

助成番号 0720

## *Micrococcus luteus* K-3 株由来耐塩性グルタミナーゼの 耐塩性に貢献するアミノ酸残基の特定

吉宗 一晃<sup>1</sup>, 白木原 康雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門, <sup>2</sup>国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター

**概要【緒言】** 通常の酵素は高濃度食塩存在下で活性が低下するため、高濃度食塩の有無にかかわらず高い耐塩性を有する耐塩性酵素は工業的に非常に有用である。*Micrococcus luteus* K-3 株由来耐塩性グルタミナーゼは研究例の少ない耐塩性酵素の一つであるが、その耐塩化機構は不明である。この耐塩化機構を検討するために *Micrococcus* グルタミナーゼの立体構造解析を試み、その耐塩性に貢献するアミノ酸残基の特定を試みた。これまでに断片型 *Micrococcus* グルタミナーゼの部分的な立体構造を決定したが、その全体構造は解析されていない。本研究ではこの全体構造を明らかにするため、新しい結晶化条件を探索し、得られた結晶を用いて立体構造解析を行った。

**【結果と考察】** Tris(hydroxymethyl)aminoethane (トリス) が *Micrococcus* グルタミナーゼの活性及び耐塩性を向上させることを初めて明らかにした。さらにトリスを結晶化溶液に添加することで、トリス非存在下でディスオーダーする 377 番目から 405 番目のアミノ酸残基の立体構造を明らかにすることが出来た。また、トリスの結晶化溶液への添加によって生成物グルタミン酸と酵素の複合体の構造を明らかにできた。構造解析の結果、活性中心近傍に存在する Tyr27 はトリス添加によってその主鎖の位置が変わること及び、生成物グルタミン酸の有無でその側鎖は大きく動くことが分かった。*Micrococcus* グルタミナーゼは大きく分けて N 末端ドメインと C 末端ドメインからなるが、C 末端ドメインの位置もトリス添加による影響を受けることを示した。このことからトリスが N 末端ドメインに対する C 末端ドメインの位置を変えることで、1 から 26 番目のアミノ酸残基を通じて Tyr27 の動きに影響を与え、*Micrococcus* グルタミナーゼの活性及び耐塩性に影響を与えている可能性が考えられた。

### 1. 研究目的

一般に酵素は高濃度食塩存在下でその活性が急激に低下する。一方で 3 M 以上の高濃度食塩が存在する環境に好んで生育する高度好塩菌の存在が知られている<sup>1)</sup>。このような高度好塩菌は過剰な浸透圧を生じさせないため周囲の食塩濃度とほぼ等しい内部塩濃度を維持している。このため高度好塩菌が持つ酵素は高濃度食塩環境に適応した好塩酵素である。好塩酵素は一般の酵素とは逆に高濃度食塩非存在下でその構造が維持できなくなり失活するものが多く知られている。耐塩性酵素は高濃度食塩の有無に係わらず活性を示す酵素で幅広い食塩濃度範囲で機能する為、産業的にも有用である。しかし高度好塩菌か

ら高い頻度で得られる好塩性酵素の場合と比較して耐塩性酵素の報告例は非常に少なく、その耐塩化機構に関する研究例は少ない。*Micrococcus luteus* K-3 株由来耐塩性グルタミナーゼ (*Micrococcus* グルタミナーゼ) は耐塩性酵素である。約 48 kDa の分子質量を持つ *Micrococcus* グルタミナーゼはセリンプロテアーゼで限定分解を受けると約 40 kDa の断片型酵素となる<sup>2)</sup>。申請者らはこれまでに断片型酵素の立体構造を明らかにしたが<sup>3)</sup>、*Micrococcus* の全体構造は明らかになっていない。*Micrococcus* グルタミナーゼ相同タンパク質である *Bacillus subtilis* 及び、*Escherichia coli* 由来グルタミナーゼの立体構造が明らかにされている<sup>4)</sup>。これらのグルタミナーゼの立体構造と

