

## 高度好塩菌による塩類集積土壌からの除塩

八波 利恵

東京工業大学生命理工学院

**概要** 現在、気候変動や不適切な灌漑により、“塩類集積土壌(土壌表層に塩類が集積した土壌)”が毎年世界で数100万ヘクタール発生している。塩類集積土壌は、多量に存在する塩(特にナトリウムイオン)により、植物の生育障害が起り、砂漠化へと進行していく。そのため、地球規模で大きな問題となっている。この塩の除去は、十分な真水で洗い流すことを基本としており、湛水と排水の繰り返し作業となる。また、近年は耐塩植物を用いて、土壌中の塩を吸収させて除去するファイトレメディエーションも行われている。しかしながら、真水での洗い流し、ファイトレメディエーションともに、修復するまでには膨大な費用と時間が必要といわれている。そこで、本研究では、高度好塩菌を用いて塩類集積土壌から除塩を行うことを目的とした。

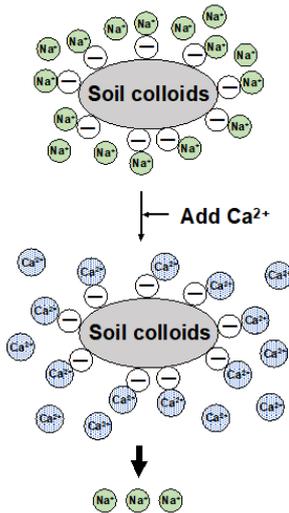
本研究では、高度好塩菌が生産するタンパク質をナトリウムイオン結合タンパク質として利用し、塩類土壌中の除塩を行うこととした。ナトリウムイオン結合タンパク質には、高度好塩菌が生産する好塩性キチナーゼおよび種々の変異を導入した変異型酵素を用いることとした。高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* のゲノム上に見いだされたキチナーゼ(ChiN1)は分子表面に大量の酸性アミノ酸を有し、それがナトリウムイオンと結合すると考えられた。そのため、分子表面にさらに酸性アミノ酸を増やすことで、より多くのナトリウムイオンが結合すると推測された。

まず、野生型 ChiN1 を取得し、その性質を調べた。その結果、ChiN1 は高塩濃度下においても活性を有する好塩性酵素であることがわかった。さらに、ChiN1 の分子モデルを作製したところ、ChiN1 の分子表面には多量の酸性アミノ酸が存在することが明らかとなった。そこで、酸性アミノ酸を更に増やすことで、より高塩濃度下で活性を有し、かつナトリウムイオン結合能が向上する変異型酵素が取得できると考えられた。そこで、分子表面に酸性アミノ酸を導入した変異型酵素を作製し、活性の塩濃度依存性を調べたところ、耐塩性が向上した変異型酵素が見いだされた。今後は、変異型酵素を用いて高塩濃度下でのナトリウムイオン結合能を評価し、除塩の効果を解析する。

### 1. 研究目的

塩類集積土壌とは、土壌表層に塩類が集積した土壌をさす。現在、気候変動や不適切な灌漑により、この塩類集積土壌が毎年世界で数100万ヘクタール発生している<sup>1)</sup>。また、日本においては2011年3月11日に発生した東日本大震災による津波により土壌に海水が侵入し、およそ2万4千ヘクタールの農地が塩類集積土壌となった。塩類集積土壌は、多量に存在する塩(特にナトリウムイオン)と重金属(銅、ニッケル、カドミウムなど)により、植物の

生育障害が起り、砂漠化へと進行していく。そのため、地球規模で大きな問題となっている。この塩の除去は、十分な真水で洗い流すことを基本としており、湛水(水をはってため続けること)と排水の繰り返し作業となる<sup>2)</sup>。また、塩類集積が極めて進行している土壌では、カルシウム添加(石灰添加)が行われる(Fig. 1)。これにより負に帯電した土壌コロイドに結合しているナトリウムイオンは、添加したカルシウムイオンと置換交換されて遊離し、給水によって流出できる。



**Fig. 1.** Restoration of saline soil with the addition of lime.  $\text{Na}^+$  is displaced by  $\text{Ca}^{2+}$  and discharged from saline soil.

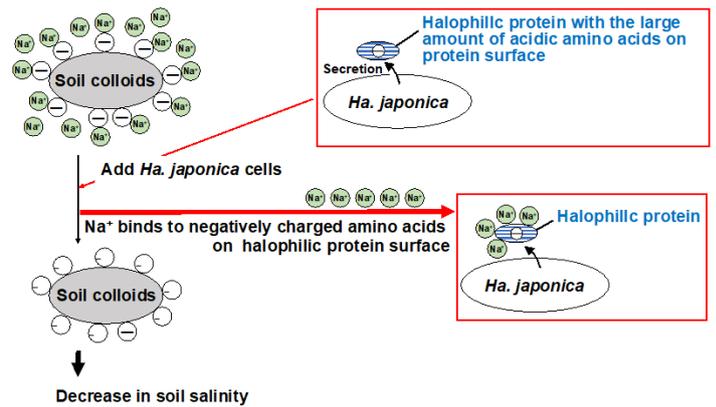
また、近年では耐塩植物を用いて土壤中の塩を吸収させ、除去するファイトレメディエーションも行われている<sup>3)</sup>。しかしながら、真水での洗い流し、ファイトレメディエーションともに、修復するまでには膨大な費用と時間(少なくとも3年)が必要といわれている。

そこで本研究では、高度好塩菌を用いて塩類集積土壌から除塩を行うことを目的とした。

本研究で用いる高度好塩菌は、助成研究者がこれまで研究してきた高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* とした。

本菌を用いる利点は以下の通りである。

- ① *Ha. japonica* は、高濃度の塩を好んで生育する古細菌である<sup>4)</sup>ため、塩類集積土壌においても良好に生育する。
- ② *Ha. japonica* は、細菌であるため耐塩植物よりも生育が圧倒的に早い。
- ③ 高度好塩性古細菌は、重金属耐性を有することが知られている。そのため、本菌も重金属を含む塩類集積土壌において良好に生育すると推測される。
- ④ *Ha. japonica* は、分子表面に多量の酸性アミノ酸を有する好塩性タンパク質を分泌する(**Fig. 2**, 四角内, Halophilic protein)。このタンパク質がもつ酸性アミノ酸は土壌中のナトリウムイオンと結合すると考えられ、ナトリウムイオン濃度を低下させることができると考えられる。



**Fig. 2.** Salt removal from saline soil by the extremely halophilic archaeon *Ha. japonica*.

これらの利点を活かし、本研究では好塩性タンパク質をナトリウムイオン結合タンパク質として利用し、塩類集積土壌から除塩を行うこととした。なお、ナトリウムイオン結合タンパク質には、高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* が生産する好塩性キチナーゼ<sup>5)</sup>(ChiN1)を用いることとした。ChiN1 はキチンを加水分解する酵素であり、触媒ドメイン、キチン結合ドメインおよび PKDドメインを有するマルチドメイン酵素である。また、種々の変異を導入した変異型酵素も作製し、除塩の効果を検討することとした。

## 2. 研究方法

### 2.1 野生型 ChiN1 および変異

野生型 ChiN1 の取得は、助成研究者が生産系を構築した方法を用いた<sup>5)</sup>。すなわち、*Hb. salinarum* 染色体 DNA を調製し、これを鋳型として ChiN1 をコードする遺伝子を PCR により増幅した。得られた DNA を大腸菌-高度好塩性古細菌用シャトルベクター pWL102 に連結し、ChiN1 発現型プラスミド pChiN9 を作製した。その際、*chiN1* 遺伝子の upstream に *Ha. japonica* *csg* 遺伝子のプロモーター領域を連結した。pChiN9 を *Ha. japonica* に導入し、得られた形質転換株より培養上清を回収し、ChiN1 粗酵素標品とした。また、種々の変異型酵素の発現型プラスミドは、pChiN9 を鋳型とし、変異導入プライマーを用いて部位特異的変異導入を行い作製した。その後の変異型酵素の取得は、野生型 ChiN1 取得の方法と同様に行った。

## 2. 2 野生型 ChiN1 および変異型酵素の酵素学的性質の評価

### 2. 2. 1 キチナーゼ活性の測定

基質としてダイキトサン M を使用した。40 mM 酢酸溶液に 0.2% のダイキトサン M(70% 脱アセチル化キチン)を加え、室温で一晩攪拌して溶解させたものを基質溶液として用いた。基質の加水分解に伴って生じた還元末端を Schales 変法<sup>6)</sup>によって定量し、キチナーゼ活性を算出した。基質溶液 90  $\mu$ l, 粗酵素試料 10  $\mu$ l および 80 mM Britton-Robinson 緩衝液(pH 6.0)260  $\mu$ l を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、1.0 M NaCl の存在下、37°C で 10 分間反応を行った。反応終了後、フェリシアン化カリウム試薬 480  $\mu$ l を加え、100°C で 15 分間加熱した。氷冷後、遠心(20, 400 x g, 10 分間, 4°C)により不溶化したダイキトサン M を除き、上清の 420 nm の吸光度を分光光度計 UV-1200 で測定した。対照には N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)を用いた。1 分間に N-アセチルグルコサミン 1  $\mu$ mol 相当の還元末端を遊離させるのに必要な酵素量を 1 ユニット(U)と定義した。

### 2. 2. 2 NaCl 濃度依存性の評価

野生型 ChiN1 および各種変異型酵素の粗酵素標品を用い、各濃度 NaCl 存在下、pH 6.0, 37°C で 10 分間反応を行った。基質としてダイキトサン M を終濃度 0.05%(w/v)になるように加えた。反応により生じた還元末端を Schales 変法で定量し、酵素活性を算出した。反応 pH の調整には 1.0 M NaCl を含む 80 mM Britton-Robinson 緩衝液(pH 6.0)を用いた。活性は、最大活性を 100% とする相対活性で表した。

### 2. 3 ChiN1 立体構造モデルの構築

ChiN1 の立体構造モデルは、Discovery Studio 1.7 プログラム(Accelrys)を用いて構築した。

## 3. 研究結果および考察

### 3. 1 野生型 ChiN1 の活性の NaCl 濃度依存性

本研究では、高度好塩性古細菌 *Ha. japonica* が生産する ChiN1 をナトリウムイオン結合タンパク質として利用し、塩類集積土壌から除塩を行うこととした。そこで、まず野生型 ChiN1 を調製し、その性質検討を行った。

野生型 ChiN1 の粗酵素標品を用い、pH 6.0, 37°C における活性の NaCl 濃度依存性を調べた(Fig. 3)。その結果、野生型 ChiN1 は、1.0 M NaCl に反応至適塩濃度を有し、1.0 M より高い NaCl 濃度においては活性が低下していく傾向が見られ、典型的な好塩性酵素であることがわかった。

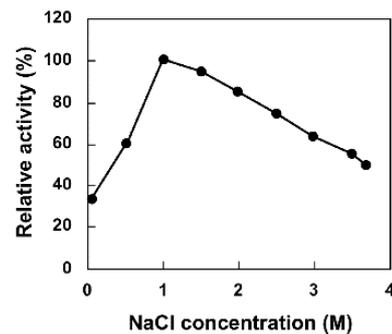


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on activity of ChiN1. Chitinase activity was measured at 37°C and pH 6.0 in the presence of 0.08-3.8 M NaCl.

### 3. 2 ChiN1 の立体構造モデルの構築と変異導入箇所の決定

#### 3. 2. 1 ChiN1 の立体構造モデルの構築

ChiN1 の立体構造に関する知見を得るために、タンパク質シミュレーションソフトを用い、ChiN1 の触媒ドメイン領域について立体構造モデルを構築した。ChiN1 のアミノ酸配列について BLAST サーチを行い、当該配列と相同性の高いタンパク質を 5 つ選択した(データ示さず)。この 5 つのタンパク質の立体構造データを Protein Data Bank より取得し、テンプレートとして用いることで ChiN1 の立体構造モデルを構築した(Fig. 4)。ChiN1 は 8 つのヘリックスと 8 つのシートからなる典型的な TIM バレル構造を取ることがわかった。また、その分子表面には多量の酸性アミノ酸が存在することが明らかとなった。

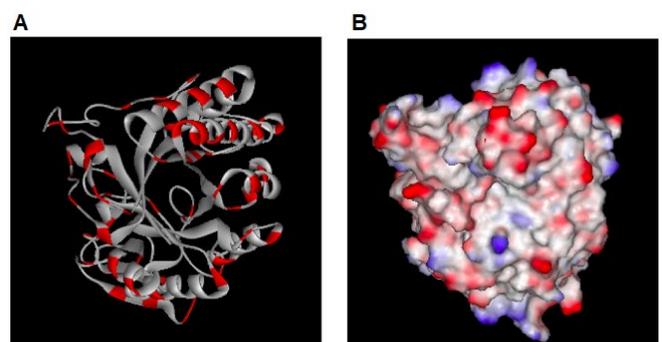


Fig. 4. 3D structure model of ChiN1 catalytic domain. (A) The Ribbon model of ChiN1 catalytic domain. (B) Electrostatic potential distribution of ChiN1 catalytic domain. The red represents negative potential.

