

助成番号 0817

好塩菌由来 DNA/RNA 結合タンパク質の高塩濃度環境適応メカニズムの同定

古賀 雄一, 高野 和文, 金谷 茂則

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻

概要 本研究では、極限環境生物として、好塩菌(古細菌)に着目し、好塩菌が生産する好塩性酵素の高塩濃度環境下への適応機構を明らかにすることを目的とした。高塩濃度環境はタンパク質の不安定化の要因になりうるだけでなく、酵素と基質の静電的な相互作用を阻害する要因ともなりうる。好塩性酵素の高塩濃度耐性機構を明らかにすることは、タンパク質の極限環境への適応に関する新たな知見を与える可能性があり、また、食品加工産業などの産業への応用も期待できる。この目的のために、本研究では構造と機能の相関関係を探るためのモデルとして適していると考えられる好塩性古細菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株由来 RNase HI を対象とし、本酵素の耐塩構造と機能の相関を解析した。

塩濃度による活性の低下を Halo-RNaseHI と Eco-RNaseHI の間で比較した。低濃度領域では、Halo-RNaseHI の比活性は Eco-RNaseHI の 1/100 程度であったが、塩濃度の上昇によっても比活性の値はほぼ 100% 保持されており、4 M 塩濃度存在下でも宿主の生育に必要な活性を保持していると考えられた。一方、Eco-RNaseHI は、1.45 M 以上の高濃度塩存在下では、比活性が Halo-RNaseHI の 1/5 以下に減じることが明らかとなり、Halo-RNaseHI の耐塩機構の存在が明らかとなった。しかし、CD 測定による安定性解析の結果、塩濃度の増加は Eco-RNaseHI の構造安定性には影響しておらず、酵素活性の低下は別の要因によるものと推定された。構造学的に比較検討をすると、Halo-RNaseHI においては分子表面の荷電残基の増強が顕著であった。好塩性微生物由来酵素が、分子表面に正電荷を帯びていることは、すでに既知の事実であったが、本酵素のように核酸との相互作用に静電的相互作用が貢献するようなタンパク質においてはその正電荷は基質結合の阻害に働く可能性がある。Halo-RNaseHI には、好塩菌由来酵素特有の表面正電荷の増強に加えて基質結合部位付近に負電荷の局在が確認され、これが酵素機能を維持することに貢献していると考えられる。それぞれの荷電残基の酵素活性に対する役割は、今後、タンパク質工学的解析によって明らかになると期待される。

1. 背景

高温環境、低温環境をはじめとする通常の生物が生息できないような苛酷な環境下で生息する生物(極限環境生物)の持つ酵素は、通常の生物由来の酵素では機能し得ないような極限環境下でも活性を維持できるように分子レベルで進化している。このような酵素の極限環境への適応機構は、学術的にも工学的にも重要であり、今までに好熱菌、好冷菌、好酸菌、好アルカリ菌などの多くの極限環境生物(微生物)のもつ酵素の極限環境への適応機構が研究されてきた。本研究では、極限環境生物として、好塩菌(古細菌)に着目し、好塩菌が生産する好塩性酵素の高塩濃度環境下への適応機構を明らかにすることを目的

とした。高塩濃度環境はタンパク質の不安定化の要因になりうるだけでなく、酵素と基質の静電的な相互作用を阻害する要因ともなりうる。好塩性酵素の高塩濃度耐性機構を明らかにすることは、タンパク質の極限環境への適応に関する新たな知見を与える可能性があり、また、食品加工産業などの産業への応用も期待できる。この目的のために、本研究では好塩性古細菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株由来 RNase HI を対象とし、本酵素の耐塩構造と機能の相関を解析する。

RNase HI は RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを塩基非特異的に分解するヌクレアーゼであり、様々な生物種に広く分布する酵素である。

RNase HI は早くから大腸菌由来酵素において立体構造が解析されており、現在では好熱菌、好冷菌などから多様なホモログが構造学的、生化学的によく解析されているなど、基本的実験手法が確立している。さらに、本酵素は分子量が小さい球状のモノマータンパク質であることから構造と機能の相関関係を探るためのモデルとして適していると考えられる。これまでに、好熱菌由来 RNaseHI と好冷菌の RNaseHI、大腸菌由来 RNaseHI の構造と安定性を比較し構造安定化因子の同定に用いられるなどの実績がある。好塩菌由来 RNaseHI には、好塩濃度環境に構造的に耐える安定化機構があると考えられており、その同定が同様の手法により期待される。

