

2017年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



超好熱菌由来酵素の 構造機能相関研究とその応用

古賀 雄一



Studies on structure-function relationships of hyper-thermostable enzymes and their application

Yuichi Koga (Department of Material and Life Science, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871) *Seibutsu-kogaku* **96**: 113-120, 2018.

はじめに

タンパク質の構造を改変し新しい機能を創出することは、タンパク質工学の大きな目標である。たとえば、高温、低温、高塩濃度など特殊な条件下で機能するように酵素の構造を改変することがあるが、どのような変異を加えれば望んだ機能を付与できるかといったタンパク質機能のデザイン原理はまだ確立されてはいない。超好熱菌のように極限環境に適応した生物のタンパク質は天然の“お手本”として、構造-機能のデザインの指標を与え、酵素利用の新しい可能性を示してくれる。

超好熱菌とは生育至適温度が80°C以上であるか、90°C以上で生育できる微生物と定義される¹⁾。これらの多くはアーキアに分類され、火山や温泉といった天然の単離源に限らず、コンポストなどの人工的な高温環境からも単離されている。好熱性の微生物は、タンパク質などの生体分子を過酷な環境で生き残れるように高温に適応させていると考えられ²⁾、タンパク質の安定性メカニズムの研究のための題材や、産業用酵素のソースとして活用されている。高温で酵素反応を行えば、反応速度や基質溶解度が上がり、コンタミネーションのリスクも下がることから高い生産性の実現が期待できる。さらに、耐熱性酵素は酸化剤や、変性剤、界面活性剤などに対して耐性を持っている場合もあり、既存の酵素では実現できないような反応条件下で使うことも可能である。

数ある酵素の中でも、プロテアーゼは、成長、分化、

免疫反応など多くの生物学的プロセスに関わっているのと同時に、産業用酵素の世界市場の65%を占め、応用面でも重要である³⁾。プロテアーゼは洗剤、食品、薬品、皮革、診断、廃棄物処理などさまざまな用途に使われる。特に、バクテリア由来のアルカリプロテアーゼは洗剤への添加剤として利用され、大きな市場を形成している。これらの酵素は、アルカリ条件下でタンパク質のシミを高効率で分解することで洗浄力を強化している。一方で、酵素は界面活性剤存在下では安定性が十分であるとはいえず、活性を維持するための対策が必要になる。この問題を解決するために、好熱菌からより安定なプロテアーゼを探しだす試みと、タンパク質工学的に既存の酵素へ界面活性剤耐性を付与する試みが行われている。

筆者らは、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1をはじめ、好冷菌 *Shewanella* sp. SIB1、好塩菌 *Halobacterium salinarum* などの極限環境微生物からさまざまな酵素を単離し、その構造と機能を常温性ホモログのものと比較して特性を明らかにしてきた。本稿では超好熱菌から単離された subtilisin-like Ser protease について明らかになった知見と、今後の展望について述べたい。

Subtilisin-like Ser protease について

Subtilisin-like protease (subtilase) super family は、セリンプロテアーゼでアーキア、バクテリア、カビ、酵母、高等真核生物に見いだされている⁴⁾。原核生物の subtilase は細胞外に分泌されタンパク質を分解し、細胞外の栄養

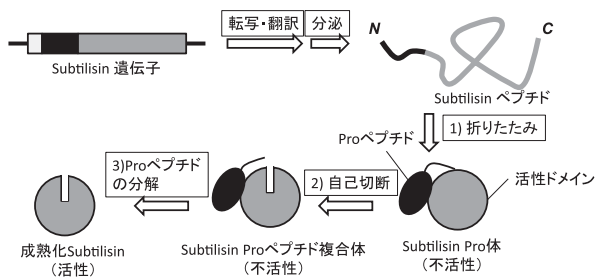


図1. Subtilisinの活性化プロセス (上原らの図を一部改変)⁷⁾. Subtilisinはシグナルペプチド (Pre配列, 白色), Proペプチド (黒色), 活性ドメイン (灰色) から構成される. Pre配列は分泌後に切断され, Pro配列は構造形成後に自己触媒的に切断, 分解されて, 最終的な活性酵素になる.

を取り込むために働いているのに対し, 真核生物の subtilaseはPCSK9 (前駆タンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9) によるコレステロール代謝⁵⁾やヒトの細胞の furin⁶⁾のように, ホルモンの前駆体の成熟化といった細胞内の事象に対して不可欠な役割を果たす.

多くの subtilisin は prepro-subtilisin と呼ばれる不活性な前駆体として合成され, 分泌シグナル (Pre) とプロペプチド (Pro) を subtilisin ドメインのN端に持っている. Pre配列は細胞外への移動を補助し, 分泌とともに切断される. その subtilisin 前駆体は, pro体として分泌され, 1) pro-subtilisin の折りたたみ, 2) propeptide の切断, 3) propeptide の分解 (図1)⁷⁾の3段階のプロセスを経て成熟化する. Propeptide は subtilisin ドメインの折りたたみを補助する分子内シャペロンとして働くほか, propeptide のC末端領域が, 触媒部位に基質のように結合し, 競争的に活性を阻害する^{8,9)}. 常温性の subtilisin の propeptide は intrinsically unstructured protein (IUP) であるため, 複合体から乖離すると, 構造が崩れ, 活性化した subtilisin によってすぐに分解されてしまう^{10,11)}.

