

32

助成番号 0132

高塩分濃度環境における微生物酵素の塩適応現象に関する タンパク質構造学的研究

助成研究者：藤原 健智(静岡大学 理学部)

共同研究者：五十嵐 教之(高エネルギー加速器研究機構 構造科学研究所)

塩田や塩湖など極端に高濃度の塩水中に棲息する高度好塩性古細菌は、細胞内部に塩類を高濃度に蓄積し外部の浸透圧を相殺することによって、一般の生物にとって致命的な環境での生存を可能にしている。この微生物の持つタンパク質はそれ自体が高濃度の塩環境に適応しているため、逆に低イオン強度下ではその立体構造が維持できず変性失活してしまう。この「塩適応」現象を、好塩性酵素タンパク質の立体構造に基づいて分子レベルで理解することを目的として、高度好塩菌 *Haloarcula marismortui* から精製した好塩性の *catalase-peroxidase*(以下 HmCP) の結晶化とその X 線構造解析を行った。HmCP 単結晶およびその重原子 (Pt) 誘導体を用いて、高エネルギー研究所放射光実験施設において X 線結晶構造解析を行い、最終的に HmCP 二量体および酵素分子に結合した水分子と種々のイオンを含むモデルが 2.0 Å 分解能で得られた^{1, 2)}。

高度好塩菌から得られる好塩性タンパク質に共通する性質として、酸性アミノ酸残基 (Asp+Glu) の含量が高い (~ 20 %) ことが以前から知られている。このことから、分子表面の酸性アミノ酸残基による強い水和が、ほぼ飽和濃度の塩溶液中でのタンパク質分子の塩析による不溶化・変性を抑えていると考えられてきた HmCP についても酸性アミノ酸は全アミノ酸残基の 19.7 % を占め、特に分子の表面に露出しているアミノ酸残基に限ればその 50 % が酸性アミノ酸残基であり、この値は非好塩性の微生物の *catalase-peroxidase* における値の約 2.5 倍である。得られた HmCP の構造モデルは水 1,390 分子を含んでいるが、一般的な可溶性の非好塩性タンパク質と比較して結合水の数は 1.5 倍程度と見積もられ、好塩性タンパク質における強い水和が実証された。塩素イオンは主として塩基性残基とペプチド結合中のアミド基に結合し、ペプチド構造の安定化に寄与しているものと考えられる。一方、タンパク質分子表面での酸性アミノ酸残基間に働く反発力に基づく静電ポテンシャルは高イオン強度条件下で低下し安定化する一方、逆にイオン強度の低下によってタンパク質分子の構造が不安定となることが予測される。このように、HmCP の構造に基づいてその塩適応現象をうまく説明できることがわかった。

- 1) Yamada et al.(2001) Crystallization and preliminary X-ray analysis of catalase-peroxidase from halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. *Acta Cryst.*D57,1157-8.
- 2) Yamada et al.(2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Struct. Biol.* submitted.