Halobacterium sp. NRC-1 株は、塩濃度 4.3 M で至適な生育を示す好塩性の古細菌である (Fig. 1)。

好塩性微生物には、1) 細胞内の塩を細胞外へと排出する機構と、その結果生じる高い浸透圧に耐える機構を備える微生物 (中度好塩性微生物) と、2) 細胞内の塩濃度を環境中と同様に高く保つことで、浸透圧の影響を減少させる微生物 (高度好塩性微生物) が存在する。本菌は後者に属しており、環境中の Na^+ イオン濃度に匹敵する高濃度の K^+ イオンを菌体内蓄積することで浸透圧を調節し、菌体内の塩濃度も環境中と同様に非常に高くしていることが分かっている。すでに公開されている本菌のゲノム情報によれば、本菌のもつ RNaseH の一つである Halo-RNaseHI は、199 残基 20,980 Da、等電点 (pI) 4.20 のタンパク質である。また、本酵素には RNase HI に共通した五つの活性残基が保存されていることから、Halo-RNase HI も一般の RNase HI と同様の触媒機構を持つことが示唆されている (Fig. 2)。

一方、本菌の細胞内の K^+ イオン、 Cl^- イオンはそれぞれ 4 M 近くになることが示されている。本酵素は機能上、補因子として二価金属イオンとの結合や、基質である核酸との間に静電相互作用を形成することが必須であるが、このような高塩濃度環境はそれらが阻害される可能性が考えられる。本酵素においては分子レベルでの高塩濃度環境への適応によってこの問題を回避していると考えられる。しかしながら、その詳細な高塩濃度適応機構については未だ明らかにはされていない。

本研究においては、高度好塩菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株由来の RNaseHI の発現系を構築し、その酵素

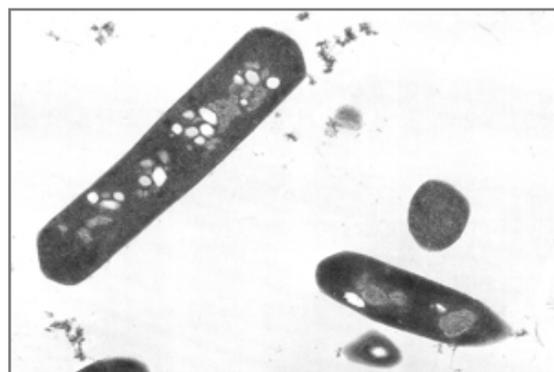


Fig. 1. 高度好塩菌 *Halobacterium* sp. NRC-1
Ng WV et al.,(2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12176-81

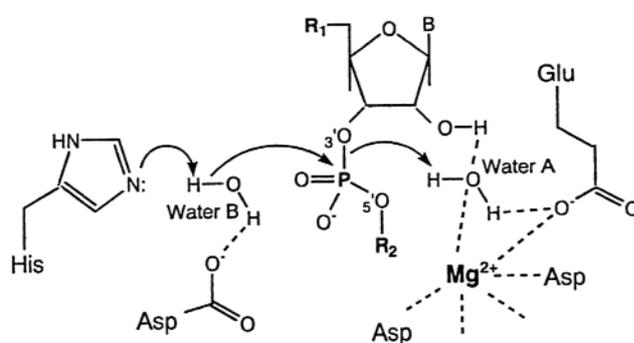


Fig. 2. RNase HI の触媒活性機構

学的特性解析と構造学的解析を行った。

2. 実験方法、結果および考察

2. 1 Halo-RNase HI の大量発現系の構築

Halobacterium sp. NRC-1 株ゲノム DNA より、Table 1 に示したプライマーを用いて Halo-RNase HI 遺伝子である *Halo-rnhA* を PCR で増幅した。得られた DNA 断片を、T7 プロモーターでタンパク質発現を制御している発現ベクター pET25b にクローニングした。宿主由来 RNaseH の混入を防ぐために、RNaseH 遺伝子を欠失させた大腸菌 MIC2067(DE3) (3) を宿主として *Halo-rnhA* の発現系を構築した。

