特集 —— 生体関連物質と水溶液の高圧力科学 ——

高圧下へのタンパク質の適応

Protein Adaptation to High-Pressure Environments

加藤 千明

Chiaki KATO

Studies of pressure-adapted (piezophilic) protein have lagged behind the investigation of other extremophilic proteins, however the recent characterization of proteins from deep-sea organisms has substantially accelerated the field. Recent experiments on proteins from deep-sea sources have contributed to our understanding of protein adaptation to high pressure. These studies have also complemented previous work that had investigated the effect of pressure on the activity and stability of “normal”, unadapted proteins. Together this research has lead to the conclusion that volume changes due to the hydration effects of exposed side chains and large internal cavities drive protein unfolding under high pressure.

[deep-sea, enzyme activity, piezophilic, protein structure, *Shewanella violacea*]

1. はじめに

一般的には、タンパク質に圧力をかけると体積変化に依存した構造の変化が起こり、その結果として多くの場合その活性が阻害され、さらに高い圧力下では失活することが知られている。しかしながら、深海高水圧環境に適応して生息する生物の作るタンパク質は、その水深に応じた環境圧力下でも良好に働いていることが理解されている。すなわち、こうした深海生物の作るタンパク質は、高圧力環境に対して耐性を持っていると考えられる。しかしながら、こうした圧力耐性とタンパク質の構造との相関に関しては研究例が少なく、こういった構造的な特徴が圧力耐性に直接的に効いているのかについては、まだ一般則は出されていない。

一方、近年における深海調査研究の進展から、高水圧環境に適応して生息している深海微生物、なかんずく好圧性微生物に関する知見が蓄積し、それらのゲノム解析も達成され[1, 2]、こうした深海微生物の作るタンパク質の情報も飛躍的に増大してきている。これらのタンパク質は高圧環境に適応した構造を持つと考えられ、これと大気圧下に適応した微生物の相同タンパク質とを比較することにより、タ

ンパク質の耐圧性に関わる理解が得られることが期待されている。本稿では、これまで筆者らの研究室で取り組んできた好圧性微生物 *Shewanella violacea* DSS12 株の作るタンパク質の圧力適応機構に関する知見をまとめた。

2. 好圧性微生物のタンパク質の特徴

Shewanella violacea DSS12 株は、琉球海溝深度 5,110 m から得られた深海底泥から分離されたバクテリアで、その生育至適が 8℃, 30 MPa である好冷性の好圧菌である[3]。本菌は好圧菌であるにもかかわらず、大気圧下から 70 MPa までの高圧下まで良好に生育でき、種々な圧力条件下での遺伝子発現のメカニズムを解析するためのモデル微生物として利用されてきている[4]。以下にこれまで知見の得られたいくつかのタンパク質について、その好圧菌タンパク質の特徴についてまとめた。

2.1 細胞分裂タンパク質 FtsZ

微生物にとって FtsZ タンパク質の機能発現は、その生育にとって必須である。大気圧に適応した大腸菌を高圧条件下 (40~50 MPa) で培養すると細

〒237-0061 横須賀市夏島町 2-15 独立行政法人海洋研究開発機構 極限環境生物圏研究センター
Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima-cho,
Yokosuka 237-0061
Electronic address: kato_chi@jamstec.go.jp

胞の伸張が見られるが、これは圧力により FtsZ タンパク質のリング形成が阻害されるためである[5]。一方 *S. violacea* の場合、こうした高圧条件下でも FtsZ リング形成の阻害がおこらず、良好に細胞分裂がおこることが観察されている (Fig. 1)。FtsZ のアミノ酸一次構造を本好圧菌と大腸菌をはじめとする大気圧下に適応した微生物とで比較すると、GTPase 活性ドメインを含む N 端側が非常に高く保存されているのに対し、リング形成に重要な役割を担う C 端側に大きな違いが見られており、こうした違いが高圧下での FtsZ リング形成の機能に深くかかわっている可能性が示唆されている[6]。

2.2 ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)

