

発表番号 29 (0322)

## 分子構造に基づく好塩菌酵素の塩適応メカニズムの解明

助成研究者：藤原健智（静岡大学理学部）

塩湖等の、極めて高濃度の塩水環境は、一般の生物に対して致命的であるが、このような極限的環境にも特殊な微生物が適応し生息している。このような微生物の持つ酵素タンパク質は、その安定性や酵素活性に高濃度の塩を必須とする「好塩性」の性質をもつものが多い。

我々のグループはすでに、高度好塩菌 *Haloarcula marismortui* から得られた好塩性酵素 catalase-peroxidase (以下 HmCP) の結晶構造に基づき、タンパク質分子表面の酸性アミノ酸残基による強い水和や塩橋の形成が、高塩濃度環境でタンパク質の安定化に重要であることを示している<sup>1)</sup>。今回、更に2種の好塩性酵素タンパク質、HmNirK と HvCP について、精製・結晶化と構造解析を試みた。また、特に塩橋を構成する酸性アミノ酸残基をターゲットとして、HmCP への変異導入実験を計画した。

HmNirK (*H. marismortui* 亜硝酸塩還元酵素) を精製し結晶化を試みたところ、分解能 4 Å で回折像を与える結晶が得られた。また HmCP のオルソログである HvCP (*Haloferax volcanii* catalase-peroxidase) についても結晶が得られ、両者について結晶化条件や抗凍結剤のスクリーニングを現在行なっている。更に、好塩菌／大腸菌シヤトルベクター pWL102 を利用した HmCP 発現系を用い、これまでに HmCP の活性中心近傍への点変異導入(Tyr218→Ala)に成功している。

HmNirK と HvCP の結晶構造解析、および様々な変異 HmCP の分子的性質の分析を進めることで、好塩性タンパク質における塩適応の分子メカニズムが明らかになるものと期待している。

- 1) Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. & Tanaka, N. (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. Nature Structural Biology 9(9), 691-5.



## 分子構造に基づく好塩菌酵素の塩適応メカニズムの解明

藤原健智(静岡大学理学部)

## &lt;研究目的&gt;

高塩分濃度環境は、一般の真核生物やバクテリアに対して致命的である。そのため、腐敗や望ましくない副反応が起こりにくいという点で、高塩分濃度環境は生物生産への利用に有利であると言える。その一方、高浸透圧環境はそこに生息する微生物に対しても「塩適応」という特異な能力を要求する。すなわち、そのような微生物の持つ酵素タンパク質は、それ自体が高濃度の塩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という、「好塩性(halophilic)」の性質をもつものが多い<sup>1)</sup>。もし、有用酵素タンパク質を改変して好塩性の性質を付与することができるようになれば、味噌・醤油生産などの醸造以外にも、様々な生物生産に高塩分濃度環境を利用することが可能になるかもしれない。本研究は、好塩性タンパク質の結晶構造を元に、塩適応のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

好塩性タンパク質に共通する性質として、酸性アミノ酸(Asp+Glu)の含量が約20%と非常に高いことが以前から知られている。非好塩性の可溶性タンパク質では10-15%程度である。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塩析作用によるタンパク質分子の不溶化・変性を抑えているという仮説が提唱されていた<sup>1)</sup>。我々のグループはこれまでに、高度好塩性の微生物である *Haloarcula marismortui* に存在する好塩性酵素 catalase-peroxidase (以下 HmCP) の結晶構造を高分解能で解析することに成功している<sup>2)</sup>。HmCP においても、酸性アミノ酸は全アミノ酸の19.7%を占め、特に分子表面に露出しているアミノ酸残基の50%が酸性アミノ酸であり、パッチ状のクラスターを形成していた。低イオン強度条件下では分子表面での酸性アミノ酸残基間に働く反発力によって HmCP 分子は不安定となるが、高イオン強度下では静電ポテンシャルは低下し安定化される(図1)。また、得られた HmCP の構造モデル中には1,390分子の水分子が含まれているが、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1.5倍程度と見積もられた。これらの結果は、好塩性タンパク質特有の性質を、その分子構造と関連付けて説明する上の仮説とよく一致する。

さらに HmCP 結晶には、22分子の Cl<sup>-</sup>イオンと6分子の SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンが結合していた(図2)。HmCP に続いて結晶構造が解析された *Burkholderia pseudomallei* 由来の非好塩性 catalase-peroxidase には、タンパク質主鎖のフォールディングが HmCP と相同であるにもかかわらず、結合塩類は存在しない<sup>3)</sup>。HmCP 分子中の Cl<sup>-</sup>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンは、そのほとんどが分子表