32

助成番号 0132

高塩分濃度環境における微生物酵素の塩適応現象に関するタンパク質
構造学的研究

助成研究者：藤原 健智（静岡大学 理学部）

共同研究者：五十嵐 教之（高エネルギー加速器研究機構 構造科学研究所）

1. 背景

塩田や塩湖、また味噌・醤油の発酵槽など極端に高濃度の塩水中に棲息する微生物は、一般の生物にとって致命的なこのような高浸透圧環境での生存を可能にする生理的機能を持っている。この「塩耐性(halotolerance)」の性質は、主として細胞内部に特殊な糖や低分子化合物、あるいは塩類を高濃度に蓄積することで外部の浸透圧を相殺することによる。さらに塩類を蓄積する後者のタイプの微生物では、細胞内の生体分子、特に酵素タンパク質それ自体が高濃度の塩環境に適応しているため、逆に低イオン強度下ではその立体構造が維持できず変性失活してしまう。従ってこのような性質を「塩耐性」と区別して、特に「好塩性」と呼ぶ。好塩性(halophilic)タンパク質がどのようなメカニズムによって高濃度の塩環境に適応しているのかという「塩適応(haloadaptation)」問題の解明は、生命活動に及ぼす塩の影響を分子レベルで理解するためだけでなく、タンパク質フォールディングに関する一般的な物理化学上の問題にも大きく寄与するものと期待される。最近、高度好塩菌の好塩性リンゴ酸脱水素酵素の立体構造が報告され、蛋白質分子表面上の酸性アミノ酸クラスターによる水和反応や塩橋の形成が、高濃度の塩存在下における分子構造の安定化に寄与していることがわかった¹⁾。しかし一方、moderate halophilicなジヒドロ葉酸還元酵素の構造にはそのような特徴はみられない¹⁾。従って塩適応の現象を分子レベルで理解するためには、更にさまざまな好塩性タンパク質の分子構造を明らかにし比較検討を行うことが必要である。本研究は、ほぼ飽和濃度の塩存在下に生育する高度好塩性古細菌 *Haloarcula marismortui* から精製した2種類の好塩性酵素タンパク質、亜硝酸塩還元酵素(以下HmNiR)とcatalase-peroxidase(以下HmCP)についてX線結晶構造解析を行い、その三次元構造に基づいて塩適応の分子機構を明らかにすることを目的として行った。

2. 構造解析

2-1. HmNiR

亜硝酸塩還元酵素(NiR)は、微生物による脱窒(denitrification)に関与する酸化還元酵素であり、亜硝酸塩(NO_2^-)を一酸化窒素(NO)に還元する活性を持つ。高度好塩菌 *H. marismortui* から精製したHmNiRは補欠分子族として銅原子を含み、タイプI銅

に特徴的な吸収ピークによる青色を呈する²⁾。HmNiRは塩非存在下に徐々に失活し、また2M以上のNaCl濃度条件で最大活性を示す。Na⁺イオンをK⁺やLi⁺に、あるいはCl⁻イオンをNO₃⁻やSO₄²⁻に置き換えても十分な活性を示すことから、HmNiRの安定性や活性には十分なイオン強度が重要であり、イオンの種類は関係がないと考えられる。結晶化は硫酸アンモニウムを結晶化剤とする蒸気拡散法により行い、立方体状の小型結晶あるいはこれがいくつか合体した結晶(図1)が得られた。

得られたHmNiR結晶を用いた回折実験を、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設の16Aビームラインにおいて、共同研究者とともにに行った³⁾。用いたHmNiR結晶は、室温では実験中にビームの熱によって速やかに劣化してしまう。そこで、結晶を抗凍結剤(15%ショ糖)を含んだ結晶母液へ浸漬した後マウントし、液体窒素で急速凍結し、回折強度の測定に用いた。100Kの冷窒素気流中、波長1.0Å、振動角1.0°、カメラ距離170mmの条件で振動結晶法により回折強度の測定を行い、CCD検出器を用いてデータを収集した。データ処理はMosfilm/SCALAプログラムを用いて行った。その結果、分解能が約2.5Åの範囲で良好な回折像が得られ、空間群はP23あるいはP2(1)3、格子定数は $a = b = c = 202 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ と決定された。現在は、位相決定のために浸漬法による重原子誘導体結晶の調整条件の検討を行っている。

2-2. HmCP

活性酸素種のひとつ過酸化水素(H₂O₂)を分解する酵素であるヒドロペルオキシダーゼのうち、動物や微生物に存在するカタラーゼや植物から得られるペルオキシダーゼ(APX等)は結晶構造が明らかになっているが、真菌や原核微生物に広く分布するcatalase-peroxidaseは結晶化が困難であったためその立体構造はこれまで知られていなかった。当初、別種の好塩菌である*Halobacterium salinarum*から精製した酵素(HsCP)⁴⁾の結晶化を試みていたが、構造解析に適さない針状結晶しか得られなかった。そこで*H. marismortui*酵素(HmCP)に実験対象を変更し、結晶化条件をスクリーニングしたところ、4~5%のタンパク質濃度で、2.0 M 硫酸アンモニウム、0.5 M KCl、10mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.0)を結晶化剤とする蒸気拡散法により、20℃、1~2週間でヒシ型の板状結晶が再現性良く得られるようになった(図2)⁵⁾。