Fig. 3 に、本酵素のアミノ酸配列と他生物種由来の RNaseHI の一次構造比較図を示す。

2. 2 Halo-RNase HI の大量発現、精製

MIC2067(DE3)/pET-*rnhA* を用いて大量発現を行った。この形質転換体を LB 液体培地中で培養し、 OD_{600} が 0.5 に達したところで、終濃度が 1 mM となるように IPTG を点

Table 1. PCR primers

primer	sequence	restriction site
5'-primer	5'-CGGGGTGACCTGACTCATATGCCAGTCGTCGAGTGC-3'	<i>Nde</i> I
3'-primer	5'-GCCCGGTCGGATCCCTTATCAGGCATCGTCGAGGGC-3'	<i>Bam</i> HI

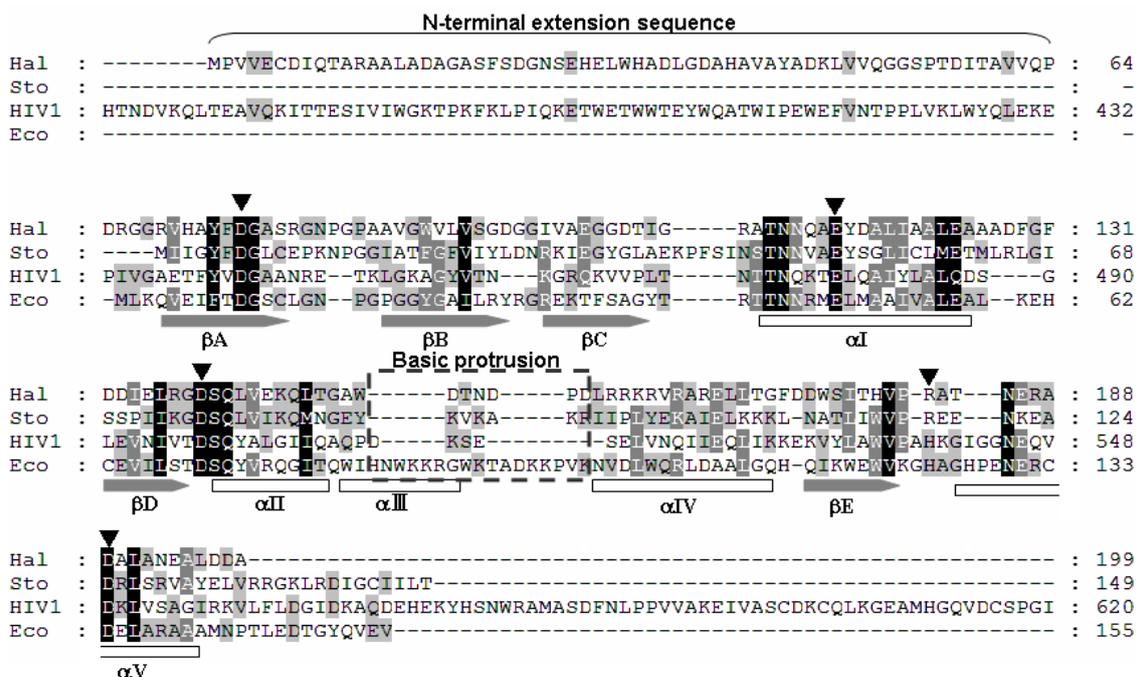


Fig. 3. Sequence alignment of RNase HI(A) and RNase HIII (B). Hal, Halo-RNase HI, HIII; Sto, Sto-RNase HI; HIV1, RNase H domain of HIV-1 RT; Eco, *E. coli* RNase HI, HIII; Tk, Tk-RNase HIII; Af, *A. fulgidus* RNase HIII; Mj, *M. jannaschii* RNase HIII. ▼ catalytic sites.