### 3. 2. 2 変異導入箇所の決定

ChiN1 の立体構造モデルより、本酵素は分子表面に多量の酸性アミノ酸を有し、それがナトリウムイオンと結合すると推測された。そのため、分子表面にさらに酸性アミノ酸を増やすことで、より多くのナトリウムイオンが ChiN1 と結合すると考えられた。そこで、ChiN1 の立体構造モデルより分子表面に位置し、酸性アミノ酸が少ない、もしくは存在しない領域を検索し、当該領域に酸性アミノ酸を導入することにした。その際、変異導入による酵素の立体構造に対する影響を最小限にするため、これらの領域に存在するアスパラギン、グルタミンをそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸に置換することとした。また、酸性アミノ酸をより多く導入するために、ターゲットとした領域には酸性アミノ酸を 2 残基ずつ導入することとした。

本研究で作製した変異型酵素をまとめて **Table 1**, **Fig. 5** に示した。すなわち、ヘリックス 4 に存在する 239 番目のアスパラギン (Asn239) のアスパラギン酸への置換と 242 番目のグルタミン (Gln242) のグルタミン酸への置換を施した変異型酵素 N239D/Q242E, ループ 4 に存在する 278 番目のアスパラギン (Asn278) のアスパラギン酸への置換ならびに 281 番目のアスパラギン (Asn281) のアスパラギン酸への置換を施した変異型酵素 N278D/N281D, ループ 5 に存在する 357 番目のアスパラギン (Asn357) のアスパラギン酸への置換ならびに 359 番目のグルタミン (Gln359) のグルタミン酸への置換を施した変異型酵素 N357D/Q359E, ヘリックス 12 に存在する 415 番目のアスパラギン (Asn415) のアスパラギン酸への置換ならびにループ 7 に存在する 419 番目のグルタミン (Gln419) のグルタミン酸への置換を施した変異型酵素 N415D/Q419E, ループ 7 に存在する 431 番目のグルタミン (Gln431) のグルタミン酸への置換ならびに 433 番目のアスパラギン (Asn433) のアスパラギン酸への置換を施した変異型酵素 Q431E/N433D, およびループ 8 に存在する 443 番目のグルタミン (Gln443) のグルタミン酸への置換ならびに 444 番目のアスパラギン (Asn444) のアスパラギン酸への置換を施した変異型酵素 Q443E/N444D をそれぞれ作製することとした。

**Table 1** Summary and location of mutation sites.

Mutant	Position
N239/Q242E	Helix 4 (D233-Q242)
N278D/N281D	Loop 4 (W270-V283)
N357D/Q359E	Loop 5 (T345-Y377)
N415D/Q419E	Helix 12 (D413-G416)
	Loop 7 (K417-G434)
Q431E/N433D	Loop 7 (K417-G434)
Q443E/N444D	Loop 8 (Y438-S448)

### 3. 3 各種変異型 ChiN1 の活性の NaCl 濃度依存性

野生型 ChiN1 ならびに各種変異型酵素 N239D/Q242E, N278D/N281D, N357D/Q359E, N415D/Q419E, Q431E/N433D および Q443E/N444D の粗酵素標品を用い、pH 6.0, 37°C における活性の NaCl 濃度依存性を調べた。その結果、いずれの変異型酵素も野生型 ChiN1 と同様、1.0 M NaCl に反応至適塩濃度を有し、1.0 M より高い NaCl 濃度においては活性が低下していく傾向が見られた **[Fig. 6(A-F)]**。一方で、変異型酵素 N239D/Q242E および N357D/Q359E は、1.5 M ないしそれ以上の NaCl 濃度において、野生型 ChiN1 を上回る相対活性を示した **[Fig. 6(A, C)]**。これに対して、N415D/Q419E および Q431E/N433D は、1.5 M 以上の NaCl 濃度においては野生型 ChiN1 より低い相対活性を示す傾向が観察された **[Fig. 6(D, E)]**。これらの結果より、分子表面の特定の部位に酸性アミノ酸を導入することで、ChiN1 の耐塩性が向上する可能性が示唆された。