高エネルギー研究所放射光実験施設(Photon Factory: PF、つくば市)のBL6Aビームラインにおいて、得られたHmCP単結晶を用いた回折実験を行った⁶⁾。硫酸リチウムを抗凍結剤として100Kの低温窒素気流中で回折強度のデータを測定した。その結果、2.2Å-15.0Å分解能の範囲でデータ収集することができ、空間群C2、格子定数 $a = 317.7 \text{ \AA}$ 、 $b = 82.1 \text{ \AA}$ 、 $c = 75.1 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 100.2^\circ$ と決定された。また非対称単位中にHmCPサブユニット2分子(dimer)を含むことがわかった⁵⁾。

回折データの位相は、重原子(Pt)誘導体中のPtの異常分散効果を利用して決定した。HmCP単結晶を2 mMのK₂PtCl₄を含む母液中に一昼夜置くことでPt誘導体を得た。得られたPt置換体HmCP結晶について、Pt-L_{III}吸収端(1.0722 Å)、吸収ピーク(1.0718 Å)、リモート波長(0.9800 Å)の三波長で同様にデータ収集し、native結晶お

よびPt置換体結晶の回折強度データから異常分散差パターンマップを計算した。重原子座標と位相の決定後、ダイマー分子の電子密度の平均化と溶媒領域の電子密度の平滑化を経て分解能2.2Åでの構造を精密化した。36.5~2.2 Åの全反射強度データを用いて精密化を繰り返し、R因子を24%まで低下させた後、さらにMAD構造を元に、ダイマー分子中の対称性を考慮せずにnative構造の精密化を行った。最終的に、サブユニット1の18-294番アミノ酸残基と302-731番残基、サブユニット2の118-731番残基、およびタンパク質分子に結合した水分子と種々のイオンを含むHmCPの構造モデルが得られた(図3)^{7,8)}。

3. 結論

高度好塩菌から得られる好塩性タンパク質に共通する性質として、酸性アミノ酸残基の含量が高い(~20%)ことが以前から知られている。このことから、分子表面の酸性アミノ酸残基による強い水和水和が、ほぼ飽和濃度の塩溶液中でのタンパク質分子の塩析による不溶化・変性を抑えていると考えられていた。HmCPについても酸性アミノ酸(Asp+Glu)は全アミノ酸残基の19.7%を占め、特に分子の表面に露出しているアミノ酸残基に限ればその50%が酸性アミノ酸残基であり、この値は非好塩性の微生物のcatalase-peroxidaseにおける値の約2.5倍である。今回得られたHmCPの構造モデルは水1,390分子と塩化物イオン22を含んでいるが、一般的な可溶性の非好塩性タンパク質と比較して結合水の数に1.5倍程度と見積もられ、好塩性タンパク質における強い水和水和が実証された。塩素イオンは主として塩基性残基とペプチド結合中のアミド基に結合し、ペプチド構造の安定化に寄与しているものと考えられる。一方、タンパク質分子表面での酸性アミノ酸残基間に働く反発力に基づく静電ポテンシャルは高イオン強度条件下で低下し安定化する一方、逆にイオン強度の低下によってタンパク質分子の構造が不安定となることが予測される(図4)。このように、HmPCの構造に基づいてその塩適応現象をうまく説明できることがわかった。しかしながら、HmNiRについては含まれる酸性アミノ酸は全アミノ酸残基の13.3%であり、非好塩性のNiRと比較してほとんど違いがないことから²⁾、HmCPの場合とは異なり、従来の仮説によってはその塩適応現象を説明出来ないと考えられる。今後、HmNiRの結晶解析を進めその構造を明らかにすることで、好塩性タンパク質における塩適応の分子メカニズムを更に詳細に理解できるようになると期待している。

4. 参考文献等

- 1) Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E. & Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 39, 992-1000.

- 2) Ichiki, H., Tanaka, Y., Mochizuki, K., Yoshimatsu, K., Sakurai, T. & Fujiwara, T. (2001) Purification, characterization, and genetic analysis of Cu-containing dissimilatory nitrite reductase from a denitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. J. Bacteriol. 183, 4149-56.
- 3) 放射光共同実験採用課題 (2001G155) 「脱窒性古細菌*Haloarcula marismortui*の銅型亜硝酸塩還元酵素(CuNiR)の結晶構造解析」
- 4) Fukumori, Y., Fujiwara, T., Okada-Takahashi, Y., Mukohata, Y. & Yamanaka, T. (1985) Purification and properties of a peroxidase from *Halobacterium halobium* L-33. J. Biochem. 98, 1055-61.
- 5) Yamada, Y., Saijo, S., Sato, T., Igarashi, N., Usui, H., Fujiwara, T. & Tanaka, N. (2001) Crystallization and preliminary X-ray analysis of catalase-peroxidase from halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. Acta Cryst. D57, 1157-8.
- 6) 放射光共同実験採用課題 (99G108) 「好塩性古細菌のペルオキシダーゼにおける塩適応の蛋白質構造学的研究」、(2001G156) 「好塩菌KatGカタラーゼ・ペルオキシダーゼの結晶構造解析」
- 7) Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. & Tanaka, N. (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. Nature Struct. Biol. 9(9), 691-695.
- 8) 山田悠介、五十嵐教之、佐藤孝雄、藤原健智、田中信夫 「*Haloarcula marismortui* 由来catalase-peroxidase (HmCP)のX線結晶構造解析」 第74回日本生化学会大会

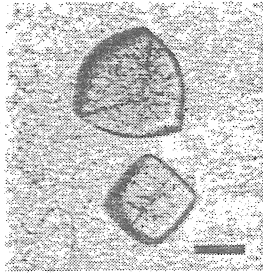


Fig. 1. *H. marismortui* nitrite reductase (HmNiR) crystal (bar:0.2mm).

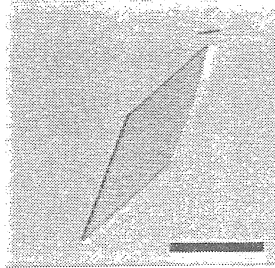


Fig. 2. *H. marismortui* catalase-peroxidase (HmCP) crystal (bar: 1mm).

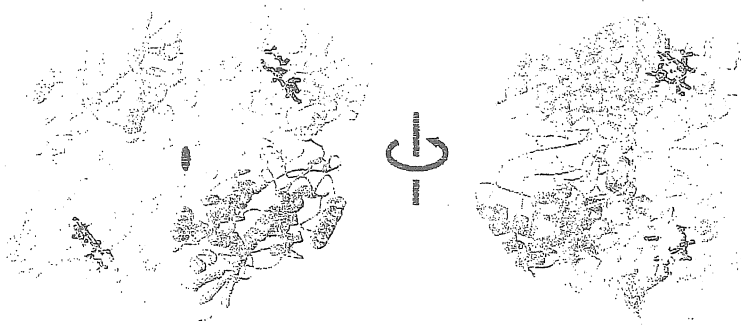


Fig. 3. Overall structure of *H. marismortui* catalase-peroxidase (HmCP) Two subunit (1:cyan and blue 2:yellow and orange) are related by non-crystallographic two-fold symmetry which is represented by a black ellipse. Red sticks represent heme *b*. Two orthogonal views of the structures are shown, related by 90 ° rotation around a vertical axis.