このような成熟化メカニズムをはじめとする subtilisin の酵素学的諸性質は枯草菌由来の subtilisin で主に研究されており, subtilisin を取り扱ううえで不可欠なノウハウを提供するものである. しかしながら, 超好熱菌由来 subtilisin においては, その成熟化プロセスや安定性についてユニークな特性は明らかであったが, 分子構造レベルでの理解は限られていた. 筆者らは, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1 から2種類の subtilisin ホモログ (Tk-subtilisin と Tk-SP) を単離し, それらが高温環境で効果的に成熟化し, 安定な構造をとることを明らかにするとともに, 産業応用に向けた研究展開を行ってきた.

T. kodakarensis 由来 subtilisin-like protease

Thermococcus kodakarensis KOD1 は, 鹿児島県小室

島の熱水硫気孔から単離された超好熱菌である^{12,13)}. その生育温度は60°Cから100°Cで生育至適温度は85°Cである. この生物は産業的に有用な酵素の有望な単離源で, これまでにも高い効率と高い正確性を持ったPCR用のDNA polymerase (KOD polymerase; Toyobo, Ltd, Jpn) などが単離されている. *T. kodakarensis* のゲノム情報¹⁴⁾を探索すると, subtilisin 様プロテアーゼをコードすると思われる三つのORF [Tk-1675 (P184088), Tk-1689 (YP184102), Tk-0076 (YP182489)] が存在している. Tk-1675 と Tk-1689 はそれぞれ, Prepro-Tk-subtilisin¹⁵⁾, Prepro-Tk-SP¹⁶⁾として同定され, 大腸菌で発現させた組換え酵素で活性が確認されているが, Tk-0076については活性体の発現産物は得られていない.

T. kodakarensis 由来の三つの subtilisin のアミノ酸配列を *Bacillus subtilis* 由来の subtilisin E (AAA22742) のものと比較した (図2). Prepro subtilisin E は推定上のシグナル配列, propeptide と成熟化ドメイン (subtilisin E) からなる. 同様に, Prepro-Tk-subtilisin は, シグナル配列 (Met(-24)-Ala(-1)), propeptide (Tkpro Gly1-Leu69) と成熟化ドメイン (Tk-subtilisin Gly70-Gly398) からなる. Prepro-Tk-SP は, シグナル配列 (Met(-23)-Ala(-1)), propeptide (ProN Ala1-Ala113) と成熟化ドメイン (Tk-SP Val114-Gly640) からなる.

Tk-subtilisin と Tk-SP の組換え酵素をそれぞれ調製し, その酵素特性を解析すると, 両酵素は常温性の subtilisin に比べ非常に強い安定性があることが示された. 枯草菌由来の subtilisin である Subtilisin Carlsberg と Proteinase K が70°C以上の温度で失活していくのに対し, Tk-subtilisin と Tk-SP は90°C以上の高温でも高い活性を維持できる (図3). 超好熱菌由来のプロテアーゼは Protease S などが知られているが, Tk-subtilisin, Tk-SP はともに Protease S と同様に熱安定性が高く世界最高レベルの熱安定性を持っていることがわかる.

さらに, 5% SDS (図4) や 8 M Urea, 6 M グアニジン塩酸塩のような変性剤中での残存活性を比較した. いずれも通常のタンパク質であれば完全に変性する条件であるが, 両酵素ともに60分までに不可逆的な変性は見られず, 超好熱菌から単離された両酵素の熱に安定な分子構造は, 界面活性剤や変性剤による変性作用にも耐性を持つことが明らかとなった.

Tk-subtilisin

Tk-subtilisin の安定性がどのような構造に由来するのか, 詳細な構造解析からそのメカニズムを明らかにすることができた.