添加し、更に 30°C で 4 時間培養した。培養液を 8,000g、10 分間で遠心分離することで菌体を回収し、TE バッファー (pH 8.0) 中で菌体を超音波破碎した後に、30,000g、30 分間の遠心分離を行った。得られた可溶性画分を、TE バッファー (pH 8.0) で平衡化した DEAE Sepharose FF カラム (Pharmacia) に供した。0.5 M NaCl の直線的な濃度勾配によって目的タンパク質を溶出させ、目的タンパク質を含むフラクションは、20 mM piperazine/HCl バッファー (pH 4.8) に対して透析後、同バッファーで平衡化された Q Sepharose FF カラム (Pharmacia) に供した。0.4 M NaCl の直線的な濃度勾配によって目的タンパク質を溶出させ、目的タンパク質を含むフラクションは、50 mM NaCl を含む TE バッファー (pH 8.0) に対して透析後、Superdex 200 (GE Healthcare) カラムに供した。高純度の Halo-RNase HI を

含むフラクションを回収し、以後の解析に用いた。精製タンパク質の純度は SDS-PAGE によって評価した (Fig. 4)

CBC 染色により単一バンドとして検出されるレベルまで生成できていることが確認できた。本手法により、1 L の大腸菌培養液あたり 3.2 mg の精製 Halo RNase HI を調整することができた。これにより、生化学的な解析に用いる酵素の調製は可能となった。

2. 3 Eco-RNase HI の大量発現、精製

Halo-RNase HI との比較対象として、好塩性を持たない大腸菌由来 RNase HI (Eco-RNase HI) についても同様の解析を行うこととした。Eco-RNase HI の大量発現、精製は、既報の方法に従い以下の通りに行った。大量発現株として MIC2067/pJAL600 を LB 液体培地中で 30°C で培養し、OD₆₀₀ ≒ 0.5 のとき培養温度を 42°C に変更し、その後 4

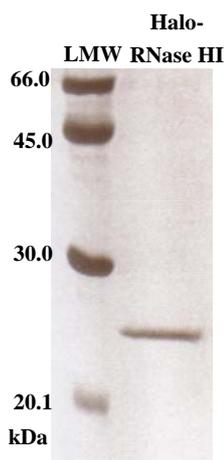


Fig. 4. 精製後 Halo-RNase HI

時間培養した。8,000 rpm、5 分の遠心分離で集菌し、不溶性画分を TE バッファーに再懸濁した後に超音波破碎した。30,000g、30 分の遠心分離で得た可溶性画分を P11 カラム (Pharmacia) に供し、1 M NaCl の直線的な濃度勾配によって目的タンパク質を溶出させ、目的タンパク質を含むフラクションを、10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5) に対して透析した。このタンパク質溶液を HiTrap Heparin カラム (GE Healthcare) に供し、1 M NaCl の直線的な濃度勾配によって目的タンパク質を溶出させ、目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

2. 4 Eco-RNaseHI の高塩濃度耐性測定

Eco-RNaseHI の構造安定性に対する塩の影響を調べるために、0 ~ 4 M の食塩存在下での二次構造形成を円偏光二色性 (CD) 測定によって観察した。1 mM Sodium Acetate を含む 0.137 mg/ml Eco-RNaseHI 溶液を用いて測定を行った。

短波長 CD スペクトル測定の結果より、高塩濃度 (4 M NaCl 存在下) においても、RNaseHI の二次構造に大きな変化は見られなかった。また、波長 220 nm の CD 値の温度変化を塩濃度 0~4 M、温度 20°C~90°C で測定し、各条件下での熱変性を観察したところ、変性中点温度は 0 M 時で $65.22 \pm 0.04^\circ\text{C}$ 、2 M 時で $68.38 \pm 0.03^\circ\text{C}$ 、4 M 時でも $67.14 \pm 0.02^\circ\text{C}$ と、ほぼ同一の値を示しており、塩濃度による構造安定性への影響はほとんどないことが確認された (Fig. 5, Fig. 6)。

2. 5 Halo-RNaseHI の酵素活性の塩濃度依存性

RNase H 活性は 30°C、15 分間の反応により、 ^3H でラベ

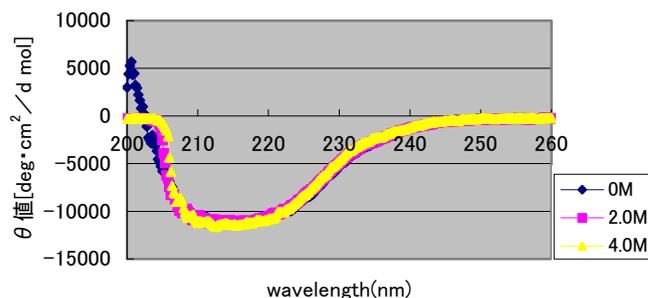


Fig. 5. Eco-RNase HI の θ 値の塩濃度依存性 (40°C)

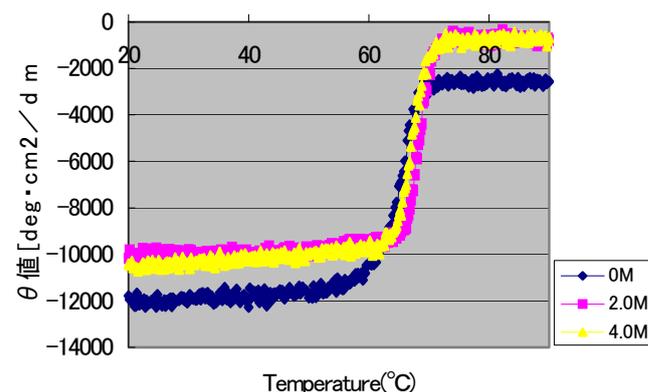


Fig. 6. Eco-RNase HI の各塩濃度における CD 値の温度依存性

ルした M13 RNA/DNA ハイブリッド基質から生じた酸可溶性産物の放射能活性を測定することにより決定した。

Halo-RNase HI の測定条件は、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.4 mM β ME、50 $\mu\text{g/ml}$ BSA、10 mM MgCl_2 であり、Eco-RNase HI の測定条件は、10 mM Tris-HCl (pH 8.5)、1 mM β ME、50 $\mu\text{g/ml}$ BSA、100 mM MgCl_2 である。1 分間に 1 μmol の酸可溶性物を遊離する酵素量を 1 unit と定義する。比活性は 1 mg のタンパク質の酵素活性として定義する。ここでは、塩濃度を 0 M から 3.45 M まで振って活性測定を行った。

Fig. 7、Fig. 8 にそれぞれ Eco-RNase HI、Halo-RNase HI の触媒活性測定の結果を示す。

また、Table 2 にこれらの結果より算出した比活性の値を、塩濃度が 0 M のときの比活性値を 100% とし各塩濃度での比活性の値を評価したグラフを Fig. 9 に示す。

Halo-RNaseHI は Eco-RNaseHI と比較すると、比活性が 100 倍程度低い。しかし、RNaseH 欠損大腸菌 (42°C で生育阻害を受ける温度感受性株) の 42°C での生育を補償することから本酵素の活性値は生理的に必要な活性の強さ

Table 2. RNase HI の比活性値の塩濃度依存性

[NaCl]	0 M	0.1 M	0.45 M	1.45 M	2.45 M	3.45 M
Eco-RNase HI (Unit/mg)	3.69	3.65	1.84×10^{-1}	1.36×10^{-2}	7.68×10^{-3}	6.19×10^{-3}
Halo-RNase HI (Unit/mg)	2.89×10^{-2}	2.72×10^{-2}	1.60×10^{-2}	2.31×10^{-2}	2.30×10^{-2}	3.16×10^{-2}

