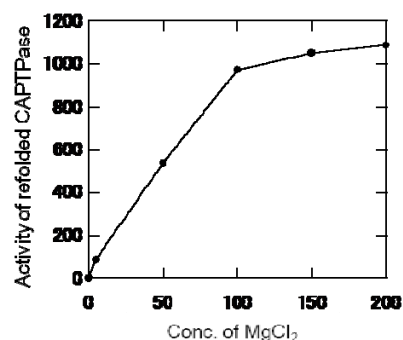
(4) 金属透過因子・酵素分子の金属の取り込みに関わる因子の同定

Shewanella sp. に含まれるタンパク質について、マグネシウムやカルシウムなど各種海水中に高濃度に含まれる金属を非添加あるいは高濃度に添加した培地で生育させた場合に発現量が変化するタンパク質群をプロテオミクス解析によって同定した。

4. 研究成果

(1) リフォールディングの際に使用した希釈・透析溶液に含まれるマグネシウムの濃度を変化させたところ、100 mM まで濃度上昇とともにリフォールディングされた CAPTPase は増加した。その結果から、本酵素のフォールディングにはマグネシウムイオンが必要であることが示唆された (図 1)。

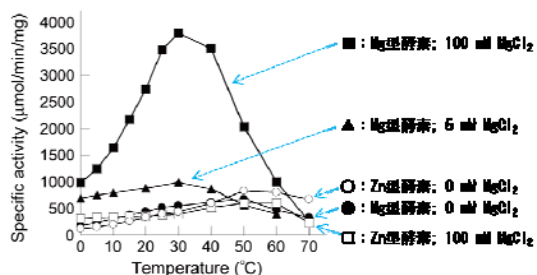
また分離精製した Mg 型酵素の分子サイズと N 末端アミノ酸配列を SDS-PAGE 及びアミノ酸シーケンシングで確認した結果、Mg 型酵素は天然型及び Zn 型酵素と同じ 38.4 kD の分子サイズで天然型の N 末端アミノ酸領域を含むことが示された。また、分子内に含まれるトリプトファン蛍光のヨウ化カリウムによる消光効果は Mg 型酵素及び Zn 型酵素の間で大きな相違が認められなかった。この実験結果は、リフォールディングで調製した Mg 型酵素は、一次構造及び 3 次構造レベルで、Zn 型酵素と同様の構造を有していることを支持するものであり、以降の構造比較解析に有効な試料であると判断できた。



【図 1】 リフォールディングにおけるマグネシウム濃度の影響

(2) 分離精製した Mg 型酵素について活性の温度依存性及び熱安定性及び活性の速度論的パラメータを算出した。図 2 に示すように、Mg 型酵素の活性は、マグネシウムイオンの濃度依存的に低温～中温での活性が顕著に上昇した。特に高濃度 (100 mM) では 30°C において最大活性を示した。これに対して、Zn 型酵素ではマグネシウム添加による活性の上昇は認められなかった。低温域、特に 0°C での活性は、マグネシウムを非添加の Mg 酵素及び Zn 酵素 (マグネシウム添加・非添加) に比べて約 6 倍の活性の上昇が認められた。それぞれの酵素でのキネティックパラメータを算出したところ、Mg 型酵素では、100 mM $MgCl_2$ 存在下で、触媒効率を表わす kcat/Km の 5°C における値が、非存在下に比べて約 2 倍に上昇した。また、温度安定性に関しては、Mg 型酵素はマグネシウム存在下において 40°C で速やかに失活することが見出された。