*Micrococcus* グルタミナーゼのものを比較するために *Micrococcus* グルタミナーゼの全体構造が求められる。耐塩性を有する *Micrococcus* グルタミナーゼだけが持つ立体構造上の特徴を明らかにし、*Micrococcus* グルタミナーゼの耐塩化機構を検討することを目的として *Micrococcus* グルタミナーゼ全体の立体構造解析を試みた。*Micrococcus* グルタミナーゼの全体構造と耐塩性を持たない *Bacillus* グルタミナーゼの立体構造を比較することによって耐塩性酵素に必要な特徴を考察できるだけでなく、耐塩性を持たない酵素の耐塩性を向上させる技術開発に貢献できることが期待される。

## 2. 実験方法

### 2.1 グルタミナーゼ活性測定方法

グルタミナーゼ反応は 50 mM 緩衝液、30 mM L-グルタミンを含む反応液に酵素溶液を加えて、30°C で 10 分間反応させた。3 分間の煮沸により反応を停止させた後、この反応液中の L-グルタミン酸濃度をグルタミン酸脱水素酵素 (GIDH) を用いて定量した<sup>2)</sup>。比活性は蛋白 mg あたりの単位数で表した。蛋白濃度は、標準として卵白アルブミンを用い、Lowry らの方法に従って測定した。Tris (hydroxymethyl)aminoethane (トリス) を添加する際は、添加するトリスの pH を反応系の pH と等しくなるように pH メーターを用いて調製した。反応に用いた緩衝液は pH 6 から 8 ではリン酸カリウム、pH 8.5 ではトリシン、pH 9 から 10 では CHES を用いた。

### 2.2 *Micrococcus* グルタミナーゼの立体構造解析

*Micrococcus* グルタミナーゼは既存の方法に従って大腸菌で大量発現させ、DEAE-トヨパール、ブチルトヨパールにより精製を行った<sup>2)</sup>。結晶条件のスクリーニングはクリスタルスクリーンキット(ハンプトンリサーチ社)を用いたマイクロバッチ法により行った。結晶が得られた条件でハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行うとともに、pH、沈殿剤濃度を変え回折データ収集に適した結晶化条件を決定した。回折データ収集は Photon Factory の PF-AR NW12 もしくは PF BL6A で行った。

## 3. 結果

### 3.1 トリスによる活性化

*Micrococcus* グルタミナーゼの活性はトリスを添加するこ

とで上昇した(図 1)。トリスによる活性化効果は pH 依存的に現れ、pH 7.5 から pH 8.5 の間でのみ活性化が見られた。さらに活性測定の際にトリスを用いるとその耐塩性も上昇した為、トリスが *Micrococcus* グルタミナーゼの構造に何らかの影響を与える可能性も考えられた。トリス結合型 *Micrococcus* グルタミナーゼの立体構造解析を行うことで、トリスによる活性化機構だけでなくトリス添加による耐塩化機構も考察できる可能性がある。

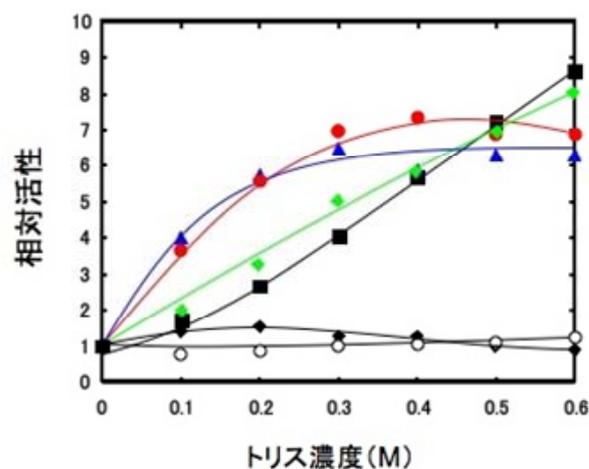


図 1. *Micrococcus* グルタミナーゼ活性に対するトリスの影響  
トリスの影響を pH 6.5 (◆)、pH 7.0 (■)、pH 7.5 (▲)、pH 8.0 (●)、pH 8.5 (◆) もしくは、pH 9.0 (○) で測定した。トリス非存在下におけるタンパク質 1 mg あたりの比活性を 1 とした相対活性を示した。