Pre配列 (シグナル配列) を除いた Pro-Tk-subtilisin

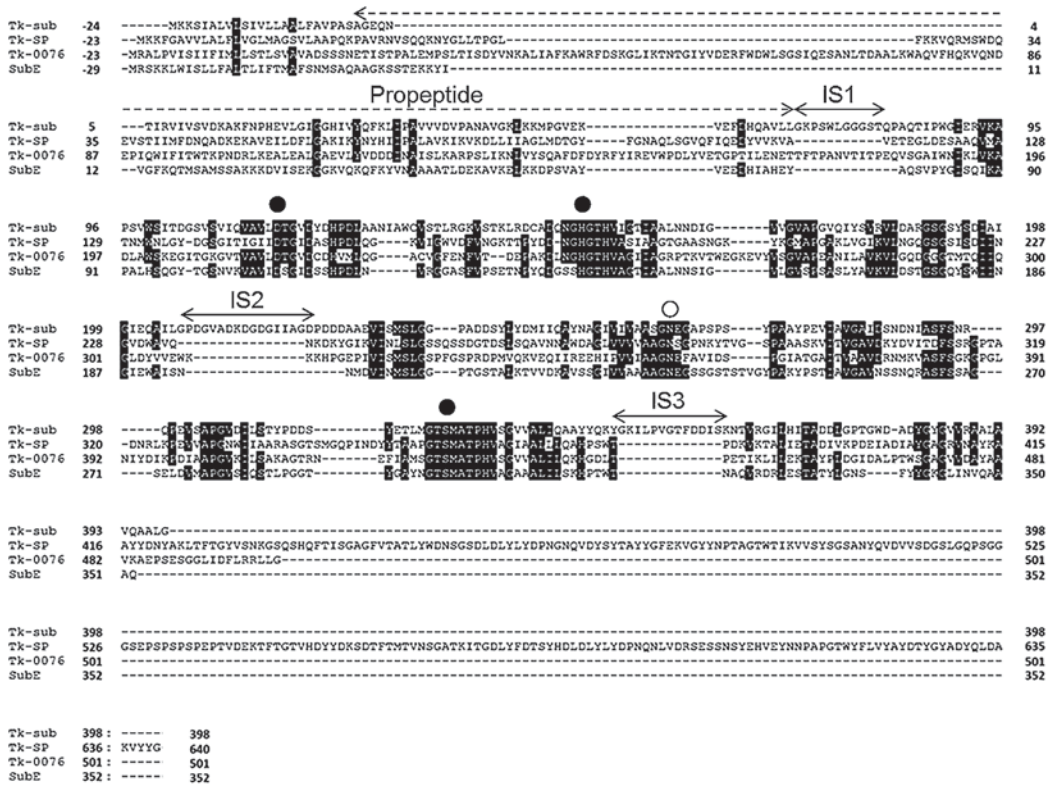


図2. *T. kodakarensis* 由来 subtilisin のアミノ酸配列の比較. Tk-subtilisin (図中 Tk-sub), Tk-SP, Tk-0076 と枯草菌由来 subtilisin E との比較. ●は触媒3残基, ○はオキシアニオンホールを表す. Tk-subtilisin には, ユニークな挿入配列 (IS1 ~ IS3) が存在する.

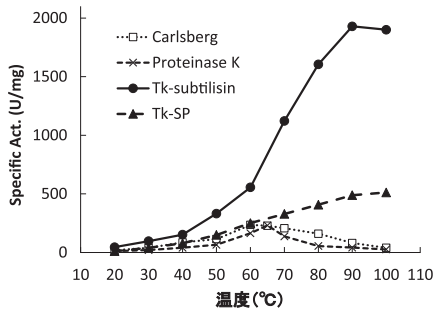


図3. Subtilisin の温度依存性比較. 枯草菌由来 Subtilisin Carlsberg (Carlsberg), Proteinase K, および Tk-subtilisin, Tk-SP の 20 ~ 80°C における酵素比活性を比較した. Tk-subtilisin, Tk-SP はともに 90°C 以上の高温で最大の活性値をとる.

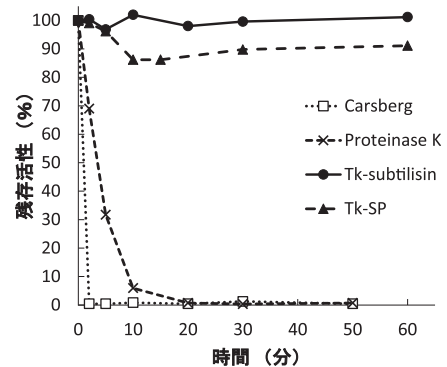


図4. Subtilisin の SDS 耐性. 枯草菌由来 Subtilisin Carlsberg (Carlsberg), Proteinase K, および Tk-subtilisin, Tk-SP を 5% SDS 溶液中で保温した後残存活性を測定した. Tk-subtilisin と Tk-SP は高い残存活性を示した.

(Gly1-Gly398, 45 kDa) を 5 mM CaCl₂ 存在下, pH 9.5 80°C で保温すると, 活性ドメインの Tk-subtilisin (Gly79-Gly398, 37 kDa) と Tkpro (Gly1-Leu69, 8 kDa) の間のペプチド結合が自己切断された後, Tkpro が Tk-subtilisin によって分解されていく (図5). これは, 一般的な subtilisin と同様の成熟化過程を経て Tk-subtilisin が活性化していくことを示している. ただし, 本酵素は成熟化開始に Ca イオンが要求され, さらに, ProTk-subtilisin の成熟化速度は温度と密接に関連している¹⁷⁻¹⁹.

また, Tk-subtilisin はその pro ペプチド (Tk-Pro) に

も特徴がある. Tk-pro は単独で発現させても, 立体構造を保っており, 高い安定性を有している. 成熟ドメインから乖離すると同時に構造を取らなくなるバクテリア由来 subtilisin の pro 配列と大きく異なる点である. Tk-pro の高い安定性は, 高温環境下で Tk-subtilisin を効率的に活性化するために必要な分子機構の一つになっている^{17,19-21}.

また Tk-subtilisin は, 熱安定な分子構造をとることで活性を維持することができると考えられる. Tk-

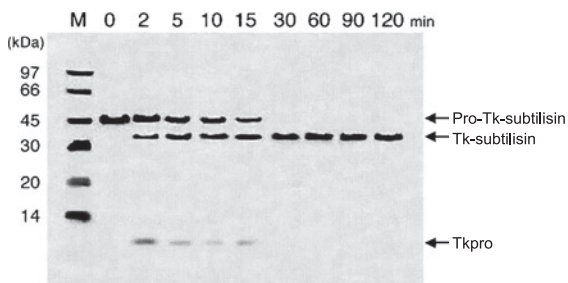


図5. Tk-subtilisinの成熟化過程. 5 mM CaCl₂存在下でTk-subtilisinを80°Cに保温すると成熟化が進行する. まず, Pro-Tk-subtilisinでProペプチド(Tk-Pro)の切断が起こり, 30分以上の保温で遊離したTk-Proが完全に分解されることで, 成熟化が完了する.