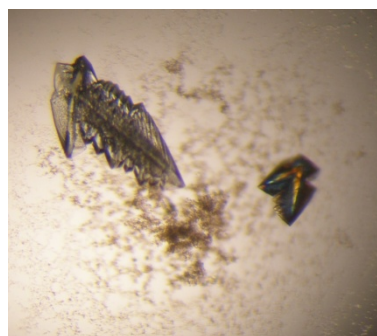
この低温域での効率良い触媒機能発現と熱に対する不安定性は、低温活性酵素において共通の酵素学的特性である。即ち、Mg 型酵素と Zn 型酵素は、同一アミノ酸で同様の 3 次構造を有するにもかかわらず、Mg 型のみがマグネシウム存在下で低温活性酵素としての特性を強く示すことが示された。このマグネシウム存在下でフォールディングされることは、低温活性発現能を導く“環境要因”であると考えられ、マグネシウム存在における Mg 型酵素 Zn 型酵素の立体構造を比較することで低温活性発現に重要な構造特性が導き出せると考えられた。



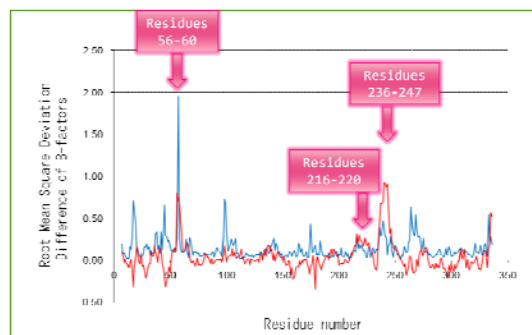
【図 2】各濃度のマグネシウム存在下での Mg 型酵素、Zn 型酵素の温度依存性

(3) 構造解析に供するサンプルを得るために、100 mM $MgCl_2$ 存在下において Mg 型酵素の結晶化条件をスクリーニングした。その結果、図 3 に示すような結晶を得ることができた。この結晶を用いて放射光を用いた結晶構造解析に供することで 1.3 Å の高分解能で立体構造を決定できた。得られた構造を既に高分

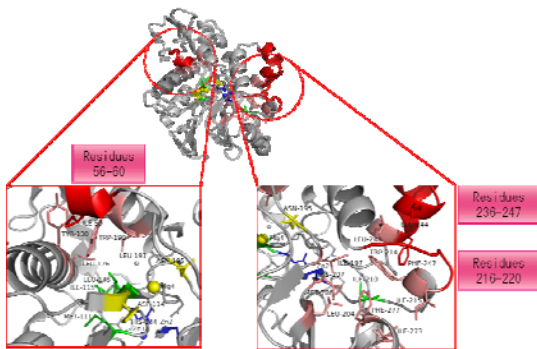
解能 (1.1 Å) で決定している Zn 型酵素と比較した。主鎖構造及び側鎖についての明確な相違と活性中心に配位している金属の置換は認められなかった一方で、2 つの構造の相違を表わす RMSD 値及び原子の揺らぎを表わす温度因子について大きな違いを示す 3 つの領域が見出された (図 4)。これら 3 つの領域は、本酵素分子の表面に位置していた (図 5)。これらの領域は、触媒反応の中心的役割を担う活性中心のほぼ裏側に位置していた。これまで、「本酵素の低温活性発現には、活性中心の触媒部位背後で形成されている疎水性部位が重要である」ことが示されている。この疎水性部位が高い揺らぎを示す 3 つの分子表面領域と疎水性相互作用で繋がっていることを組み合わせて考えれば、本酵素の低温活性は、低温で低下した水分子の運動 (振動) を分子表面の領域の“揺らぎ”として受容し、活性発現に適切な運動 (振動) とし触媒部位に効率よく伝達できることで発現すると推測できた。



【図 3】結晶写真

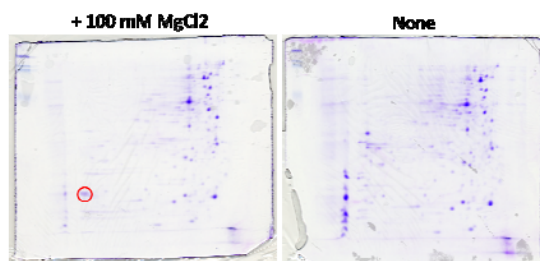


【図 4】RMSD 値と 2 分子間の温度因子の差
青線が立体座標の違いを表わす RMSD 値であり、赤線が温度因子の差 ([Mg 型酵素の温度因子] から [Zn 型酵素の温度因子] を差し引いたもの) である。