### 3.2 結晶化

クリスタルスクリーンキットを用いた条件検討の結果、今回新たに *Micrococcus* グルタミナーゼの新しい結晶化条件を見出すことが出来た。*Micrococcus* グルタミナーゼはタンパク質濃度 (10 mg/ml)、15% PEG4,000、50 mM HEPES (pH 7.5)、0.1 M 酢酸ナトリウムで 25°C、5 日間で結晶が得られた。ハンギングドロップ蒸気拡散法ではリザーバ液の PEG4,000 の濃度を 27% 以上にした場合にのみ結晶が得られた。0.1 M 酢酸ナトリウムは本酵素の結晶化に必要な不可欠であった。この結晶化条件において本酵素の生成物であるグルタミン酸を 0.2 M 添加しても結晶が得られた。さらに本酵素を活性化させるトリスとグルタミン酸を各 0.2 M 添加すると pH 7 から pH 10 までの広い範囲で結晶が得られた。

## 3.3 回折データ収集および構造決定

今回新しく明らかにした結晶化条件から得られた結晶 (WILD) に加え、0.2 M グルタミン酸を添加した結晶 (GLU)、0.3 M トリスを添加した結晶 (TRIS) 及び、その両者を添加した結晶 (TRIS + GLU) の回折強度データ及び、精密化の統計値を表 1 に示す。全ての結晶の空間群は C2 で、非対称単位当り 2 分子存在した。0.2 M グルタミン

酸を添加した結晶 (GLU) や 0.3 M トリスを添加した結晶 (TRIS) から非添加の結晶 (WILD) とほぼ同等の良好な回折強度データが得られた。また結晶化溶液に 0.3 M トリス及び 0.2 M グルタミン酸を添加 (TRIS+GLU) すると溶液の pH を 10 にしても 2.6 Å の分解能が得られる結晶を得ることができた (表 1)。断片型 *Micrococcus* グルタミナーゼの構造を用いた分子置換法により位相を決定してモデルを

表 1. 回折強度データ及び、精密化の統計値

	WILD, pH 7.5	TRIS + GLU, pH 7.2	TRIS + GLU, pH 8.0
Resolution	2.3 Å	2.3 Å	2.3 Å
Rmerge	0.111 (0.546)	0.134 (0.522)	0.127 (0.547)
Completeness	100 (99.9)	99.3 (97.6)	97.8 (94.1)
Multiplicity	3.6 (3.6)	3.1 (2.8)	3.4 (3.3)
Rfree	0.292	0.269	0.261
Rwork	0.248	0.239	0.223
Ramachandran plot			
Most favored	88.4	86.8	87.0
Additional allowed	10.9	12.3	12.0
Generously allowed	0.7	0.9	1.1
Disallowed	0	0	0
	TRIS + GLU, pH 7.5	GLU, pH 10	TRIS, pH 7.0
Resolution	2.6 Å	2.5 Å	2.5 Å
Rmerge	0.100 (0.416)	0.121 (0.465)	0.124 (0.492)
Completeness	92.2 (92.1)	98.3 (99.8)	98.4 (98.0)
Multiplicity	2.5 (2.5)	3.5 (3.5)	3.7 (3.7)
Rfree	0.318	0.318	0.256
Rwork	0.280	0.285	0.228
Ramachandran plot			
Most favored	82.7	84.5	86.7
Additional allowed	15.9	14.0	11.8
Generously allowed	1.4	1.4	1.4
Disallowed	0	0	0
	TRIS, pH 7.5	TRIS, pH 8.5	
Resolution	2.5 Å	2.3 Å	
Rmerge	0.117 (0.457)	0.104 (0.555)	
Completeness	95.3 (93.7)	99.8 (99.9)	
Multiplicity	2.6 (2.4)	3.6 (3.6)	
Rfree	0.256	0.253	
Rwork	0.245	0.230	
Ramachandran plot			
Most favored	86.5	86.9	
Additional allowed	11.9	12.2	
Generously allowed	1.6	0.9	
Disallowed	0	0	

括弧内は最高分解能での値

構築することができた。

これまでに断片型 *Micrococcus* グルタミナーゼの立体構造が明らかになっていたが、今回新しい結晶条件を見出した。従来の断片酵素の立体構造では 355 から 405 番のアミノ酸残基がディスオーダーしていた。新しい結晶化条件ではディスオーダーしていた 376 から 404 番のアミノ酸残基の構造を決定することができた。さらにこの結晶化条件に 0.3 M トリスを加えてできた結晶からは、新しい結晶条件でもディスオーダーしていた 355 から 377 番のアミノ酸残基領域の構造を決定できた(図 2)。