面あるいはサブユニット界面に位置し、解離性残基や主鎖のアミド基と結合しており、さらにその一部は塩橋を形成していた(図2)。このような構造は、別種の高度好塩菌である *Haloflex volcanii* 由来の好塩性リンゴ酸脱水素酵素中にもその存在が報告されており、塩橋形成もまた、タンパク質の高塩濃度環境での安定化に大きく寄与していると考えられる<sup>4)</sup>。

ところがその一方で、*Haloflex volcanii* から精製・結晶化され構造解析が行なわれた好塩性ジヒドロ葉酸還元酵素の分子モデルには、上で述べたような酸性アミノ酸クラスターや塩橋等の構造上の特徴はみられない<sup>5)</sup>。従って、塩適応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、あるいは好塩性タンパク質への変異導入による構造変化を解析すること、等が必要となる。今回、我々は新たに2種の好塩性酵素タンパク質について、精製・結晶化とその構造解析を試みた。また、特に塩橋を構成する酸性アミノ酸残基をターゲットとする HmCP への変異導入実験を計画した。

## <方法と結果>

### 1. *Haloarcula marismortui* 亜硝酸塩還元酵素の結晶構造解析

亜硝酸塩還元酵素は、微生物による脱窒素反応に関与する酸化還元酵素であり、亜硝酸塩( $\text{NO}_2^-$ )を一酸化窒素( $\text{NO}$ )に還元する活性を持つ。高度好塩菌 *H. marismortui* から精製された亜硝酸塩還元酵素(以下 HmNirK)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<sup>6)</sup>。HmNirK 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という、典型的な好塩性タンパク質としての性質を持つ。反応液中の $\text{Na}^+$ イオンを $\text{K}^+$ や $\text{Li}^+$ に、あるいは $\text{Cl}^-$ イオンを $\text{NO}_3^-$ や $\text{SO}_4^{2-}$ に置き換えても十分な活性を示すことから、HmNirKの安定性や活性にはイオンの種類は関係なく、イオン強度のみが重要であると考えられる。またHmNirKでは、酸性アミノ酸の全アミノ酸残基に対して占める割合は13.3%である。この値は、非好塩性菌由来の相同酵素と比較してほとんど違いがなく、HmNirKが示す好塩性を従来の説によっては説明することはむずかしい。そこで、HmNirKの結晶解析を行ない、その構造を明らかにすることを目的として実験を行なった。

HmNirKの精製は、少なくとも2M以上の塩の共存下に、各種のカラムクロマト操作により行なった。得られた精製標品を用いて、硫酸アンモニウムを結晶化剤とする蒸気拡散法により結晶化を試みたところ、図3に示す立方体状の結晶が得られた。得られたHmNirK結晶の回折実験を、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設(KEK-PF)のビームラインを利用して行った<sup>7)</sup>。抗凍結剤としてショ糖を用い、液体窒素で急速凍結した後回折強度を測定した結果、分解能が約4 Åで回折像が得られ、空間群はP222、格子定数 $a = b = c = 202$  Å、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ と決定された。しかし、凍結操作時に結晶母液中に析出する塩によるノイズのため、それ以上の解析はできなかった。現在は、母液と抗凍結剤の組成をスクリーニングして、最適測定条件を探っている。

## 2. *Haloferax volcanii* catalase-peroxidase の結晶構造解析

catalase-peroxidase は可溶性のヘムタンパク質であり、有毒な活性酸素種のひとつである過酸化水素の分解除去を行なう酵素、ヒドロペルオキシダーゼの一種である。上述の *H. marismortui* を含め種々の高度好塩菌に存在するが、そのアミノ酸配列を比較したところ、HmCP において Cl<sup>-</sup> または SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> イオンと結合しているアミノ酸残基の多くが、他の高度好塩菌の catalase-peroxidase では保存されていないことがわかった。そこで別の高度好塩菌 *Haloferax volcanii* の catalase-peroxidase (以下 HvCP) の結晶構造を明らかにし、HmCP の構造と比較検討することとした。

精製 HvCP の結晶化は、HmCP の場合とほぼ同様に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なった。その結果、アミノ酸配列の著しい相同性にもかかわらず、HmCP とは全く異なる、厚みのある六角板状の結晶が得られた(図4)。得られた HvCP 結晶の回折実験は、HmNirK と同様、KEK-PF のビームラインを利用して行ったが、これまでのところ 10 程度のシグナルしか得られていない。現在、結晶化条件や抗凍結剤の組成などのスクリーニングを改めて行なっている状況である。