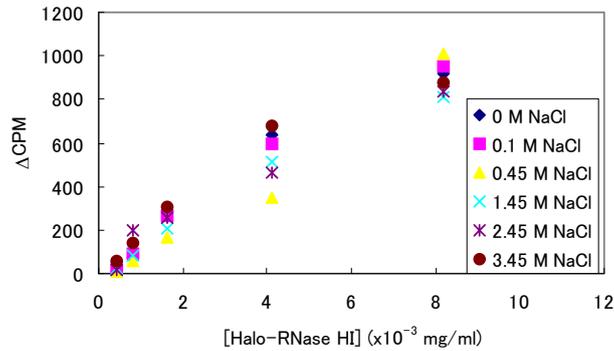


Fig. 7. Halo-RNase HI の触媒活性側

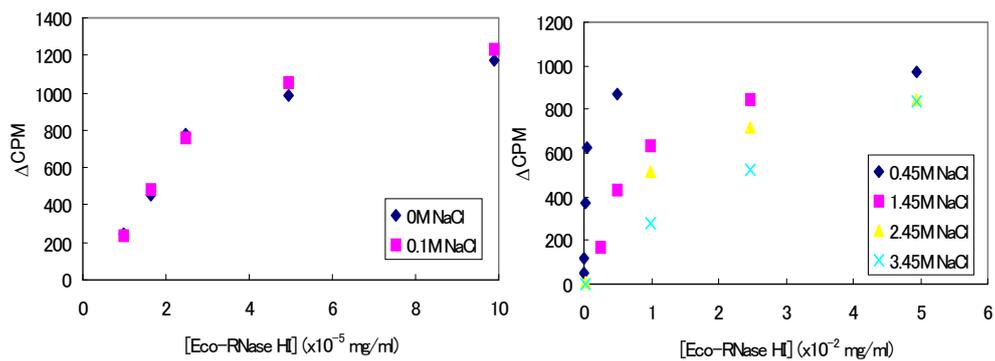


Fig. 8. Eco-RNase HI の触媒

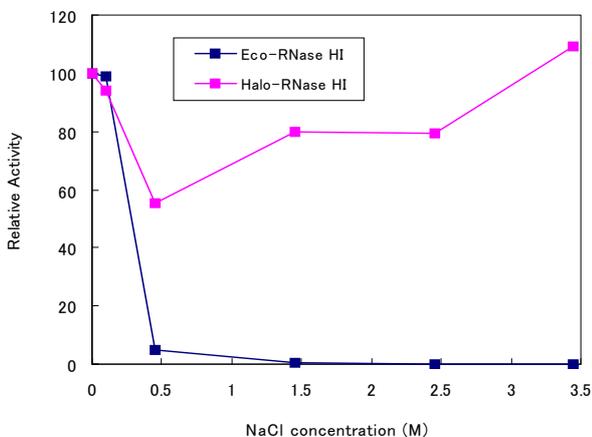


Fig. 9. 各塩濃度での比活性値比

を満たしていると考えられる。

食塩濃度0M時の比活性を基準とした相対活性の塩濃度依存性を見ると、Eco-RNase HI は塩濃度の上昇に伴って速やかに失活するのに対し、Halo-RNase HI は、0 ~ 3.5 M の塩濃度の範囲でその活性値はほぼ一定に保たれることが明らかとなった。塩濃度 1.45 M 以上では、比活性も Eco-RNase HI に逆転して上回る。*Halobacterium* sp. NRC-1 株の生育塩濃度域に近い 3.45 M 付近では Eco-RNase HI に比べ 5 倍程度の比活性の強さを示す。このことから、本酵素には高塩濃度条件下でも基質を結合し、生理的に必要とされる活性値を維持する、耐塩濃度メカニズムが存在することが示唆される。

Eco-RNase HI は、塩濃度によって、構造上大きな変化は伴わないことが CD 測定の結果から示唆されており、つまり、塩濃度の増加に伴い比活性が減少するのは、基質結合や、金属イオンの影響、触媒活性機構の塩濃度依存性に起因するものと考えられる。

2.6 基質結合特性

本酵素と、基質の結合親和力を測定するために、合成 DNA/RNA ハイブリッド基質 rA4 に対する Eco-RNaseHI の結合を SPR (BIACore) によって測定した。基質をセンサ

ーチップ上に固定化し、78.5 nmol/L の RNaseHI を、10 倍から 80 倍希釈まで濃度を振って、SPR 測定を行った。基質と酵素の結合を示す RU 値の上昇が酵素濃度に応じて確認できたが、塩濃度存在下では、**Fig. 10** のように、センサーグラム乱れ、測定時間内に平衡に達することはなかった。塩による基質結合の不安定化の可能性が示唆されるが、酵素濃度が低すぎるために起こったシングナシグナルの乱れの可能性も考えられ、慎重な検討が必要である。