また、0.2 M グルタミン酸を含む結晶から得られたデータを用いてもディスオーダーしやすい 355 から 405 番のアミノ酸残基を決定できた。断片型酵素の立体構造と部位特異的変異導入酵素の実験結果から *Micrococcus* グルタミナーゼの活性中心残基はセリン 64、リジン 67 と予想されていた(図 3)。0.2 M グルタミン酸を含む結晶データからは予想される活性中心残基付近に Fo-Fc MAP で強いピークを得ることができなかった。しかし 0.2 M グルタミン酸及び 0.3 M トリス存在下で結晶化させた結晶から得られた電子密度図には予想される活性中心部位にグルタミン酸と思われる強いピークが存在し、グルタミン酸酵素複合体の立体構造

モデルを作製することができた(図 4)。このことからトリスは *Micrococcus* グルタミナーゼの活性中心に影響を与えて、その活性及び耐塩性を高めることも予想された。

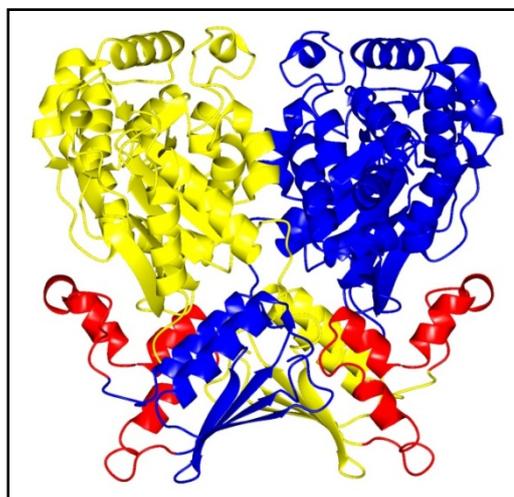


図 2. 二量体の立体構造

二量体の *Micrococcus* グルタミナーゼの主鎖構造を青と黄色のリボン図で示した。今回新たに明らかにしたペプチド領域(355 から 405 番目のアミノ酸残基)の構造を赤で示した。

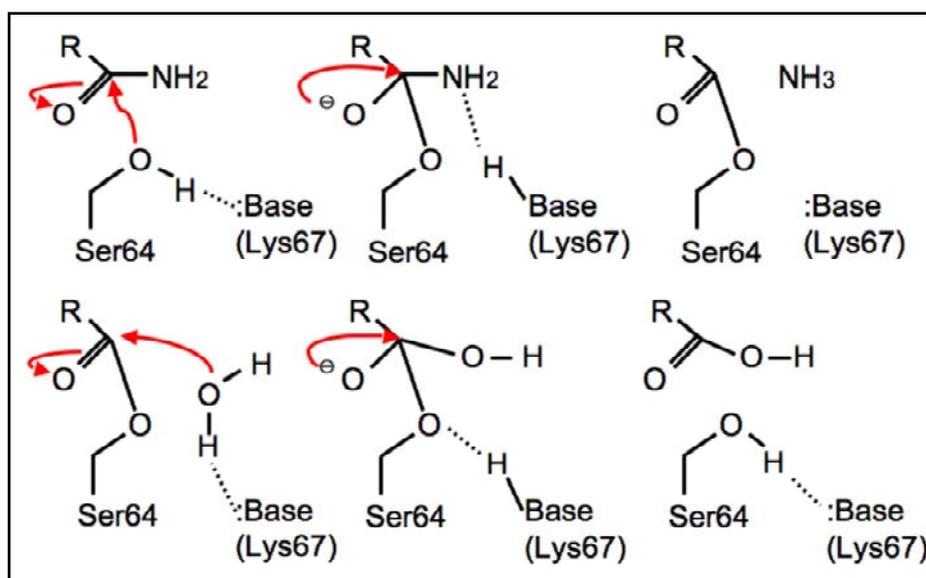


図 3. 予想される反応機構

予想される活性中心残基であるセリン 64 とリジン 67 が関与するグルタミナーゼ反応を示す。左上から右へ向けて、基質グルタミンのアミドが酵素のセリン 64 によって求核攻撃されアンモニアが遊離する過程を図示した。左下から右方向は加水分解される過程を図示した。

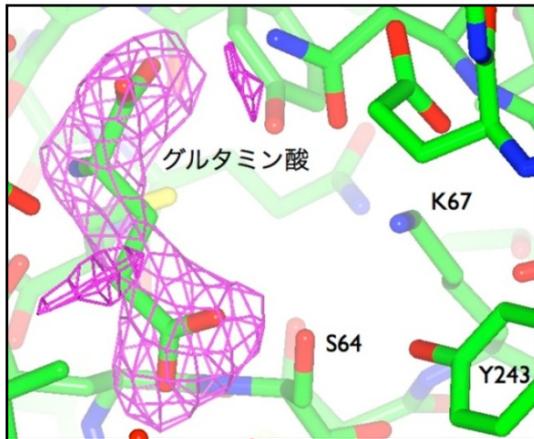


図4. グルタミン酸複合体の活性中心

活性中心残基(S64, K67, Y243)近傍のモデル。グルタミン酸を含まないモデルで計算した Fo-Fc 電子密度図(+4 シグマ)をマゼンタで示す。

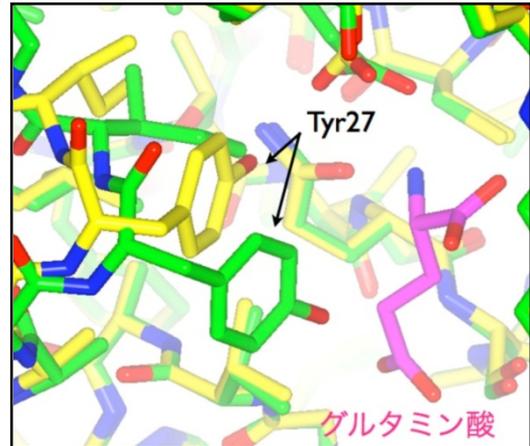


図5. Tyr27 に対する生成物グルタミン酸の影響

生成物グルタミン酸をマゼンタ、生成物グルタミン酸添加時の構造を緑色、無添加時の構造を黄色で示した。Tyr27 の位置は生成物グルタミン酸の有無で相対的に大きく変化する。

#### 4. 考察

立体構造解析の結果、*Micrococcus* グルタミナーゼは 1 から 300 番目のアミノ酸残基からなる N 末端ドメイン、301 から 355 番目及び 405 から 450 番目のアミノ酸残基からなる C 末端ドメイン及び、トリス非存在下でディスオーダーする不安定なドメインから構成されることが分かった。トリスとグルタミン酸を同時に添加した結晶からは酵素グルタミン酸複合体の立体構造が得られた。今回明らかにした立体構造の N 末端ドメインを重ね合わせたところ、グルタミン酸の有無で活性中心付近の Tyr27 が相対的に大きく動くことが示された(図5)。Tyr27 側鎖の酸素原子は生成物グルタミン酸のアルファカルボキシル基の酸素原子と 3.6Å の距離にある。このため Tyr27 は活性発現の際に基質結合に関する機能を持つと考えられる。

主鎖だけを比較すると、C 末端ドメインはグルタミン酸の有無やトリスの有無で全体的に動く。この C 末端ドメインは二量体の他方の分子の 1 から 4 番目のアミノ酸残基と近い位置にあり協同して動いている可能性がある(図6)。N 末端ドメインの中で Tyr27 のある 1 から 34 番目のアミノ酸残基はトリスの有無で相対的に大きく動いている(図7)。このためトリスは C 末端の動きに影響を与え、1 から 34 番目のアミノ酸残基を通じて Tyr27 の動きを制御することで *Micrococcus* グルタミナーゼの活性化及び耐塩化に貢献している可能性も考えられた。



図6. C 末端ドメインと Tyr27

*Micrococcus* グルタミナーゼの二量体は緑と赤で示した分子及び、水色と青の分子から構成される。青で示した C 末端ドメインはトリス添加で動くが、この動きは赤で示した 1 から 30 番目のアミノ酸残基を介して活性発現に重要だと思われる Tyr27 に影響する可能性がある。