### 4. 今後の課題

本研究では、高度好塩性古細菌 *Ha. japonica* が生産する ChiN1 をナトリウムイオン結合タンパク質として利用し、塩類土壌中の除塩を行うことを目的とした。高度好塩性古細菌 *Hb. salinarum* 由来野生型 ChiN1 を作製し、活性の NaCl 濃度依存性を調べたところ、本酵素は高塩濃度下においても機能する好塩性酵素であることがわかった。また、ChiN1 の立体構造モデルを構築したところ、ChiN1 は分子表面に大量の酸性アミノ酸を有し、それがナトリウムイオンと結合すると考えられた。さらに、分子表面に酸性アミノ酸を増やすことで、高塩濃度下でより高活性を有する変異型酵素の取得にも成功した。

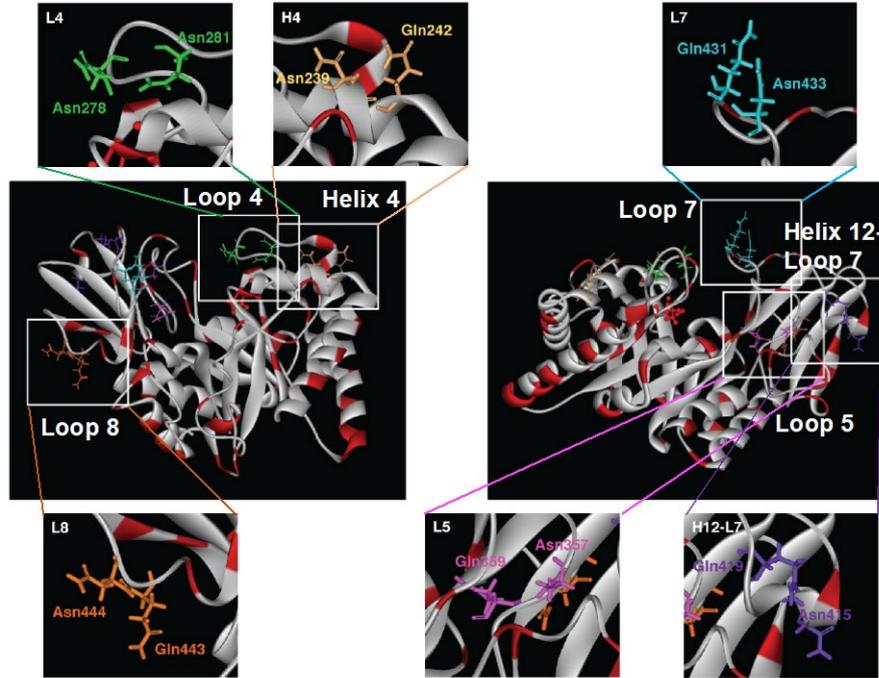


Fig. 5. Location of target amino acids for mutagenesis.

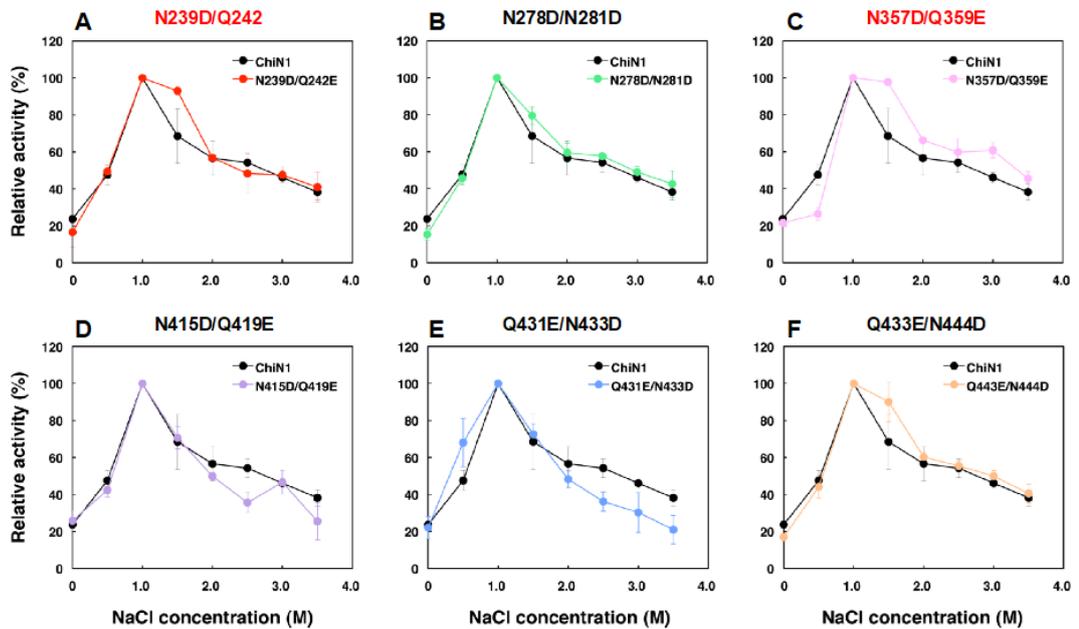


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on activity of ChiN1 and ChiN1 mutants. Chitinase activity was measured at 37°C and pH 6.0 in the presence of 0.08-3.8 M NaCl.