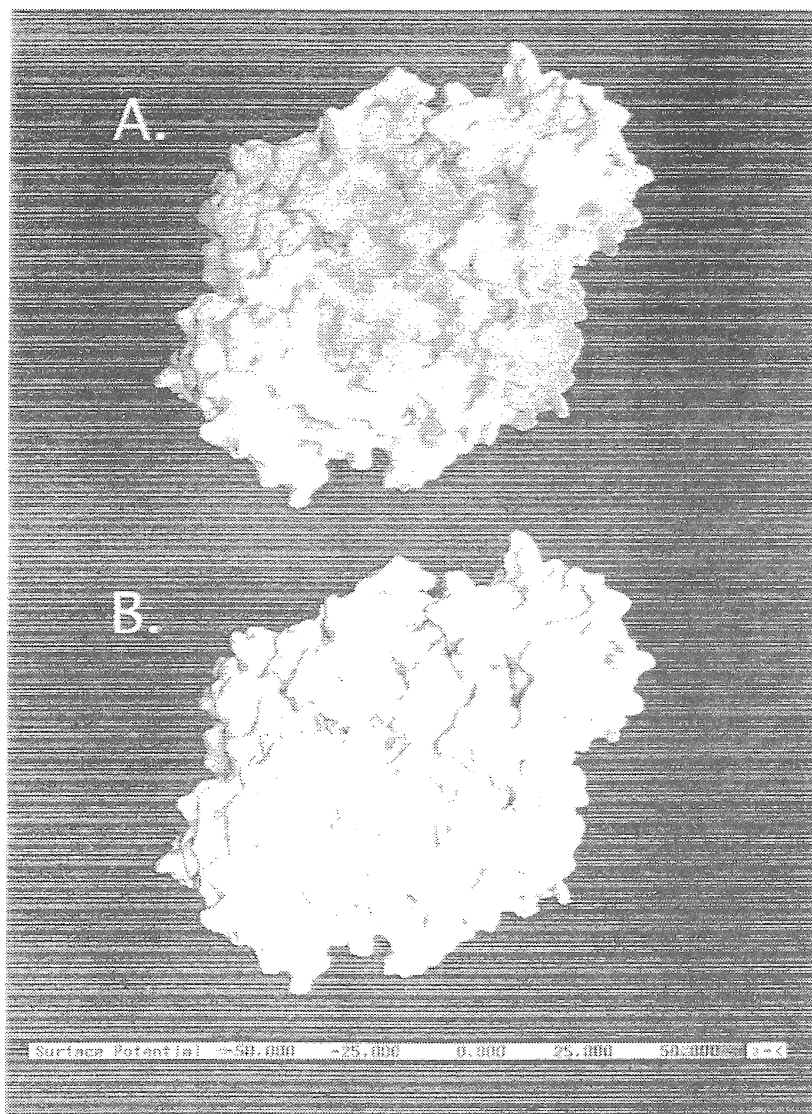


Fig. 4. Surface potential of *H. marismortui* catalase-peroxidase (HmCP) molecule. Ionic strength: 0 M (A), 2 M (B).

Structural analysis of the halophilic enzyme which requires
a high ionic strength for its stability and activity

Taketomo Fujiwara

Faculty of Science, Shizuoka University

Noriyuki Igarashi

Institute of Materials Structure Science,
High Energy Accelerator Research Organization

Summary

Catalase-peroxidase purified from an extremely halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*, is a typical halophilic enzymes that requires molar salts for its stability and enzymatic activity. We tried and succeeded in the X-ray structural analysis of the *H. marismortui* catalase-peroxidase (HmCP) crystal to understand the 'haloadaptation' based on the three dimensional structure of the halophilic enzymes.

The 2.0 Å crystal structure of HmCP clarified that the molecule is an assembly of two identical subunits, each of which is composed of two homologous halves, and four halves from the two subunits are packed together to make the pseudo-tetramer. As generally known in the halophilic proteins, a content of acidic (Glu and Asp) residues in the sequence of HmCP is very high (19.7 %). The crystal structure revealed that the ratio of the acidic residues on the surface of the HmCP molecule was accounted for more than 50%, in contrast to the value of about 20 % in the non-halophilic catalase-peroxidases. The result suggests that the 'haloadaptation' of the HmCP is achieved by recruiting anions to the protein surface to reduce the electrostatic potential in the high salt concentration. A large number of water molecules (1,360 moles per mole of HmCP) was bound with the acidic residues on the surface of HmCP dimer by the hydrogen-bonding, preventing the salting out and irregular aggregation of the proteins in the extreme salinity. The HmCP dimer also binds several decades of solvent ions, most of them were assigned as Cl⁻, from the crystallization solution in addition to the water molecules. They bind with basic residues or amide of the peptide chains to stabilize both of the peptide conformation and the association of subunits.