【図5】Mg型酵素とZn型酵素の構造の違い
赤で示した部位が高いRMSD値と顕著な温度因子が認められた部位である。

(4) ここまでの研究で本酵素が低温活性発現能を獲得するためには、フォールディングの際に分子周辺にマグネシウムが配置されるための細胞内機構があると考えられる。これまで、マグネシウムイオンの輸送に関わる因子は十分知られていないことから、マグネシウム存在下及び非存在下で培養した好冷性細菌 *Shewanella* sp. を2次元電気泳動に供し、含有量に変化したタンパク質の探索・同定を行った。その結果、2種の塩基性蛋白質（約20kD）が見出され（図6）、それぞれリボソーム蛋白質L10、L11であることが明らかとなった。マグネシウム輸送に関わるこれらの分子の役割については未明である。今後、低温活性発現能を有する有用酵素の創出させるためのシステム開発には、これらの2種の蛋白質が低温活性発現能を導くフォールディングに与える影響を調べるのが重要である。



【図6】2次元電気泳動図
100 mM MgCl₂ 存在下（左）と非存在下（右）を含む培地で生育させた *Shewanella* sp. の全蛋白質の2次元電気泳動図

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6件）

- ①M. Nakagawa, M. Ueyama, H. Tsuruta, T. Uno, K. Kanamaru, B. Mikami, and H. Yamagata, Functional analysis of the cucumisin propeptide as a potent inhibitor of its mature enzyme., *Journal of Biological Chemistry*, 査読有り, **285**, 29797-29807 (2010).
- ②E. Isogai, H. Isogai, K. Okumura, H. Hori, H. Tsuruta, and Y. Kurebayashi, Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*., *Experimental & Applied Acarology*, 査読有り, **53**(1), 71-77 (2010).
- ③H. Tsuruta, B. Mikami, T. Higashi, and Y. Aizono, Crystal structure of cold-active alkaline phosphatase from psychrophile *Shewanella* sp., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, **74**(1), 69-74 (2010).
- ④鶴田 宏樹、相菌 泰生、低温で機能する酵素の機能特性と構造特性、特集「化学品量産プロセスを志向する酵素研究」、*BIO INDUSTRY*, **25**, No. 7, 5-13 (2008)
- ⑤H. Tsuruta, B. Mikami, C. Yamamoto, and H. Yamagata, The Role of Group Bulkiness in the Catalytic Activity of Psychrophile Cold-active Protein Tyrosine Phosphatase, *FEBS Journal*, 査読有り, **275**, 4317-4328 (2008).
- ⑥K. Iwamoto, H. Tsuruta, Y. Nishitani, and R. Osawa, Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T. *Systematic and Applied Microbiology*, 査読有り, **31**(4), 269-277 (2008).

〔学会発表〕（計5件）

- ①H. Tsuruta and B. Mikami, Structural features for adaptation of psychrophilic cold-active phosphatase, PACIFICHEM2010, 2010年12月18日, Hawaii (USA)
- ②鶴田宏樹、三上文三、Mgイオン存在下で再生したCold-active protein tyrosine phosphataseの立体構造解析、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学、東京
- ③鶴田宏樹、三上文三、東哲生、相菌泰生、好冷菌 *Shewanella* sp. が産生する Cold-active alkaline phosphataseの結晶

- 構造、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸ポートアイランド、兵庫
- ④鶴田宏樹、配位金属の相違が低温活性発現能に与える影響、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド、兵庫
- ⑤鶴田宏樹、低温活性フォスファターゼの低温での効率よい機能発現に関わる要因、極限微生物学会年会、2008年11月4日、立教大学、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.innov.kobe-u.ac.jp/cass/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 宏樹 (TSURUTA HIROKI)
神戸大学連携創造本部・准教授
研究者番号：20346282

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし