

助成番号 9931

高度好塩菌由来酵素の高次構造形成機構の解明と分子育種

助成研究者：徳永 正雄(鹿児島大学 農学部 生物資源化学科)
共同研究者：石橋 松二郎(鹿児島大学 農学部 生物資源化学科)
徳永 廣子(鹿児島大学 農学部 生物資源化学科)
宮内 まゆみ(鹿児島大学 農学部 生物資源化学科)

我々は、高濃度塩存在下で機能する酵素のより幅広い利用を目的として研究を進めている。好塩性細菌は、低度、中度、高度好塩菌に分類され、2.5M 以上の高濃度塩存在下でのみ生育する高度好塩菌は、その細胞内にも細胞外と同等濃度の塩を蓄積している。現在までに報告されている高度好塩菌由来の酵素は、全てその安定性に高濃度の塩を要求し、従って酵素の高度精製や性質検討は容易でなかった。

高度好塩菌 *Halobacterium cutirubrum* の粗抽出液を様々な濃度の塩存在下で調製し ATP カラムにかけたところ、DnaK 等の蛋白質は 2M 以上の食塩存在下でのみカラムに吸着したが、みかけの分子量 24,000 の蛋白質は塩非存在下でもカラムに結合し、その活性を保持していることを予想させた。この蛋白質を同定する為に N 末端アミノ酸配列を決定し、データベースで検索したところ、多くの生物の Nucleoside diphosphate kinase (NDK) と相同性があり、*H. cutirubrum* の NDK と考えられた。この蛋白質がたしかに NDK であることは、酵素活性測定からも確かめられた。この酵素は予想どおり、50mM Tris-HCl buffer, 2mM MgCl₂ に透析しても活性を保持し、この性質は高度好塩菌由来酵素としては初めての例である。NDK は進化的に良く保存された重要な酵素であるとともに、動物細胞ではそのホモログがガン転移抑制因子や転写因子として働いており、多機能蛋白質として注目されている。我々が見つけた NDK は、安定性に塩を要求しないことから、高度精製が容易であり、好塩性のメカニズムを解明する良きモデル系と考えられる。NDK 遺伝子を分離する目的で、N 末端アミノ酸配列に基づいて PCR プライマーを作製し、ゲノム DNA からこの N 末端部分をコードする DNA 断片を増幅して、クロモソームサザン解析により NDK 遺伝子を分離したところ、この酵素は酸性アミノ酸に富むという好塩性酵素の特徴を保持していた。

一方、我々は同じく *H. cutirubrum* より分子シャペロン DnaK 蛋白質を初めて同定した。この蛋白質は、ATP カラムへの吸着には 2M 以上の高濃度塩を必要とし、やはり酸性アミノ酸含量が高く、そのため SDS-PAGE 上では移動度が異常で、実際の分子量は 68,500 であるにもかかわらず、見かけの分子量は 97,000 (12% ゲル) を示した。

さらに我々は、塩蔵食品から分離した中度好塩菌 (16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列を決定し、*Halomonas* sp. と同定) から分子シャペロン GroEL を初めて精製し、その ATPase 活性等の諸性質を調べた。興味深いことにこの GroEL 蛋白質の ATPase 活性は、高濃度 KCl の存在下で阻害された。また、尿素変性させた α -glucosidase に対してシャペロン活性、すなわち「変性蛋白質巻き戻し促進活性」が検出された。

助成番号 9931

高度好塩菌由来酵素の高次構造形成機構の解明と分子育種

助成研究者：徳永 正雄 (鹿児島大学 農学部 生物資源化学科)

共同研究者：石橋 松二郎 (鹿児島大学 農学部)

徳永 廣子 (鹿児島大学 農学部)

宮内 まゆみ (鹿児島大学 農学部)

1. 目的

好塩性酵素は、醸造産業・塩蔵食品加工等で中心的役割を果している。しかし、その安定性と活性に高濃度の塩を要求する為に精製が困難であり、その利用や新規酵素の改良、開発に関する研究は、その必要性とは裏腹に進展していない。

高度好塩菌は、2M~飽和食塩中で最も良く生育し、その酵素は活性・安定化に、これに相当する塩を要求するものが多い。このように通常生物由来の酵素が機能しえない環境下で働く好塩性酵素が多方面で利用できれば、多くの新規反応を開発することができ、さらに、醸造・塩蔵食品に新しい付加価値を加えたり、高濃度塩含有醸造産業廃棄物の有効利用等も考えられる。

産業的に利用する目的で好塩性酵素を新たに分離もしくは育種して大量精製や通常生物での大量発現を行うためには、塩非存在下で一旦(部分的に)変性した高次構造を正しく巻き戻して、活性ある状態にもどす技術を確認することが最も重要な解決すべき課題である。好塩菌細胞内は、通常生物由来の酵素等がほとんど機能しえないような異常な強イオン環境(4~5 M KCl)であり、同時に塩による水分子の占有による疎水的環境下にあるので、このような条件下での蛋白質の折りたたみ機構、分子シャペロンの機能の解明は好塩性酵素の利用という点において、また基礎的な蛋白質の生合成、活性発現過程の研究においても全く新しい知見を与えられと考えられる。これらは、新規好塩性酵素の分子育種への必須の知見である。

本研究の目的は、(1) 通常細菌及び好塩菌由来の分子シャペロン(熱ショック蛋白 Hsp70, Hsp60)の同定と精製、(2) 高度好塩性酵素を精製し、性質を明らかにして特に、共存塩濃度と蛋白の変性、巻き戻り・活性化の関係を解明すること、(3) 好塩性酵素の遺伝子を分離し、通常細菌を宿主として発現すること、である。具体的には、好塩性酵素として高度好塩菌より、分子シャペロン DnaK 蛋白(Hsp70)と Nucleoside diphosphate kinase (NDK) とを精製しモデル材料として用いる。また、我々が塩蔵食品から新たに分離した中度好塩菌の同定と、この菌から分子シャペロン GroELの精製・性質検討を行うことを目的とした。

2. 方法

高度好塩菌 *Halobacterium cutirubrum* の培地は、SGC (1% yeast extract, 0.3% Na-citrate, 0.2% KCl, 2% MgSO₄, 0.0023% FeCl₂, 0.75% vitamin free casamino acids,

pH7.0)-3M NaCl を用いた¹⁾。 中度好塩菌 *Halomonas* sp.#43 の培地は、NB(1% beef extract, 1% polypeptone)-2M NaCl を用いた。

高度好塩菌 *H. cutirubrum* クロモソーム DNA の調整は、Mevarech らの方法によった²⁾。すなわち、菌体を 10mM Tris-HCl buffer, pH7.5, 10mM MgCl₂ 中で破壊し、phenol で 2 回抽出した。水層に 0.5M NaCl と等量のエタノールを加え、沈殿してきた DNA をガラス棒に巻きとって精製した。

PCR 法は、通常の増幅は Vent DNA polymerase を用いた。16S RNA 遺伝子のクローニングには、Taq DNA polymerase を用いた。

ATP アガロース(SigmaA2767)樹脂を Bio-Rad polyprep カラムにつめ、50mM Tris-HCl buffer, pH8.0, 25 mM KCl, 2mM MgCl₂ 溶液で平衡化した。サンプルをかけた後、同bufferでカラムを洗浄し、3mM ATP を含む同bufferで吸着した蛋白を溶出した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli の方法を用いた³⁾。蛋白量は、Lowry 法を用いて定量した⁴⁾。

GroEL の ATPase 活性を測定する反応系は、1mM ATP, 50 mM KCl, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 30 mM Tris-HCl buffer, pH8.0, それに GroEL とし、37 °C で 40 分間反応させた。反応は、perchloric acid を加えることで終了させ、生成した無機リン酸を Lanzetta 法で測定した⁵⁾。

GroEL の巻き戻し促進活性は、尿素で変性させた酵母 α -glucosidase を用いて、尿素を希釈することにより巻き戻しを始め、その時に共存する GroEL 蛋白の α -glucosidase 活性の巻き戻し効率に対する効果を検定した。0.35 mM α -glucosidase を 10 mM phosphate buffer, pH7.0, 8 M urea, 1 mM EDTA, 2mM dithiothreitol 中、室温で 1 時間変性させた後、0.1 M Tris-HCl, pH7.6, 10 mM KCl, 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 147 nM GroEL 14-mer 溶液中に 100 倍希釈し、希釈後 30 分おきに、 α -glucosidase 活性を測定し、この活性を巻き戻り活性とした。

α -glucosidase 活性は、50 mM phosphate buffer, pH7.0, 5 mM p-nitrophenyl- α -glucopyranoside よりなる反応系で、37 °C, 15 分間反応させ、終濃度 0.1 M Na₂CO₃ を加えて反応を止め、400 nm の吸光度を測定した。