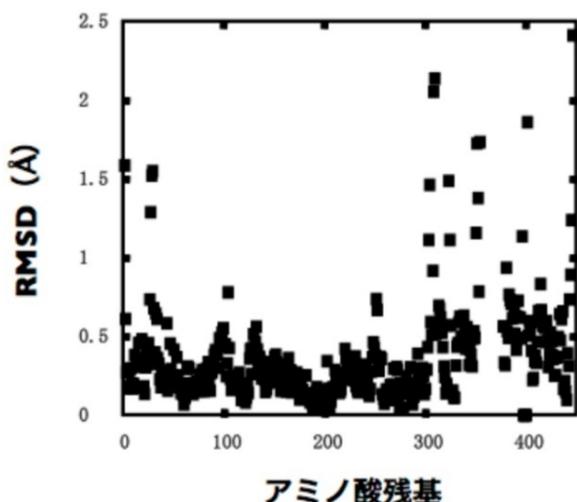


図7. 主鎖構造に対するトリスの影響

トリス添加による構造変化をRMSDで示した。1から305残基までのN末端ドメインでは1から34番目のアミノ酸残基の位置でRMSDが大きい。C末端ドメインは平均的にRMSDが大きい。355から377番目のアミノ酸残基はトリス無添加の結晶でディスオーダーしているため示されていない。

## 5. まとめ

*Micrococcus* グルタミナーゼの活性及び耐塩性を向上させるトリスを結晶化溶液に添加したことで、トリス非存在下でディスオーダーする377番目から405番目のアミノ酸残基の立体構造を明らかにすることが出来た。さらにトリスの添加によって生成物グルタミン酸と酵素の複合体の構造を明らかにできた。構造解析の結果、Tyr27は生成物グルタミン酸の有無で相対的に大きく動くことから活性に関与すると考えられた。トリス添加によってC末端ドメインはN末端ドメインに対して動くが、C末端ドメインが1から26番目のアミノ酸残基を通じてTyr27の動きに影響を与え、*Micrococcus* グルタミナーゼの活性及び耐塩性に影響を与えている可能性が考えられた。

## 参考文献

- 1) Tehei M, Zaccai G. Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in complex systems. *Biochim Biophys Acta*. (2005) 1724(3) 404-410.
- 2) Yoshimune K, Yamashita R, Masuo N, Wakayama M, Moriguchi M. Digestion by serine proteases enhances salt tolerance of glutaminase in the marine bacterium *Micrococcus luteus* K-3. *Extremophiles*. (2004) 8(6) 441-446.
- 3) Yoshimune K, Shirakihara Y, Shiratori A, Wakayama M, Chantawannakul P, Moriguchi M. Crystal structure of a major fragment of the salt-tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *Biochem Biophys Res Commun*. (2006) 346(4) 1118-1124.
- 4) Brown G, Singer A, Proudfoot M, Skarine T, Kim Y, Chang C, Dementieva I, Kuznetsova E, Gonzalez CF, Joachimiak A, Savchenko A, Yakunin AF. Functional and structural characterization of four glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. (2008) 47(21) 5724-5735.

No. 0720

## Determination of Amino Acid Residues Responsible for Salt-Tolerant Mechanisms of Glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3

Kazuaki Yoshimune<sup>1</sup>, Yasuo Shirakihara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Genome-based Biofactory,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

<sup>2</sup>Structural Biology Center, National Institute of Genetics

### Summary

Glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3 (*Micrococcus* glutaminase) is a salt-tolerant enzyme that shows 40% residual activity even in 3 M NaCl. Though the crystal structure of the fragment of *Micrococcus* glutaminase consists of N-terminal and C-terminal domains has been determined, the overall structure of the intact glutaminase has been unknown. To investigate its salt-tolerant mechanisms in detail, its overall structure was determined. An addition of 0.3 M Tris(hydroxymethyl)aminoethane (Tris), which increases the enzyme activity and its salt-tolerance, to crystallization solution was a determinant to obtain crystals for the overall structure determination. Furthermore, a structure of the intact glutaminase which had been co-crystallised with its product glutamine reveals a movement of Tyr27 to bind its product glutamic acid, for which electron density was observed. By the addition of Tris, the C-terminal domain moved to affect the position of Tyr27 through 1-34 amino acid residues. These results suggest that Tris activate *Micrococcus* glutaminase by influencing the position of Tyr27 in the active site through the movement of C-terminal domain and 1-34 amino acid residues.