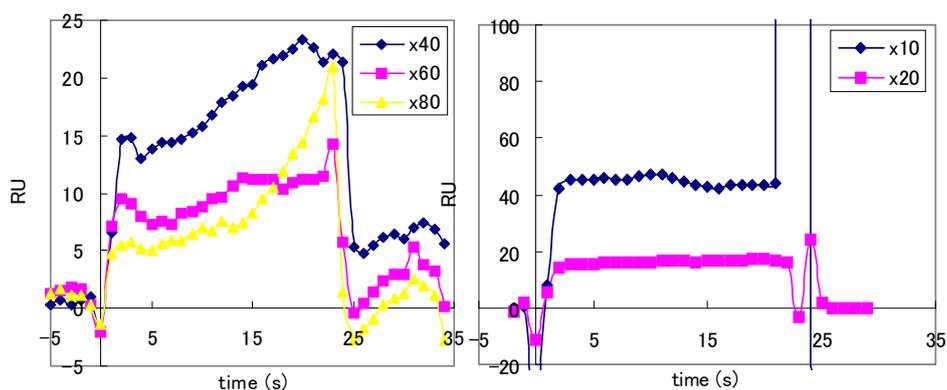


Fig. 10. Sensorgrams showing binding to 4RNA substrate in TBS buffer (left) and TBS buffer + 0.125 M NaCl (right). Enzyme: Eco-RNase HI (78.5 nmol/l). Sensor Chip: SA(D-4RNA-D/D). Buffer (left): TBS buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris (ph 7.4)). Buffer (right): TBS buffer + 0.125 M NaCl (262 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris (ph 7.4))

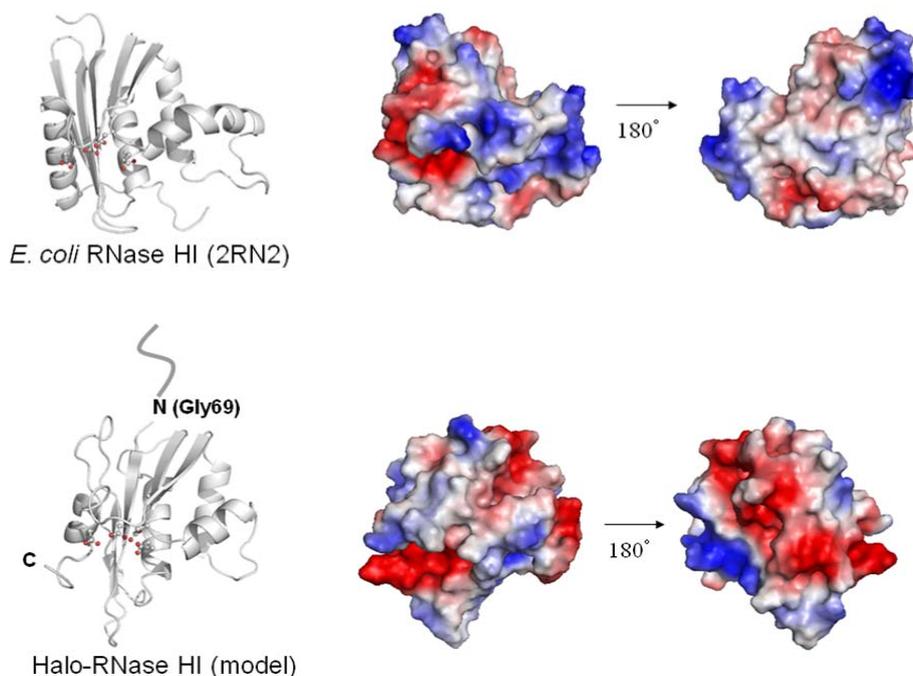


Fig.11. Eco-RNaseHI の立体構造と Halo-RNaseHI 立体構造モデルの比較

2.7 構造学的考察

Halo-RNaseHI の構造学的特性を解析する目的で、Halo-RNaseHI の立体構造モデルを構築し、Eco-RNaseHI の立体構造との比較検討を行った。Fig. 11 の左は RNaseHI の主鎖構造を、右の図は表面に露出している荷電残基を電位に応じて色分けして表示したものである。

主鎖の構造は構造上の特徴である RNaseH-fold を取り、大きな差異は認められない、しかし、表面の荷電残基に着目すると赤色で表示された正電荷が大きな割合を占めていることが分かる。これは、Halobacterium 由来の酵素に特徴的な構造であるが、静電相互作用によって基質と相互作用する本酵素にも、同様の特徴がみられることがわかった。ただし、基質結合部位付近において、負電荷を持ったアミノ酸残基が局在していることから、酵素機能を維持するために分子表面が独自の形に進化している可能性が考えられる。

