

## 熱に安定なタンパク質を創る

藤井創太郎

深海の熱水噴出孔や南極の氷の中などの極端な環境に適応した生物が数多く報告されている。それらは総称して「極限環境生物」と呼ばれており、数多くの研究者を魅了する。その魅力のひとつは、極限環境生物の持つタンパク質が高い熱安定性を有するなど、生育環境に応じた性質を示す点である。熱に安定なタンパク質の代表格が好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来のDNAポリメラーゼであり、それを用いたDNA增幅反応は分子生物学分野には欠かせない技術となっている。近年、熱に安定であり、より正確なDNA增幅を可能とする好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来のDNAポリメラーゼなどの新しい酵素も台頭している<sup>1)</sup>。タンパク質を研究や産業へ応用するうえでは熱に対して安定であることが多くの場合に望ましく、その探索には好熱菌から目的のものを探すのが手っ取り早い。

熱安定化にはどのような分子機構が働いているのだろうか。それを知るための効果的な方法のひとつが、好熱菌と常温菌の持つタンパク質の立体構造を比較することである。たとえば、好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のシトクロムcについて、常温菌由来の相同タンパク質との立体構造の比較により、疎水性相互作用の向上や水素結合の付加、さらに、 $\alpha$ -ヘリックスの新たな形成などが熱安定化に寄与することが明らかにされている<sup>2)</sup>。また、好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のCutA1は、タンパク質史上最高の変性温度を有しており、その変性温度は約150°Cにもなる<sup>3)</sup>。常温菌由来の相同タンパク質とその立体構造を比較すると、好熱菌由来CutA1では分子表面に多数のイオン性相互作用がネットワークを形成し、これが熱安定化に寄与することが明らかにされている。

好熱菌由来のシトクロムcやCutA1のみならず、一般的に好熱菌の持つタンパク質は、常温菌由来の相同タンパク質と比べて高い熱安定性を有する。その安定化機構として、分子内のイオン性の相互作用、水素結合、S-S結合などの数が多くなっていたり、疎水性相互作用の向上によって分子内空洞が小さくなっていたりすることが知られる。さらに、 $\alpha$ -ヘリックス中のアラニン残基数の増加による $\alpha$ -ヘリックス形成力の向上や、ループ中のプロリン残基数の増加によるループ構造の強化など、安定化機構は数多く存在する。

たとえ好熱菌で同様の機能を示す相同タンパク質が存在しない場合でも、熱に安定なタンパク質を創り出すこ

とは可能である。たとえば、元々海洋生物由来のGFP(緑色蛍光タンパク質)は不安定で常温でもすぐに消光してしまっていたため、持続的な蛍光標識が困難であった。そこで人工的にGFPを改変し、熱に安定なものが選別され、現在遺伝子工学などで使われているGFPとして広く普及した。その当時、改変にはランダム変異による人海戦術的手法が用いられたが、安定化のノウハウを集結すれば、もっと効率のよい改変も可能であったのかもしれない。

ノウハウの例として、疎水性相互作用の導入による安定化は成功しやすく、水素結合の導入による安定化は失敗しやすい、という経験則があり、これを利用することで安定化の成功率を上げることができる。疎水性相互作用の導入には角度や距離の制約がないため、分子内に余分なスペースさえあれば、その隙間に疎水側鎖が入り込み、タンパク質は安定化する。それに対して水素結合は、角度が30度以内かつ距離が約3 Å程度に収まる必要があるため、失敗に終わることが多い<sup>1)</sup>。ただし、疎水性度のみに着目した安定化だけでは、立体障害による不安定化を時に引き起こしてしまうため、それらの安定化機構はバランス良く配置される方が良い場合もある。

熱に安定なタンパク質がまるでエリートであるかのように述べてきたが、それは同時に常温での機能を失わせるというデメリットもある。たとえば、好熱菌および常温菌由来のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼについて、その変性温度と常温での代謝回転数は負の相関を示す<sup>4)</sup>。一般的に好冷菌由来のタンパク質の安定性が非常に低い理由は、安定性を犠牲にして低温での代謝回転数を高めるためである。しかし、上記の負の相関を無視するような高い安定化かつ高い機能性を有する酵素を人為的に創り出したという報告もあり、このことは自然界に存在しない新規酵素をヒトの手により創り出せることを示唆している。好熱菌にタンパク質の安定化を委ねることは時に必要であるが、それを意図的に付与することも可能であり、そのためには安定化の原理を駆使する柔軟な発想が必要とされる。

- 1) 今中忠行：極限環境生物の産業展開、シーエムシー出版(2012).
- 2) 三本木至宏ら：日本熱測定学会、37, 9 (2010)
- 3) 油谷克英：生物物理、49, 226 (2009)
- 4) Akanuma, S. et al.: Eur. J. Biochem., 260, 499 (1999).