## 3. HmCP 過剰発現系

アミノ酸残基や主鎖アミド基と塩類との結合、さらに塩橋構造の形成は、タンパク質の塩適応に大きく寄与しているらしい。これを直接確かめるためには、塩イオンと結合しているアミノ酸残基を、別のアミノ酸に置換した変異タンパク質を作る必要がある。ところが好塩性酵素タンパク質はその特徴ゆえに、大腸菌等を用いる通常の発現系を用いて発現させることは一般にはできない。しかし *Haloferax* 属の好塩菌と大腸菌とのシャトルベクター pWL102 を用いることで、HmCP の過剰発現に成功した。このベクターは、大腸菌と好塩菌双方の複製開始点、アンピシリン耐性遺伝子、およびプラバスタチン耐性遺伝子を含む(図5)<sup>8)</sup>。このベクターに HmCP 遺伝子をそのプロモーターごと組み込み、*Haloferax volcanii* を形質転換したところ、ベクター導入株では 5-10 倍の HmCP が発現していた。この系を用いることで点変異導入が可能となる。これまでに、HmCP の活性中心近傍への点変異導入(Tyr218 Ala)に成功しており、得られた変異 HmCP は予想された機能変化を示した。

### < 結論と展望 >

HmNirK については対称性の高い結晶が得られているので、塩の析出を抑えられる条件が見つかれば、構造解析はおそらく可能であろう。一方、現在得られている HvCP 結晶ではその解析は困難であるので、さらに結晶化条件の検討が必要である。

HmCP 分子中で塩橋を構成するアミノ酸残基への変異導入実験は、構築した HmCP の過剰発現系を用いて今後進めていきたい。具体的には、塩橋を作っているアミノ酸残基のうち、好塩菌 catalase-peroxidase 間でよく保存されている Ser212 と Asn236 へ点変異を導入し(図2 参照)、

それによる構造安定性の変化を解析することを計画している。

HmNirKとHvCPの結晶構造解析、および様々な変異HmCPの分子的性質の分析を進めることで、好塩性タンパク質における塩適応の分子メカニズムが明らかになるものと期待している。さらに、タンパク質における塩適応の解明は、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考えている。

< 謝辞 >

本研究を遂行するにあたり、御支援を賜りましたソルト・サイエンス研究財団に深謝いたします。

< 参考文献 >

- 1) Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-8.
- 2) Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. and Tanaka, N. (2002) The 2.0 crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Struct. Biol.* 9(9), 691-5.
- 3) Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P.C. and Fita, I. (2003) Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 resolution. *J. Mol. Biol.* 327(2), 475-89.
- 4) Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E. and 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.
- 5) Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. and Herzberg, O. (1998) Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* 6(1), 75-88.
- 6) Ichiki, H., Tanaka, Y., Mochizuki, K., Yoshimatsu, K., Sakurai, T. and 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.
- 7) 放射光共同実験採用課題 (2003G125)「好塩菌 *Haloarcula marismortui* 由来の KatG カタラーゼ・ペルオキシダーゼの結晶構造解析」
- 8) Lam, W.L. and Doolittle, W.F. (1989) Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86(14), 5478-82.

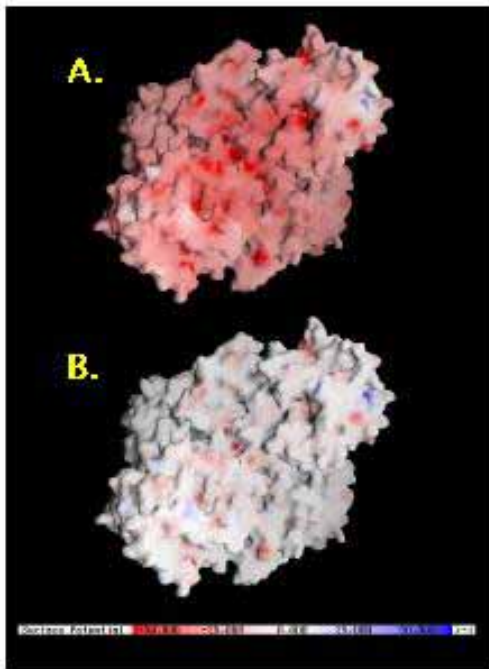


Fig. 1. Surface potential of HmCP, a halophilic catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui* ionic strength: 0M (A), 2M (B).