3. 研究結果 及び 考察

3.1. 高度好塩菌由来分子シャペロン DnaK 蛋白の性質検討

飽和濃度に匹敵する塩濃度存在下で機能する分子シャペロンの性質を調べる目的で高度好塩菌の主要分子シャペロン DnaK の分離と性質検討を目的とした。高度好塩菌 *H. cutirubrum* を 42 °C で生育させ熱ショック蛋白の合成を誘導した。一般に DnaK は ATP カラムに吸着し、ATP によって溶出される性質を持っているので、調整した粗抽出液を、0, 2, 4 M の NaCl 存在下で ATP-アガロースカラムにかけ、3 mM ATP で溶

出した。その結果 2 M 以上の NaCl 存在下でのみ、見かけの分子量 97,000 付近に泳動する蛋白バンドが検出された (図1)。

そこでこの蛋白バンドを PVDF 膜に転写し、プロテインシークエンサーで N 末端アミノ酸配列を決定したところ、*H. cutirubrum* の *dnaK* 遺伝子から翻訳されたアミノ酸配列と一致した。さらに、他の生物由来の Hsp70 (DnaK) 蛋白とも高い相同性を示し、*H. cutirubrum* の DnaK 蛋白であることが強く示唆された (図2)。しかしこの蛋白は遺伝子配列からは、分子量 68,495 であり、見かけの分子量と大きな違いがあった。我々は、新たなホモログの可能性も考えこの蛋白をトリプシン分解し、内部アミノ酸配列も検討したが、いずれも *dnaK* 遺伝子配列から推定されるものと一致した (図3)。そこで、*dnaK* 遺伝子を PCR 法で増幅・分離し、大腸菌発現ベクター pET3a にクローン化し、pET3HCK を構築した。この発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3) に導入し DnaK 蛋白を発現させたところ、やはり 97 kDa 付近に新たな蛋白バンドが検出された (図4)。以上の結果から、*H. cutirubrum* の DnaK は、熱ショックで誘導され、2 M 以上の NaCl 存在下で ATP 結合活性を持つが、SDS-PAGE 上では本来の分子量と異なった異常な移動度を示すことが判明した。図2に示したように、高度好塩菌由来の DnaK 蛋白は、酸性アミノ酸の含有率が他の生物由来のものに比べて有意に高く、これが原因で SDS の結合量が少なく、そのために実際の分子量より移動度の小さい位置に泳動されると推定された。

3.2. 高度好塩菌由来 Nucleoside diphosphate kinase の性質検討と遺伝子クローニング

現在までに報告されている高度好塩菌由来の全ての蛋白質は、その安定性に高濃度の塩の存在を必要とする⁶⁾。上記、分子シャペロン DnaK も同様であり、この為これら蛋白質を高度に精製することは容易でなく、好塩性酵素の研究が進展しない大きな要因となっている。

我々は、上記高度好塩菌由来 DnaK 蛋白を研究する過程の ATP カラムの実験において、NaCl 濃度が 0 でも ATP カラムに吸着するみかけの分子量 24,000 の蛋白質を発見した。この蛋白質を同定する目的で、SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、プロテインシークエンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定したところ、多くの他の生物由来の Nucleoside diphosphate kinase に高い相同性を示した。塩非存在下でも、ATP カラムに吸着するという事実は、この酵素が塩非存在下でも酵素活性を保持することを強く示唆し、今までにない極めて珍しい性質であった。従来の好塩性酵素と異なり、高度に精製してその諸性質を明らかにし、好塩性のメカニズムを追求する良きモデル材料となると考えられた。

本酵素の酵素活性を ATP からのリン酸基の TDP への転移活性として測定した。すな

われ生成する ADP を pyruvate kinase と lactate dehydrogenase を共役させて NADH の 340nm の吸光度の減少として測定したところ、塩非存在下でも確かに失活せず 200 μ mole/min/mg 蛋白 程度の活性を示した。

本酵素は、塩非存在下でも ATP カラムに吸着するが、他のほとんど全ての蛋白質はこの条件下で変性してカラムに吸着しないので、この ATP カラム一回で約 600 倍精製され、97%以上均一に精製された。