DHFR はジヒドロ葉酸 (DHF) を還元してテトラヒドロ葉酸 (THF) を作る酵素で、この反応でできる THF がプリン核酸やアミノ酸生合成のための重要なコファクターであるため、あらゆる生物に必須の酵素であることが知られている。*S. violacea* と大腸菌の DHFR の活性を各圧力条件下で測定したところ、大腸菌の酵素が加圧に伴い失活していくのに対し、*S. violacea* のものは逆に 100 MPa 程度まで活性が上昇し、これを越えた圧力でようやく活性が落ちていく様子が確認された (Fig. 2)。好圧菌の DHFR の活性化体積を測定すると、0.1-100 MPa の範囲で -5.8 ± 0.8 ml/mol となり、遷移状態において体積が減少する。このような圧力による活性化促進効果は、

本好圧菌の生育環境を考えると興味深い[7]。ちなみに大腸菌の DHFR の活性化体積変化は $+8.1 \pm 0.8$ ml/mol で、加圧により活性が低下する傾向を裏付けた。

2.3 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)

IPMDH はロイシン生合成系のキー酵素であり、多くの微生物においてその存在が確認されており、立体構造学的な知見も豊富なタンパク質の一つである。ここでは、*S. violacea* を含む各種の *Shewanella* 属細菌から、IPMDH を調整し、その活性と圧力条件との相関に関して測定を行った[8]。*S. oneidensis* は大気圧下に適応した菌で、*S. benthica* DB6705 および *S. benthica* DB21MT-2 はそれぞれ日本海溝深度 6,356 m、マリアナ海溝深度 10,989 m より分離された好圧菌である。その結果、大気圧下に適応している *S. oneidensis* の IPMDH において顕著な圧力感受性が見られ、マリアナ海溝から分離された絶対好圧菌 (大気圧下では全く生育できない好圧菌) の酵素では、200 MPa の条件でもその 8 割近い活性が保持され、高度な耐圧性を示すことがわかった (Fig. 3)。

2.4 RNA ポリメラーゼ

RNA ポリメラーゼは、DNA を鋳型として RNA を転写する生物にとって必須の重要酵素であり、バクテリアの場合、DNA 上のプロモーター部位を認

Fig. 1. Observation of FtsZ ring formation in *S. violacea* (upper panel) and *Escherichia coli* (lower panel) at several pressure conditions using immunofluorescence microscopy (IFM). The figure was modified from previous report[5, 6].

識するシグマサブユニットと転写活性を有するベータ、ベータプライム、アルファサブユニット複合体とからなる複雑な構造を持った酵素である。一般的にこうした複雑な構造を持つ酵素は加圧に対して感受性が高いと思われるが、これまでの知見から、好圧菌には加圧に応答して転写するメカニズムを有

Fig. 2. Pressure dependency of the enzymatic activities of *S. violacea* DHFR (○, svDHFR) and *Escherichia coli* DHFR (●, ecDHFR). Dashed lines represent the trend lines for the data. The figure was modified from previous paper[7].

していることが解っている[4]。したがって、好圧菌の RNA ポリメラーゼには圧力耐性があり、高圧条件下でもよく働く仕組みが存在することが示唆さ

Fig. 3. Pressure-dependent activity of IPMDH from various bacterial soruces. Relative activities were measured in pressurized cells 2 min after the application of pressure. Symbols indicate origin of IPMDH: $\triangle$, *S. oneidensis* (so IPMDH); $\blacktriangle$, *S. violacea* DSS12 (sv IPMDH); $\circ$, *S. benthica* DB6705 (sb6705 IPMDH); $\bullet$, *S. benthica* DB21MT-2 (sbMT-2 IPMDH). The figure was modified from previous paper[8].

Fig. 4. Effects of high hydrostatic pressure on the subunit association of the RNA polymerase from *E. coli* (A) and *S. violacea* (B). Native PAGE was performed at 0.1 MPa (upper panels) or 140 MPa (lower panels), followed by SDS-PAGE at 0.1 MPa. Proteins were visualized by silver staining. Each subunit of RNA polymerase is shown by an open circle. M: Molecular weight marker; 1st dim: 1-D separation, 2nd dim: 2-D separation. The figure was modified from previous paper[9].