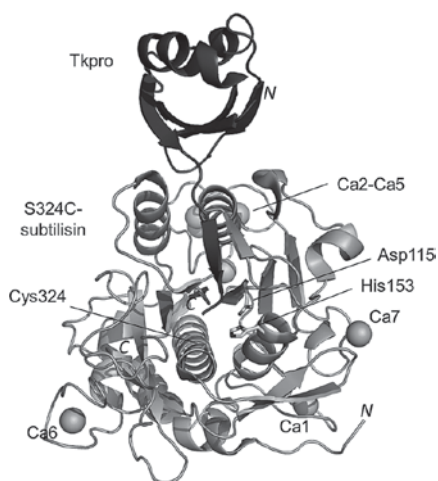


図6. S324C Tk-subtilisinの結晶構造. Tk-subtilisinの主鎖構造は枯草菌由来のsubtilisin Eとほぼ同じであるが, 挿入配列とCaイオンの配位数が特徴的である.

subtilisinの自己分解を回避するため, 活性中心Ser324をCysに変異した酵素を調製してX線結晶構造解析を行った²²⁻²⁵. S324C変異体では, わずかな酵素活性が残存するためProペプチドの自己切断のみが行われ, Proペプチド分解前の分子構造の解析が可能となった.

Pro-S324Cの全体構造(図6)を観察すると, 主鎖構造は枯草菌由来のsubtilisin Eと類似しているものの, 三つの挿入配列(IS1, IS2, IS3)を持ち, 7つのCaイオンが配位しているなどユニークな構造的特徴が明らかとなった. Tk-subtilisinのCaイオンの配位数はこれまで報告されているsubtilisinの中でもっとも多く, Ca1結合部位は多くのsubtilisinに保存されているが他の6つはTk-subtilisinにユニークである. 特に挿入配列2(IS2)には4つのCaイオンが配位していた. このCa結合ループはDx[DN]xDGモチーフというCa結合モチーフとして知られ, 多くのCa結合タンパク質に見られる配列であった²⁶.

それぞれのCaイオンが果たす役割を明らかにする目

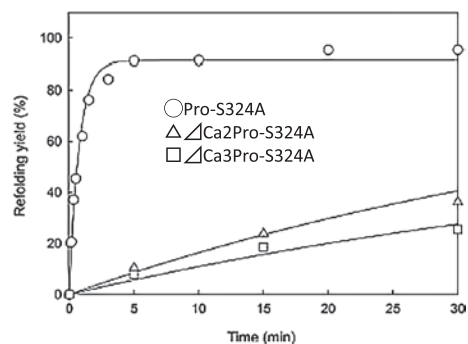


図7. Ca₂, 3結合ドメイン欠失体のリフォールディング速度. Ca₂, 3を失うと構造形成速度が10分の1に低下する.

的で, 活性中心変異体と, それぞれCa₂, Ca₃結合ドメインを欠損させた変異体であるΔCa₂-Pro-S324A, ΔCa₃-Pro-S324Aについて, 折りたたみ速度を速度論的に解析した(図7). 30°C, 10 mM CaCl₂存在下でのそれぞれの折りたたみ速度の速度定数は, Pro-S324Aで1.3 min⁻¹で, ΔCa₂-Pro-S324Aでは0.02 min⁻¹, ΔCa₃-Pro-S324Aでは0.019 min⁻¹であった. 一方で, これらのタンパク質の熱安定性はPro-S324Aに比べて減少してはなかった. これらの結果はCa₂とCa₃結合ドメイン(もしくはイオン)はTk-subtilisinのCaに依存した折りたたみに貢献するが, 折りたたみ後の安定性には貢献していないことを示す(Takeuchiら未発表データ).

Tk-subtilisinはCa結合ループの形成によって, 立体構造形成に必要な高いカイネティックバリアを克服し, 高温環境下でも素早く正しい立体構造を形成することができると考えられる.

他のCaイオン(Ca₁, Ca₆, Ca₇)は, それぞれが離れた位置にある表面ループ上に配位している. Ca₁, Ca₆, Ca₇の結合ループや, Caを配位させるAspを欠損させたPro-Tk-subtilisinとPro-S324Aの変異体を用いて, 示差走査型熱量計(DSC)を用いた熱安定性解析を行った結果, Ca₁, Ca₆, Ca₇結合ドメイン欠失体のT_mは, S324Aに比べてそれぞれ26.6°C, 11.7°C, 4.0°C低くなっていた. これらの結果から, Ca₁, Ca₆, Ca₇はTk-subtilisinの安定性に寄与しており, 特にCa₁は安定性に対して大きな効果があると言える²⁷⁻²⁹.

このような挿入配列は, Tk-subtilisinに加えて, *Thermococcus onnurineus* NA1 (accession YP_002308296) や *Pyrococcus* sp. NA2 (YP_004424756), *Pyrolobus fumarii* 1A (YP_004781243), *Aeropyrum pernix* K1 (NP_147093), *Ferroglobus placidus* DSM 10642 (YP_003436500) のような超好熱菌由来のsubtilaseにのみ見られる. これらの超熱安定性プロテアーゼの中で, IS2とIS3の配列相同性は高いが, IS1の相同性は低い. これは, IS1が

他の部位と相互作用しない伸長配列であることによると思われる。これらの他の subtilase の挿入配列の特性解析は行われていないが、*A. pernix* K1 subtilase (pernisine) は EDTA のようなキレート剤処理によって活性が著しく低下する³⁰⁾。このように、Ca 依存的な折りたたみは超好熱菌由来 subtilisin に共通する可能性があり、挿入配列の獲得が、超好熱 subtilase が高温環境に適応するための戦略になっているのかもしれない。

Tk-SP

一方、Pro-Tk-SP (68 kDa) を大腸菌で異種発現させると、バクテリア由来 subtilisin のように、菌体内で成熟化を開始し 55 kDa と 44 kDa のタンパク質が蓄積する。80°C で熱処理をすると、Pro-Tk-SP (68 kDa) は 55 kDa の中間体を経て 44 kDa のタンパク質に成熟化し、高温によってこの成熟化反応が促進されていることがわかる。

MALDI-TOF MS スペクトロメトリーによって、44 kDa のタンパク質は N 末端 (Ala1-Ala113)、と C 末端 (Asp540-Gly640) を欠失した Pro-Tk-SP の派生物 (Val114-Val539) であることが明らかとなった¹⁶⁾。この結果より、Pro-Tk-SP は N-末端ドメインと C 末端ドメインが切断されて成熟化することが示された。In vitro で行ったリフォールディング試験では、Tk-SP は Ca がなくても正しい構造に折りたたまれることから、Tk-subtilisin と異なり、Tk-SP の折りたたみには propeptide も Ca イオンも必要ないことが示唆される。

Pro-Tk-SP (Pro-Tk-S359A*) の結晶構造を図 8 に示す。この構造は propeptide ドメイン (ProN, Lys4-Ala113)、subtilisin ドメイン (Val114-Thr421)、 β -jelly roll ドメイン (Ala422-Pro522) からなる。Pro-Tk-SP の構造は Pro-Tk-subtilisin に似ているが、挿入配列や subtilisin ドメインの Ca 結合サイトは存在せず、その代わりに β -jelly

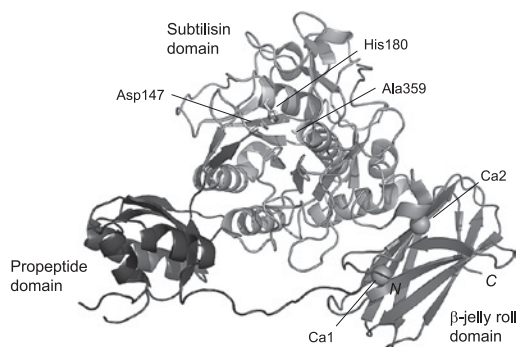


図 8. Tk-SP の結晶構造。Pro ペプチドと成熟化ドメインの主鎖構造は Tk-subtilisin と共通しているが、C 末端側に、 β -jelly roll ドメインが付加している。

roll ドメインと、それにつながる伸長ループが追加されており、それぞれに Ca1 結合サイトと Ca2 結合サイトが局在する。

S359A-SP* から Ca1 結合サイトを含まない β -jelly roll ドメインと Ca2 結合サイトの両方を欠損させた変異体 (Δ J-S359A-SP*^{Ca}) を構築し、CD スペクトルによる熱変性曲線を測定したところ、熱変性の遷移中点 T_m が 29.4°C 低かった。このことから β -jelly roll 周辺に形成される Ca 結合サイトが、タンパク質を安定化することに寄与していることが示唆された³¹⁾。

Tk-SP の N 末端 propeptide ドメイン (ProN) は他の subtilisin の propeptide と同様に subtilisin ドメインに基質のように結合しており、Tk-SP の活性を競合阻害すると思われる。ProN は分子間相互作用によって Tk-SP* の活性を阻害するが、ProN を含まない Tk-SP* でも in vitro で再構成した場合に活性を示すことから、本酵素の折りたたみには ProN は要求されないと考えられる。

医療用洗浄剤としての活用

Subtilase は洗浄用酵素として広く活用されているが、酵素を失活させぬよう使用温度は酵素の耐熱温度以下に限られていた。一般的に温度が高いほうが洗浄効果は高い。きわめて安定性の高い Tk-subtilisin および Tk-SP は、界面活性剤をはじめ洗浄成分との相性もよく、これまでの洗浄用酵素では実現できなかった、高温洗浄、変性条件下での洗浄が可能になった。これにより、異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) のように洗浄が困難とされていた難分解性タンパク質の除去に活用できると考え、これらの酵素の医療用洗浄剤としての可能性を検証した。

Prion 病はヒトの Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) や Gerstmann Sträussler Scheinker syndrome (GSS), kuru, ウシの bovine spongiform encephalopathy (BSE), 羊のスクレイピーを含む致死性の神経変性疾患である³²⁾。これらの疾患は α ヘリックスに富んだノーマル型プリオンタンパク質 (PrP^C) から変換される β シートに富んだ異常型 (PrP^{Sc}) に関連付けられている。感染因子となる PrP^{Sc} は、細胞性の PrP^C を未知の機構によって異常型に変換することで増殖する。したがって、医療器具に付着した PrP^{Sc} の除去は二次感染防止の重要なポイントであるが、PrP^{Sc} は標準的な医療器具の滅菌方法、汚染除去方法に強い耐性がある。世界保健機構 (WHO) の感染防止ガイドラインでは、器具を汚染した PrP^{Sc} の完全な不活化には、135°C での蒸気滅菌、SDS や NaOH、次亜塩素酸のような強い薬剤による処理を推奨している。しかし、これらの方法は、特殊な装置を必要としたり、強い薬剤によって器具にダメージを与えたり、洗浄

作業に危険を伴う可能性があることから、器具の再生といった煩雑な作業が重荷である医療現場に普及しにくいという問題があった。

そこで、活性の強いプロテアーゼが、普及しやすく、なおかつ高度な洗浄安全性を実現できる、新しい医療用洗浄剤に利用できると考えた。Tk-subtilisinの最大活性は市販のプロテアーゼであるsubtilisin Eのおよそ7倍である¹⁷⁾。さらに、ほとんどのタンパク質が変性する5% SDS, 8 M Ureaもしくは6 M GdnHCl (グアニジン塩酸塩) 存在下でもTk-subtilisinは100%の活性を保っていることから、Tk-subtilisinは、タンパク質を変性する化学的、物理的条件のもとでPrP^{Sc}を酵素分解することができると考えられる。

羊のプリオン病であるスクレイピーに感染したマウスの脳ホモジネート (SBH) を、多様な濃度のTk-subtilisinで処理した。SBHの酵素分解物を、抗プリオンタンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法で検出したところ、PrP^{Sc}は検出限界以下に分解することができた³³⁾。Tk-subtilisinのPrP^{Sc}除去能力は汎用的な製品として流通しているProtease Kのそれよりも高く、90 mUのTk-subtilisinは脳ホモジネート中のPrP^{Sc}を16700 mUのProteinase Kよりも効果的に分解している。SBHは加熱によって凝集体を生じるため、Tk-subtilisinが均一に作用できない可能性があるが、SDSやその他の界面活性剤の存在下では凝集が抑制されるため、Tk-subtilisinによる分解が効果的に行われると考えられる (図9)。Tk-subtilisinは通常の洗浄剤だけでなく、PrP^{Sc}の除去を目的とした医療用特殊洗浄剤にも利用できることが期待される³³⁾。

Tk-SPはTk-subtilisinよりも洗浄用酵素としてさらに有望である。先述のように、Tk-subtilisinはその安定性にCaイオンが要求されることから、キレート剤存在下では不安定化してしまう。洗浄有効成分としてキレート剤が含まれるような場合には、Caに依存しないTk-SP

が有効なのである。Tk-SPでもスクレイピー感染マウスの脳ホモジネート中のPrP^{Sc}を、化学薬品との組合せで分解できることが確認されており³⁴⁾、Tk-SPをPrP^{Sc}の感染性を減少させる洗浄剤添加剤として利用した試作品も作製されている。

特殊な洗浄剤としての活用には、さらなる可能性が考えられる。Caliciviridae family, Reoviridae family, Picornaviridae familyのような非エンベロップ型のウイルスは、タンパク質から構成されるカプシドで覆われている。ノロウイルスは感染力が強く、吐瀉物などに含まれるウイルスを完全に不活化しないと集団感染の原因になる。ウイルスの汚染が床やテーブルなど硬質表面の場合、次亜塩素酸での拭き取りが有効であるが、絨毯や衣類などが汚染した場合、除染対象にダメージを与える可能性のある薬剤は使いにくい。

非エンベロップ型ウイルスの一種であるネコカリシウイルスを0.01% w/w以下のTk-SPと室温で接触させ、その感染価の低下をTCID₅₀で評価したところ、およそ5分で感染価は検出下限 (LogTCID₅₀ = 1.5以下) に達することがわかった (Adachiら未発表データ)。食品の残渣や体液などが混ざった吐瀉物中のウイルスを効果的に除去するためには、界面活性剤を使って、ウイルスと酵素の接触機会を増やしてやる必要がある。界面活性剤に強い特性はこのように酵素の利用範囲を広くすることができる。

Subtilisinは産業用酵素として身近に活用されてきたが、酵素としての安定性の限界が、利用範囲を限定していた面もある。Tk-subtilisinとTk-SPのような安定性の高い酵素は、酵素の新しい利用法を提案することに貢献できると考えられる。

Tk-subtilisinおよびTk-SPの生産性

Tk-subtilisinおよびTk-SPに産業用酵素として有用性が示されたことから、これらを大量生産できれば実用化が期待できる。洗浄用酵素としては1 g/L-culture以上の生産効率が求められているが、Tk-SPは常温でも宿主細胞内でタンパク質分解活性を示すため、宿主細胞の生育を阻害してしまい、十分な生産量が得られないという課題があった。Tk-subtilisinに関しては大腸菌の菌体内で不溶性沈殿として発現するため、菌体の生育阻害を回避し、高濃度培養を行うことができる。しかし、Caイオン、温度、Tk-Proペプチドなど成熟化条件に関わる要因を適正に調整する必要があり、不溶性沈殿からの再構成法が複雑で、産業用酵素の生産法としては適さない。

一方、Tk-SPは立体構造形成能力が高く、宿主細胞内で可溶性発現しやすいため、煩雑な再構成操作は不要で

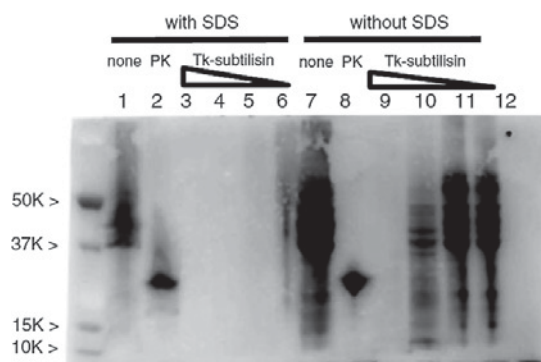


図9. Prionタンパク質の分解

あるものの、上述のようにその活性が宿主細胞の生育を阻害することもあり、高発現系の構築には課題が残っている。

これまでに、分泌発現系やTk-SPの活性を一時的に不活化する試みを行っている。従来、Tk-SPは不活性なPro体として発現した後、成熟化するものであるが、Tk-SPのProペプチドは、安定性が低く速やかに分解してしまうことから宿主細胞内では活性制御ができていない。一方、Tk-subtilisinのプロペプチド(Tk-Pro)は単独で菌体内発現でき、安定な立体構造を形成することができるうえ、Tk-SPに対しても競争的に活性阻害することが確認されている。そこで、Tk-Pro過剰発現下でTk-SPの活性を抑制することを目的として、Tk-ProとTk-SPの共発現系を構築した。野生型Tk-SPは発現誘導をかけると十分な生育ができなくなっていたが、Tk-Proとの共発現によって、宿主細胞の生育阻害は改善され、Tk-SPの収率をおよそ10倍程度改善することができている。これにより大腸菌の発現系において200 mg/L-cultureの生産性を達成している(Adachiら未発表データ)。

また、本酵素の活性を抑制するためにはpropeptideの阻害効果を高めることが有効と考え、活性ドメインとの間に静電的相互作用や疎水性相互作用を新たに導入するようなアミノ酸置換をpropeptide上に設計した。変異propeptideを有するTk-SPは60°C以下の温度領域で成熟化しにくくなることが分かっており、さらなる生産性の向上に貢献できると考えられる。

現在、産業用酵素の生産実績のある宿主で、成熟化抑制効果のある変異酵素の発現系を構築しており、Tk-SPの産業用酵素としての高生産系の開発が期待される。

新しいprotein scaffoldとしての展開

超好熱菌のタンパク質はその酵素活性だけでなく、タンパク質工学の新しいプラットフォームとしての活用も期待できる。Tk-SPのC末端に形成されるβ-jerry rollドメイン(BJR)は、抗体の変換領域(V_LまたはV_Hドメイン)に見られる、βサンドウィッチ構造とよく似た主鎖構造を取っている。このような構造のドメインは、相互作用に関わる他のタンパク質に見いだされており、同様の構造を取るヒトのfibronectinのドメインは、抗体のようにターゲットに特異的に結合するタンパク質のscaffoldとして開発されている。

BJRドメインとラクダ科動物の重鎖抗体の変換領域(VHHドメイン)の主鎖構造を重ね合わせると、タンパク質構造の類似性の指標となるroot mean square deviation (RMSD)が2.0 Å以下で重なり合う(図10)。

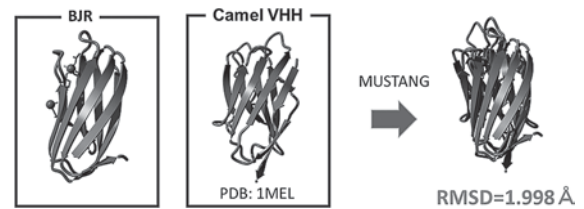


図10. β-jerryrollドメインとCamel VHH

VHHドメインの抗原認識に関わるCDR 2, 3に相当する部分もBJR上に存在していることから(それぞれEF loopおよびCD loop)、両者は構造的に高い類似性を示すといえる。さらにBJRを大腸菌で組換え発現させると、熱変性温度が85°Cと高く、安定なドメインであることから、タンパク質工学的に機能をデザインするためのプラットフォームとして活用できる可能性が考えられる。本ドメインについては、抗原認識部位に相当するループ上にランダムな変異を導入して変異ライブラリーを構築し、ターゲットタンパク質に対する結合特性を指標としたスクリーニングを行うことを計画しており、今後抗体のようにターゲットを認識する特異的 binder scaffoldとしての利用が期待される。

おわりに

Subtilisinのように、成熟化過程が複雑で、自己分解の可能性もある酵素は取り扱いが難しく産業化の課題となっていたが、構造と機能の詳細な解析によって、分子レベルでの成熟化機構、安定化機構が明らかになれば、その調製法、利用法を新たに開発することができる。超好熱菌由来subtilisinの構造と機能の相関について得られた知見が蓄積されてきたことで、取り扱いが難しく、生産性も高くないTk-subtilisinとTk-SPの性能を最大限に活用するために必要な手法が確立されつつある。両酵素の特殊な酵素特性をうまく利用することができれば、産業応用の可能性は医療用洗浄剤にとどまらず、これまででは酵素を用いることができなかったような新しい用途へのプロテアーゼの新展開が期待できる。

タンパク質の構造と機能の関係には、未知の可能性が広がっている。超好熱菌に限らず多くの極限環境微生物が生産するタンパク質は、天然の見本である。これらのタンパク質は我々の常識を超えた魅力的な、機能を持っていると考えられる。その機能を発現するのに必要な分子構造を明らかにすることで、タンパク質機能をより深く理解できれば、新しい機能を持ったタンパク質をデザインすることも可能だと考える。極限環境生物由来のタンパク質の構造と機能の研究を通して、バイオテクノロジーの新しい可能性を拓くことに挑戦したい。