次に、本酵素遺伝子のクローニングを試みた。本酵素の N 末端アミノ酸配列情報をもとに PCR プライマーを設計し、*H. cutirubrum* クロモソーム DNA より、この領域をコードする DNA 断片の増幅を試みた。分離できた断片をプローブとしてサザンハイブリを行なったところ、幾種類かの制限酵素消化断片において単一のハイブリバンドを得た。相当するバンドをアガロースゲルから切り出し、pUC19 につなぎコロニーハイブリで、クローンをスクリーニングした。最終的に得られたクローンの塩基配列を決定したところ 486 塩基対からなり、図 5 に示すごとく、他生物由来の NDK に高い相同性を持つ遺伝子が同定できた。

塩基配列から計算された蛋白の分子量は 18,065 となり SDS-PAGE によるみかけの分子量よりかなり小さかった。アミノ酸配列を他生物のものと比較したところ、好塩性細菌由来の蛋白の特徴とされている酸性アミノ酸含量が有意に多く、このため前記 DnaK と同様、SDS-PAGE でのみかけの分子量が、実際より大きく観察されたものと思われる。現在、大腸菌での本遺伝子の発現を検討中である。

3. 3. 中度好塩菌由来分子シャペロン GroEL の性質検討

我々は、塩蔵食品等から数多くの新規中度好塩菌を分離し、保存している。この保存菌株の中から「いかの塩辛」より分離した #43 株を用いて分子シャペロン GroEL 蛋白を精製し、ATPase 活性や、変性蛋白の巻き戻し促進活性を調べた。

まず、この #43 株の属を決定する目的で 16S ribosomal RNA の塩基配列を調べた。

16S ribosomal RNA 遺伝子部分 (約 1.5Kb) を PCR 法で増幅してその塩基配列を決定し、データベースと比較したところ、中度好塩菌である *Chromohalobacter* 属細菌及び *Halomonas* 属細菌と高い類似性を示し、#43 株は無色であることから、この #43 株は、*Halomonas* 属細菌と推定した (図 6)。

分子シャペロン GroEL は、熱ショック蛋白の一種なので高温培養による大量生産を試みたところ、NB 培地 42C 培養で 60kDa 付近に明らかに大量に誘導合成される蛋白バンドが確認された。大腸菌 GroEL に対する抗血清でイムノブロットを行ったところ明らかに染色され、これが #43 由来の GroEL と推定できた。

湿重量 10g の菌体を 0.15M KCl を含む 50mM Tris-HCl buffer, pH8.0 に懸濁後、超音波破碎し、遠心上澄みを粗抽出液とした。これを 200,000 \times g、1 時間超遠心分離し、

その上澄みを 30–60%飽和で硫酸分画して、これを Sephacryl S-300 カラムでゲルろ過した。SDS-PAGE とイムノブロットで GroEL 画分を検出し、この画分を ATP カラムに吸着させた。3mM ATP で溶出後濃縮し、最後に DEAE-5PW カラムにかけたところ、均一にまで精製出来た (図 7)。

この精製蛋白の N 末端アミノ酸配列を決定したところ図 8 に示すように、大腸菌 GroEL の N 末端配列と高い相同性を示し、GroEL 蛋白であることが同定できた。

一般に GroEL 蛋白は ATPase 活性を持っているので、本 GroEL が持つ ATPase の性質を調べた。ATPase 活性は 37 C で 60 分間直線的に進行し、至適 pH は、pH8.0 であった。本酵素は比較的熱に安定であり、60 C, 15 分間の熱処理でも約 50%の活性を保持していた。ATPase 活性に対する塩の影響を調べた。本酵素は K^+ を要求し、50 mM が最適濃度であった。 Na^+ は強い阻害作用を示し、 K^+ 共存下でも強い阻害作用を示した。興味深い点は、ATPase 活性の塩濃度依存性である。中度好塩菌由来であるにもかかわらず、本 ATPase 活性は、高い塩濃度で活性が阻害され、1.0M KCl 存在下では、約 40%に活性が阻害された。一方、これと比較して非好塩性菌である 大腸菌 GroEL の ATPase 活性に対する塩依存性を測定したところ、1.0 M KCl 存在下でも 100%の活性を示した。類縁菌の菌体内 Na^+ もしくは K^+ 濃度は約 1M と報告されており⁷⁾、この結果は興味深い。細胞内では何らかの安定化因子が存在しているのかも知れない。本 ATPase の基質特異性を調べたところ、ATP のみを特異的に基質とし、GTP, CTP, UTP, ADP, AMP を全く基質としなかった。

次に、本 GroEL の変性蛋白巻き戻り促進活性を測定した。モデル基質としての変性蛋白として、酵母由来の α -glucosidase を 8M 尿素で変性させて用いた。変性 α -glucosidase を 100 倍量の巻き戻し buffer に混合して、尿素濃度を一気に 100 倍希釈し、その時の α -glucosidase の再活性化の度合を巻き戻り活性とした。