変異型酵素は野生型 ChiN1 に比べ分子表面の酸性アミノ酸を多くもつことから、より多くのナトリウムイオン結合能を有する考えられる。今後は、変異型酵素を用いて高塩濃度下でのナトリウムイオン結合能を評価する。さらに、変異型酵素を細胞表層に提示した *Ha. japonica* を取

得し、それを塩類集積土壌にて生育させて土壌中のナトリウムイオン濃度変化を電気伝導度変化にて評価する。これにより、*Ha. japonica* を用いた除塩効果を解析する予定である。

## 5. 謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の研究助成を受けて実施されました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

## 6. 文献

- 1) 八丁信正, 筒井 暉, 乾燥地域における塩害とその対策, 農業土木学会誌, 66, 801-805, 1998.
- 2) JA 全農: 津波による塩害対策と水田の土壌管理, [http://www.zennoh.or.jp/pess/topic/PDF/20110329\\_1.pdf](http://www.zennoh.or.jp/pess/topic/PDF/20110329_1.pdf)
- 3) 前田良之, 植物の耐塩性機構と植物を利用した土壌塩類の除去, 日本海洋学会誌, 92-98, 2012.
- 4) K. Horikoshi, R. Aono and S. Nakamura, The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1, *Experientia*, 49, 467-502, 1993.
- 5) R. Yatsunami, M. Sato, K. Orishimo, Y. Hatori, Y. Zhang, T. Takashina, T. Fukui, and S. Nakamura, Gene expression and characterization of a novel GH family 18 chitinase from extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1, *J. Jpn. Soc. Extremophiles*, 9, 19-24, 2010.
- 6) T. Imoto and K. Yagishita, A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1154-1156, 1971.

## Salt Removal from Saline Soil by Halophilic Microbes

Rie Yatsunami

Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

### Summary

Currently, several million hectares of "salt-accumulated soils" (i.e., soils with salt accumulation on the soil surface) occur every year worldwide due to climate change and inappropriate irrigation. The large amount of salt (especially sodium ions) present in these saline soils causes plant growth problems, leading to desertification. This is a major problem on a global scale. Removal of this salt is based on washing away the salt with sufficient fresh water, which requires repetitive flooding and draining. In recent years, phytoremediation has also been practiced, in which salt-tolerant plants are used to absorb and remove salt from the soil. However, both fresh water washing and phytoremediation are said to require a huge amount of money and time to restore the soil. Therefore, the objective of this study was to remove salt from salt-accumulated soils using the extremely halophilic archaea.

In this study, we used a protein produced by the extremely halophilic archaeon as a sodium ion-binding protein for salt removal from salt-accumulated soils. Halophilic chitinase produced by halophilic archaea and mutant enzymes produced by introducing various mutations were prepared as sodium ion-binding proteins and used for salt removal. The chitinase found in the genome of the extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* has a large amount of acidic amino acids on its molecular surface, which are thought to bind sodium ions. Therefore, we hypothesized that more sodium ions would bind to the chitinase by increasing the amount of acidic amino acids on the surface of the molecule. First, recombinant chitinase was obtained and its properties were investigated. As a result, it was found that the chitinase is the halophilic enzyme that is active even at high salt concentrations. Furthermore, a molecular model of halophilic chitinase was constructed, and it was found that a large amount of acidic amino acids existed on the molecular surface of the halophilic chitinase. Therefore, it was thought that by further increasing the amount of acidic amino acids, a mutant halophilic chitinase with higher activity under high salt concentration and improved sodium ion-binding capacity could be obtained. We prepared a mutant chitinase with acidic amino acids on the surface of the molecule and investigated its properties. As a result, it was found that the mutant enzyme with improved salt tolerance was obtained. In the future, we will evaluate the sodium ion-binding ability of the mutant chitinase under high salt concentrations and analyze the effect of salt removal.