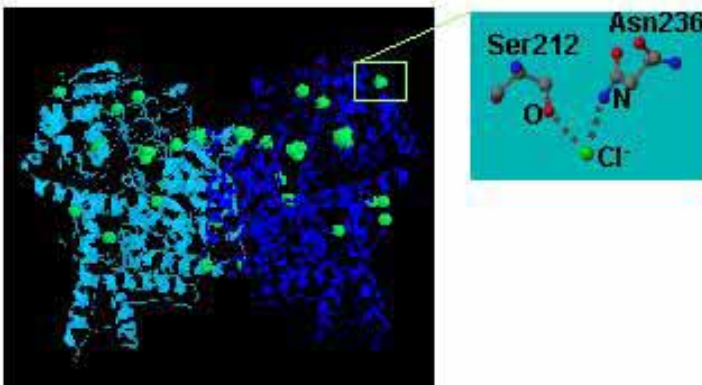


Fig. 2. Crystal structure of HmCP. Six  $\text{SO}_4^{2-}$  ions and 16  $\text{Cl}^-$  ions are coordinated by side chains or make hydrogen bonds with amide groups of the main chain. Salt-bridge was constructed by coordination of  $\text{O}_\gamma$  atom (Ser212) and  $\text{N}_\delta$  atom (Asn236) to a  $\text{Cl}^-$  ion.

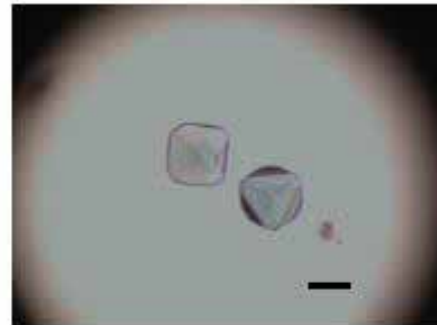


Fig. 3. Crystal of *H. marismortui* nitrite reductase (HmNirK). Bar: 0.1mm

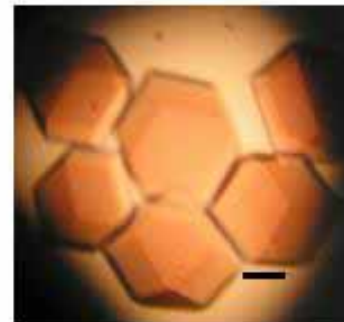


Fig. 4. Crystal of *Haloferax volcanii* catalase-peroxidase (HvCP). Bar: 0.2mm

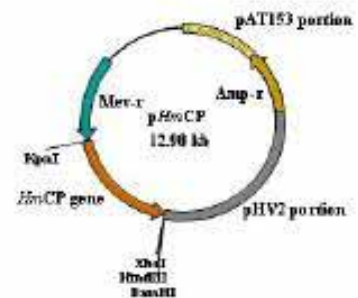


Fig. 5. A HmCP over-expression vector pHmCP was constructed from *Haloferax-Escherichia coli* shuttle vector pWL102.

Elucidation of salt adaptation mechanism of halophilic enzymes  
based on the protein structure

Taketomo Fujiwara

(Department of Biology and Geosciences, Faculty of Science, Shizuoka University)

Summary

Some microbes are adapted to living in the extreme saline conditions which are fatal to the common organisms, such as salt lake or salt pond. In such microbes, the proteins generally show the feature of 'halophilicity' which reveals the requirement of high concentration of salts for the stability and/or the functional activity.

Based on the crystal structure of catalase-peroxidase (HmCP) from extremely halophile *Haloarcula marismortui*, we have proposed that the strong hydration and salt-bridge formation by the acidic residues on the protein surface would be important to the stability of the protein<sup>1)</sup>. In this study, we tried purification, crystallization and structural analysis of additional two sorts of halophilic enzymes, *H. marismortui* nitrite reductase (HmNirK) and *Haloferax volcanii* catalase peroxidase (HvCP). Moreover, we planned the point-mutation experiment targeting the salt-bridge structure in the HmCP molecule.

The HmNirK crystal obtained in this study gave X-ray diffraction image with 4Å resolution. The crystal of HvCP, an orthologue of HmCP, was also obtained. Crystallization condition and anti-freezing reagent composition are now optimizing for both of the enzymes. Furthermore, by utilizing the *Haloferax-Escherichia coli* shuttle vector pWL102, we succeeded in introducing the point-mutation (Tyr218 ->Ala) to the amino acid residue neighboring the catalytic center of HmCP. Molecule mechanism of salt adaptation is expected to become clear by advancing the structural analysis and the mutation experiment of the halophilic proteins.

- 1) Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. & Tanaka, N. (2002) The 2.0 crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Structural Biology* 9(9), 691-5.