3. 総括

本研究では、好塩性古細菌 *Halobacterium* sp. NRC-1 株由来 RNase HI (Halo-RNaseHI) の発現系構築、精製法の開発、高純度精製品の大量調製をおこない、塩濃度と酵素活性、基質結合特性に加えて、構造学的特性について、大腸菌由来 RNaseHI (Eco-RNaseHI) と比較し、酵素の分子レベルでの耐塩メカニズムについて考察した。

好塩性微生物由来酵素が、分子表面に正電荷を帯びていることは、すでに既知の事実であったが、本酵素のように核酸との相互作用に静電的相互作用が貢献するようなタンパク質においてはその正電荷は基質結合の障害に働く可能性があった。そこで、本研究では、まず、Eco-RNaseHI の高塩濃度下での構造安定性を測定したが、

表面荷電残基の少ない酵素においても安定性は低下しておらず、表面残基が構造フォールディングに与える影響は小さいと考えられた。Eco-RNaseHI は、塩濃度の増加に応じて活性が低下しているが、これは、主鎖構造の変性による失活ではなく、基質結合親和性の変化を含めた他の要因によるものと考えられる。そこで、SPR 測定により、基質結合特性の測定を行った、しかし、塩濃度の影響、酵素濃度の低さの影響から、詳細な結論を出すにはさらなる検討が必要であることがわかった。Halo-RNaseHI は、Eco-RNaseHI に比べて低塩濃度条件下では、比活性が 1/100 程度と低いが、塩濃度の上昇によっても、活性を保持しつづけることにより、好塩菌が生育する 4.0 M 近くの塩濃度においては Eco-RNaseHI よりも 5 倍程度高い比活性を示していた。構造学的に両酵素を比較すると、Halo-RNaseHI には、好塩菌由来酵素特有の表面正電荷の増強が見られたが、一部負電荷の局在が確認され酵素機能を維持するための特徴である可能性が考えられる。

参考文献

- (1) Ohtani, N., *et al.* (2004) *Biochem. J.* 381, 795-802.
- (2) 廣川タンパク質化学 第4巻 酵素 (廣川書店)
- (3) Itaya, M., Ohmori, A., Kanaya, S., Crouch, R. J., Tanaka, T., and Kondo, K. (1999) Isolation of RNase H genes that are essential for growth of *Bacillus subtilis* 168, *J. Bacteriol.* 181, 2118-2123

謝辞

本研究は、財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成20年度研究助成の支援(0817)を受けて遂行されたものである。ここに記して感謝の意を表したい。

No. 0817

Analysis of Haloadaptation Mechanisms of DNA/RNA Binding Protein from a Halobacterium

Yuichi Koga, Shigenori Kanaya, Kazuhumi Takano

Osaka University, Graduate School of Engineering

Summary

In this study, the halo-adaptation mechanisms of RNaseHI from a halophilic archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1 (Halo-RNaseHI) were analyzed. Since it is well studied small globular protein, RNaseHI is an ideal model protein to study protein structure-function relationships. Although, a high-salt concentration can cause a structural destabilization of protein or inhibition of electrostatic interaction between protein and DNA/RNA substrate, halo-RNaseHI can be active in such an unfavorable condition. The Halo-RNaseHI is expected to have unknown haloadaptation mechanism which might be attractive for further engineering of enzymes used in food industry or other fields using biocatalytic reactions.

From comparison of the specific activity of both RNaseHIs, it is revealed that Halo-RNaseHI activity is only 1% of that of Eco-RNaseHI. However, Halo-RNaseHI did not decrease its activity at higher salt concentration condition while that of Eco-RNaseHI decrease to 1/1000. Since it was confirmed that the changing of salt concentration does not affect the changing of Eco-RNaseHI concentration, the decreasing of activity against salt concentration probably depends on its decreasing of affinity for DNA/RNA substrate. From the structure model of Halo-RNaseHI, there is a cluster of positively charged amino acid side-chains on the surface of substrate binding site probably contribute to the binding of the DNA/RNA substrate which are negatively charged.