謝 辞

本研究は大阪大学院工学研究科極限環境生命工学領域（現、生物化学工学領域）で行われたものであり、タンパク質の構造機能相関研究をご指導いただいた大阪大学名誉教授金谷茂則先生、現北海道大学教授森川正章先生に深く御礼申し上げます。また、大阪大学教授大政健史先生、本研究にご指導頂きました現日本大学教授春木満先生、現京都府立大学教授高野和文先生に御礼申し上げます。実用化研究において多大な御支援を賜りました現釧路工業技術センター土居幹生氏、徳島大学坂口末廣教授、内山圭司准教授、琉球大学作道章一准教授、アマノエンザイム株式会社小池田聡様、サラヤ株式会社平田善彦様、尾田友香様、中村絵美様に御礼申し上げます。また、成果の大半は大阪大学と一緒に研究を行ってきたMaria Purido博士、田中俊一博士、上原了博士、Tita Foophow博士をはじめとする22名の同窓学生によるものです。ここに深く感謝いたします。

本研究の一部は、日本学術振興会、科学技術新興機構、厚生労働省、関西バイオメディカルクラスターの助成を受けて実施されたものです。

文 献

- 1) Adams, M. W. and Kelly, R. M.: *Trends Biotechnol.*, **16**, 329–332 (1998).
- 2) Imanaka, T.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **87**, 587–602 (2011).
- 3) de Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J., and Villa, T. G.: *Protein Pept. Lett.*, **13**, 645–651 (2006).
- 4) Siezen, R. J. and Leunissen, J. A.: *Protein Sci.*, **6**, 501–523 (2007).
- 5) Awan, Z., Baass, A., and Genest, J.: *Clin. Chem.*, **60**, 1380–1389 (2014).
- 6) Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A.: *Int. J. Biochem.*, **40**, 1111–1125 (2008).
- 7) Uehara, R., Takano, K., Kanaya, S., and Koga, Y.: *Biotechnology of Microbial Enzymes, production, biocatalysis and industrial applications*, 81–117, Elsevier (2016).
- 8) Eder, J., Rheinhecker, M., and Fersht, A. R.: *Biochemistry*, **32**, 18–26 (1993).
- 9) Li, Y., Hu, Z., Jordan, F., and Inouye, M.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 25127–25132 (1995).
- 10) Hu, Z., Haghjoo, K., and Jordan, F.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 3375–3384 (1996).
- 11) Shinde, U. P. and Thomas, G.: *Methods Mol. Biol.*, **768**, 59–106 (2011).
- 12) Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanaka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4559–4566 (1994).
- 13) Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., and Imanaka, T.: *Archaea*, **1**, 263–267 (2004).
- 14) Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., and Imanaka, T.: *Genome Res.*, **15**, 352–363 (2005).
- 15) Kannan, Y., Koga, Y., Inoue, Y., Haruki, M., Takagi, M., Imanaka, T., Morikawa, M., and Kanaya, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2445–2452 (2001).
- 16) Foophow, T., Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **23**, 347–355 (2010).
- 17) Pulido, M. A., Saito, K., Tanaka, S., Koga, Y., Morikawa, M., Takano, K., and Kanaya, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 4154–4162 (2006).
- 18) Tanaka, S., Takeuchi, Y., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *FEBS Lett.*, **582**, 3875–3878 (2008).
- 19) Tanaka, S., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *J. Mol. Biol.*, **394**, 306–319 (2009).
- 20) Pulido, M. A., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 143–153 (2007).
- 21) Pulido, M. A., Tanaka, S., Sringiew, C., You, D.-J., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *J. Mol. Biol.*, **374**, 1359–1373 (2007).
- 22) Uehara, R., Ueda, Y., You, D.-J., Koga, Y., and Kanaya, S.: *FEBS J.*, **280**, 994–1006 (2013).
- 23) Tanaka, S., Saito, K., Chon, H., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **62**, 902–905 (2006).
- 24) Tanaka, S., Saito, K., Chon, H., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *J. Biol. Chem.*, **282**, 8246–8255 (2007).
- 25) Tanaka, S., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *J. Mol. Biol.*, **372**, 1055–1069 (2007).
- 26) Rigden, D. J., Woodhead, D. D., Wong, P. W., and Galperin, M. Y.: *PLoS One*, **6**, e21507 (2011).
- 27) Uehara, R., Takeuchi, Y., Tanaka, S., Takano, K., Koga, Y., and Kanaya, S.: *Biochemistry*, **51**, 5369–5378 (2012).
- 28) Uehara, R., Tanaka, S., Takano, K., Koga, Y., and Kanaya, S.: *Extremophiles*, **16**, 841–851 (2012).
- 29) Uehara, R., Angkawidjaja, C., Koga, Y., and Kanaya, S.: *Biochemistry*, **52**, 9080–9088 (2013).
- 30) Catara, G., Ruggiero, G., La Cara, F., Digilio, F. A., Capasso, A., and Rossi, M.: *Extremophiles*, **7**, 391–399 (2003).
- 31) Foophow, T., Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S.: *J. Mol. Biol.*, **400**, 865–877 (2010).
- 32) Prusiner, S. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363–13383 (1998).
- 33) Koga, Y., Tanaka, S., Sakudo, A., Tobiume, M., Aranishi, M., Hirata, A., Takano, K., Ikuta, K., and Kanaya, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 2113–2120 (2014).
- 34) Hirata, A., Hori, Y., Koga, Y., Okada, J., Sakudo, A., Ikuta, K., Kanaya, S., and Takano, K.: *BMC Biotechnol.*, **13**, 19 (2013).