この条件下で、変性 α -glucosidase の自発的巻き戻りは 5%程度であるのに対して GroEL と ATP/Mg の共存下では 15%ぐらいの巻戻りが認められ、GroEL の ATP に依存した巻戻し促進活性が検出された。また、GroEL の補助因子としての GroES 蛋白を加えたところ、さらに高い巻戻し促進活性 (24%) が認められた。本実験では、市販の大腸菌由来精製 GroES 蛋白を用いて活性促進が認められたので、同じグラム陰性細菌間では、GroEL-ES 系の互換性があることが判明した。

以上のように、中度好塩菌細菌から初めて GroEL 蛋白を均一に精製し、その分子シャペロンとしての働き、すなわち変性蛋白の巻き戻し促進活性を測定することができた。

4. 今後の課題

高度好塩菌より初めて DnaK 蛋白を同定し、この蛋白はその安定性に 2 M 以上の塩を要求することが判明した。この遺伝子を大腸菌で発現させたところ、SDS-PAGE で native

蛋白と同様の位置に蛋白バンドを検出できた。 今後は、この多分大腸菌細胞内では変性していると考えられる DnaK 蛋白質の refolding 条件をまず、検討する必要がある。

次に、我々は、高度好塩菌由来であるにもかかわらず、その安定性と活性に高濃度塩を要求しない酵素 Nucleoside diphosphate kinase を発見した。この酵素は一次構造的には、好塩性酵素としての性質を保持しており、極めて興味深い酵素である。遺伝子のクローニングに成功したので、今後は、大腸菌や、好塩菌での発現系を構築し、その高次構造の形成・安定化機構と塩の関係を明らかにしてゆきたい。また、このとき分子シャペロンが、塩の効果を代替えもしくは、促進できるかどうか？検討する必要がある。一方、*H. cutirubrum* 菌体由来の NDK 蛋白については、精製が容易なので、大量精製を試み、蛋白化学的・物理化学的性質を明らかにしてゆきたい。

最後に、我々は中度好塩菌からも初めて分子シャペロン GroEL の精製とその「変性蛋白巻き戻し促進活性」の測定に成功した。GroEL 蛋白の ATPase 活性は、高濃度 KCl によって阻害されるという興味ある結果が得られ、細胞内では他に何か別の因子が必要なのか？等、解明すべき課題である。 また、今回は「変性蛋白巻き戻し促進活性」の測定は、高濃度塩非存在下で行ったが、塩の効果の解明にも興味もたれる。

以上のように、高度好塩菌由来の DnaK, NDK や、中度好塩菌由来の分子シャペロン等の材料が準備できたので、好塩性酵素の活性、発現、再活性化、等々について検討をすすめ、好塩性酵素のより幅広い利用と、最終的には分子育種をめざしてゆきたい。

5. 参考文献

- 1) Shegal, S. N., and Gibbons, N. E. (1960) *Can. J. Microbiol.* 6, 165-169
- 2) Mevarech, M., Hirsch-Twizer, S., Goldman, S., Yakobson, E., Eisenberg, H., and Dennis, P. P. (1989) *J. Bacteriol.*, 171, 3479-3485
- 3) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
- 5) Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. and Candia, O. A. (1979) *Anal. Biochem.*, 100, 95-97
- 6) Lanyi, J. K., (1974) *bacteriol. Reviews*, 38, 272-290
- 7) Unemoto, T., (1979) In *Halophilic Microorganisms* (Masui, M., Oonishi, H. and Unemoto, T., Eds) 99. 91-106 Ishiyaku Shuppan, Tokyo

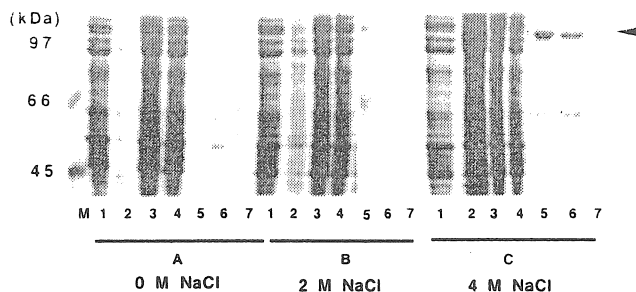


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of eluents from ATP-agarose affinity column chromatography. *Halobacterium cutirubrum* cells were grown at 42 C and cell homogenates were prepared. The concentrations of NaCl in the buffers used for cell disruption and ATP-agarose column chromatography were 0 (A), 2(B) and 4 M(C). lane M, low molecular mass standards (BioRad); lane 1, crude homogenates (20 µg of protein); lane 2, flow-through fraction from the ATP-agarose column; lanes 3 and 4, first and second washes from the ATP-agarose column, respectively; lanes 5, 6 and 7, first, second and third eluted fractions from the ATP-agarose column, respectively. The arrow shows the position of 97KDa protein.

| Proteins | Amino-terminal amino acid sequences | Acidic amino acid residues in the whole sequence (%) |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 97 kDa Band I protein | ASEKILGVDLGTNSAFVME | |
| DnaK from <i>Halobacterium cutirubrum</i> | M ASEKILGVDLGTNSAFVME | 23.2 |
| <i>Halobacterium marismortui</i> | M ASNKILGIDLGTNSAFVME | 24.3 |
| <i>Methanosarcina mazei</i> S6 | MAKILGIDLGTNSCVAVME | 15.8 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | MSKVIKIDLGTNSCVAVLE | 17.7 |
| <i>Escherichia coli</i> | MGKIIKIDLGTNSCVAIMD | 16.5 |

Fig. 2 Alignment of the NH₂-terminal sequences of Band I protein from *Halobacterium cutirubrum* (this study) and those deduced from several Hsp70 genes. N-terminal sequences of Hsp70s from *Halobacterium marismortui*, *Methanosarcina mazei* S6, *Bacillus subtilis* and *E.coli* are shown in the middle column. The sequences in the thin and bold lined boxes were common to six and two species, respectively. The numbers indicate the percentage of acidic amino acid residues calculated from the deduced amino acid composition in the whole sequence.

MASEKILGVD LGTTNSAFAV MEGSDPEIIT NEEGDLTPS IVAHDDGELL VGKPAKNQAV
 (1) (2)
ONPDQTIAS I KRHMGEEDYT VALGGDEYTP EEISARILQK IKRDAEEYLG ODVEKAVITV
 (3) (4)
PAYFNDRQRQ ATKDAGEIAG FDVERIVNEP TAASMAYGLD EDRDQTVLVY DLGGGTFDVS
 (5)
ILDLGGGVYE VAATNGDNDL GGDDWDHAII DHLADNFENE HGIDLREDRQ ALQRLTEAAE
EAKIELSSRK ETTVNLPFVT ATDSGPVHLE QDITRAFES ITEDLIERTV GPTEQALEDA
 (6) (7)
GLSKSDIDDV ILVGGSTRMP QVQAQVEDLV GOEPKKNVNP DEAVALGAAV QGGVLSGEVD
 (8) (9)
DIVLVDVTPL SLGIEVKGGL FERLIEKNTA IPTTASKVFT TAADNQTSVQ IRVFOGDREI
 (10) (11)
RSENKLLGDF ILTGIPPAPA GTDQIEVTFE IDADAIVNVE AEDQSGQRE SITIEGGAGL
 (12)
SDDEIDEMQE DAEAHAEDE QRRRIEARN EAETGIQRAE SLLEENEELV DEDLEADVND
AIDDVQAVLD EDEPEIDALE TATEELSDTL QEIGKQAYQQ QQDMRPARP AALAAVVAWA
 AWPTARRGGR RRRDDEEYVD ADFEDVDEE

Fig. 3. Amino acid sequences of internal tryptic peptides of Band I protein. The amino acid sequence deduced from *dhak* gene was shown, and detected 12 sequences of internal peptides were underlined.

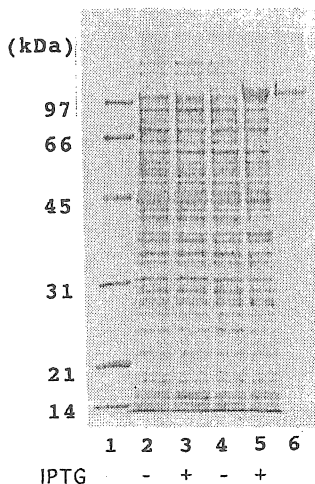


Fig. 4. Expression of *Halobacterium cutirubrum* DnaK homologue. *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells which contain pET3a or pET3Hck were grown at 37 C to O.D₆₀₀ of approximately 0.8 and expression was induced with 0.2 mM IPTG for 2.5 hrs. Total cell protein samples (20 µg) were run on 10 % acrylamide gel followed by staining with Coomassie blue. lane 1, low molecular mass standards (BioRad); lane 2 and lane 3, *E.coli* BL21 (DE3) containing pET3a; lane 4 and lane 5, *E.coli* BL21 (DE3) containing pET3Hck; lane 3 and lane 5, Cultures were induced with 0.2 mM IPTG.; lane 6, 97kDa protein purified from *Halobacterium cutirubrum*.

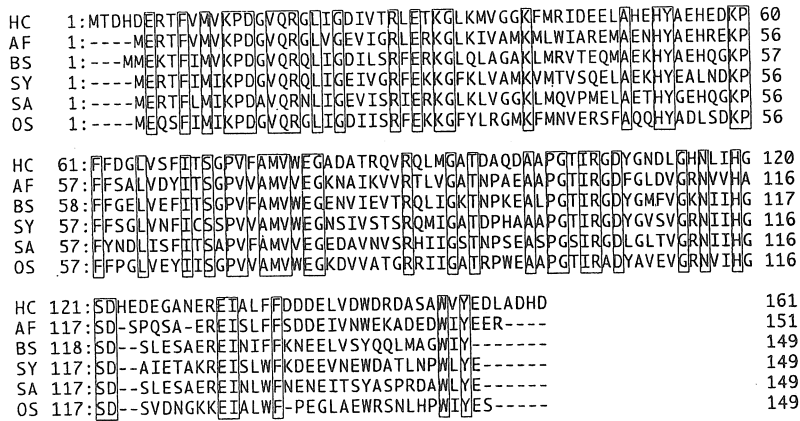


Fig. 5. Alignment of amino acid sequences of nucleoside diphosphate kinase.

HC, *H. cutirubrum*; AF, *A. fulgidus*; BS, *Bacillus subtilis*; SY, *Synecococcus* sp.; SA, *S. aureus*; OS, *Oriza sativa*

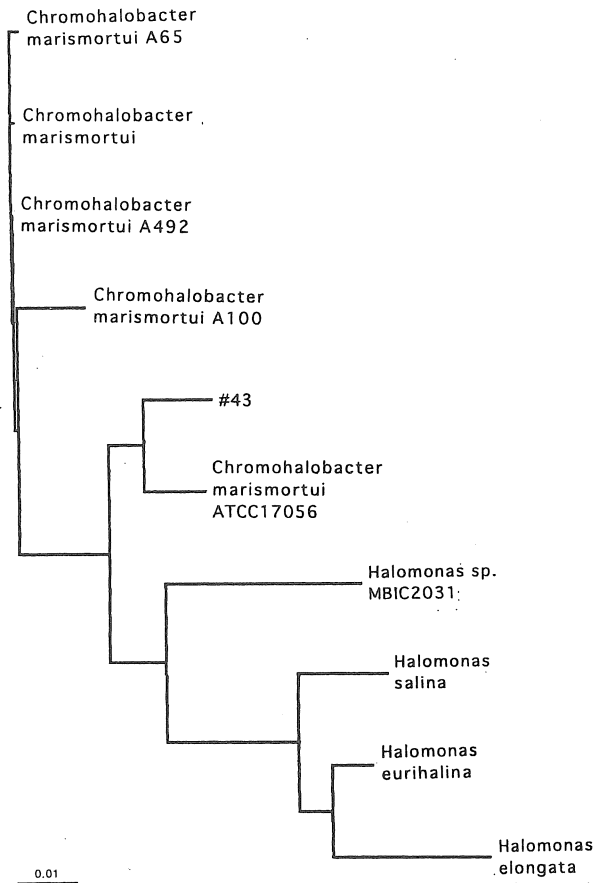


Fig. 6. Phylogenetic tree of moderately halophilic bacteria #43 and closely related species based on 16S ribosomal RNA sequences.

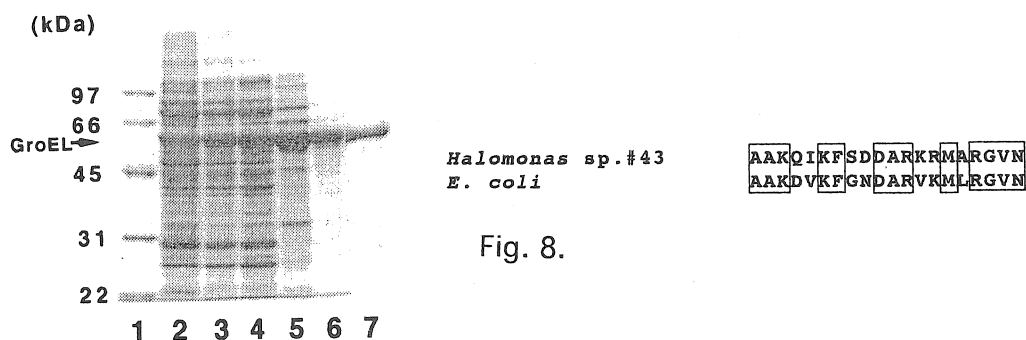


Fig. 8.

Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Halomonas* GroEL samples from each purification step.

Lane 1, molecular weight standard; lane 2, crude homogenate; lane 3, supernatant after ultracentrifugation; lane 4, ammonium sulfate precipitate; lane 5, after gel filtration; lane 6, after the ATP-agarose column; lane 7, final preparation after the DEAE-5PW column. To lanes 2 to 5, 15 µg of protein was applied; to lanes 6 and 7, 3 µg of protein was applied. *Halomonas* GroEL is shown by an arrow.

Fig. 8. Alignment of the NH₂-terminal amino acid sequences of *Halomonas* GroEL and *E. coli* GroEL. *Halomonas* GroEL was electro-blotted onto a Problott membrane and its NH₂-terminal amino acid sequence was determined.

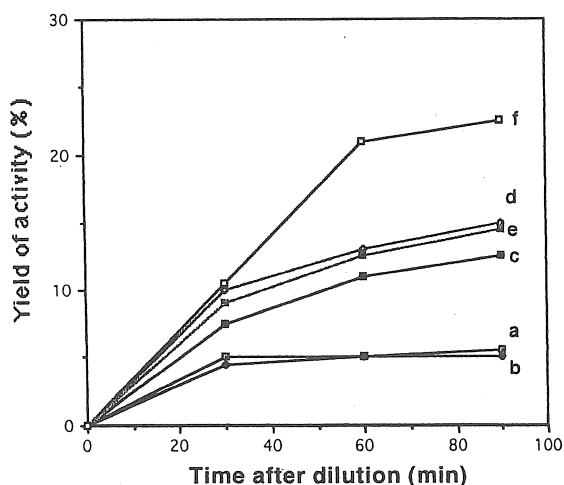


Fig. 9. Protein refold-promoting activities of *Halomonas* GroEL.

At time 0, urea-denatured α-glucosidase was diluted into refolding buffer with and without *Halomonas* GroEL tetradecamer (1.47 nM) and *E. coli* GroES heptamer (1.47 nM). The assay conditions have been described in the Materials and Methods. Curve a and b, control experiments without chaperones with (b) and without (a) Mg⁺⁺/ATP; curves c and d, addition of GroEL with (d) and without (c) Mg⁺⁺/ATP; curves e and f, addition of GroEL and *E. coli* GroES with (f) and without (e) Mg⁺⁺/ATP.

Protein folding of halophilic enzymes.

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi,
Hiroko Tokunaga and Mayumi Miyauchi
Faculty of Agriculture, Kagoshima University

We have attempted to characterize halophilic enzymes, aiming at expansion of their commercial applications. Extremely halophilic archaea require more than 2.5 M NaCl for growth, and accumulate high concentration of compatible solutes inside the cells. Thus, the industrial application of halophilic enzymes is very attractive, since these enzymes can function under the extreme conditions where most of the 'normal' enzymes cannot. However, they always require high salt concentration for its stability, and this basic property is the main reason why the number of halophilic enzymes isolated in pure form is very small. We think the most important points of research are (1) the understanding of folding mechanisms of halophilic enzymes and (2) the establishment of refolding conditions of (partially) unfolded state of these enzymes.

We studied molecular chaperone DnaK from extremely halophilic archaea *Halobacterium cutirubrum*. This halophilic DnaK requires the presence of more than 2 M NaCl for binding to the ATP column. We found that one protein bound to ATP column without high salt concentrations. This protein was identified to be nucleoside diphosphate kinase (NDK), and was stable without high salt. We purified and studied the properties of NDK, and isolated its gene. Nucleotide sequence analysis demonstrates that NDK conserves the amino acid composition characteristic of halophilic enzymes, i.e. high content of acidic amino acid residues, although it does not require high salt for its stability and activity. We found that NDK is a very good model enzyme for the study of halophilic protein folding.