れている。そこで、こうした複雑な構造を持つタンパク質の圧力下での挙動を解析するために、高圧電気泳動装置（HPEA; High Pressure Electrophoresis Apparatus）を開発した[9]。この装置は、タンパク質の電気泳動をかける前・中・後に一貫して加圧状態を付加することができるもので、加圧下でのタンパク質の会合・分離を直接的に検出することが可能である。Fig. 4 に HPEA を用いて大腸菌と *S. violacea* との RNA ポリメラーゼの 140 MPa における、構造の安定性について実験した結果を示す。大腸菌では、加圧下において RNA ポリメラーゼの各

サブユニットが解離していることが示されたが、*S. violacea* では、140 MPa の条件でも安定に構造が保持されていた。こうした加圧下での構造保持にはプロモーター認識部位であるシグマサブユニットの存在が不可欠であり、4つのサブユニットがまとまって好圧菌の高圧下での安定性を維持していることが解明された[9]。

3. 高圧適応したタンパク質の構造

これまで述べた4つのタンパク質から、その構造

Fig. 5. Predicted three-dimensional structures of the IPMDH of *S. oneidensis* (A) and *S. benthamia* DB21MT-2 (B), and the σ^{70} subunit of *S. violacea* (C), *E. coli* (D) and *S. oneidensis* (E). Three-dimensional structure of the IPMDH and σ^{70} subunit predicted by the 3D-JIGSAW program (version 2.0) using the crystal structure of *E. coli* proteins as the templates. The domains for loops and β -sheet structures are highlighted in IPMDH, and the domains for DNA melting, DNA recognition, core binding, loop structure, and two β -sheet structures are indicated in σ^{70} subunit. The parts of figures (C-E) were modified from previous data[9].

的な知見が蓄積している IPMDH と RNA ポリメラーゼ・シグマサブユニットに関して、3D-JIGSAW プログラムを用いて推定される 3 次元構造を構築した (Fig. 5)。IPMDH では、大気圧下に適応している *S. oneidensis* と絶対好圧菌の *S. benthica* DB21MT-2 の酵素の比較を行い (Fig. 5A, B), またシグマサブユニットでは、好圧菌 *S. violacea* と大気圧下に適応している大腸菌, *S. oneidensis* のものとの比較を行った (Fig. 5C, D, E)。その結果、興味深いことに大気圧下に適応したタンパク質においてその表層に存在するループ構造が、ベータシート構造に置き換わっているということが、これら 2 つのタンパク質の場合に共通してみられた。こうした構造の違いが、タンパク質の圧力耐性にどのように寄与しているのかは今後の解析を待たねばならないが、タンパク質研究における深海好圧性微生物の有用性が示された例といえるであろう。

4. おわりに

高圧下における生物の挙動は、Abe らにより「圧力生理学, Piezophysiology」という研究分野が提唱され[10], 近年急速にその研究が進展している。圧力生理学というのは、生きた細胞や生物体そのものに圧力を加えそのレスポンスを解析することにより、今までわかっていない新たな生物現象を解明しようとするものである。こうした分野の最近の進捗状況については Abe の総説[11] に詳しい。本稿にて記述したタンパク質の圧力耐性に関する研究も、こうした分野で進展してきたが、過去にはいくつかの既知のモデルタンパク質を用いた研究が中心であった。したがって、元々高水圧環境に適応して生息している深海生物を材料とした研究例はまだそれほど多くはない。深海の生き物は、その長い深海環境に対する適応戦略の中で、その生育に必須の機能を有するタンパク質を耐圧性に作り替えてきていることが推定され、今後ますますこうした生物を材料とした研究が圧力研究の中で重要な位置を占めていくであろう。

今回、高圧適応した 2 つの異なるタンパク質では、表層のループ構造がベータシートに置き換わっていることを指摘した。このことから、高圧環境下ではベータシート構造がより安定である可能性が考えられ、タンパク質表面の局所ドメインが全体の安定性

や機能に重要であることが示された意義は大きい。こうした構造の変化が、好圧性微生物の有するタンパク質の耐圧化戦略の一般則であるか否かは今後のより広範な知見を待たねばならないが、体積変化とタンパク質の安定性との相関が垣間みれたようで非常に興味深い。今後、タンパク質の構造活性相関を明らかにするためにも、さらに好圧性微生物の利用が高まることが期待され、特に、構造解析のグループとの共同研究が重要となっていくであろう。

謝 辞

本稿を執筆するに際し、有益なご助言をいただいた本機構の阿部文快博士・佐藤孝子博士に謝意を表します。また、好圧菌研究ネットワークの仲宗根薫博士 (近畿大学)・為我井秀行博士 (日本大学)・大前英司博士 (広島大学) の共同研究の熱意に甚々の謝意を表します。

参考文献

- [1] 仲宗根薫, 森浩禎, 馬場知哉, 加藤千明: 化学と生物, **41**, 92 (2003).
- [2] A. Vezzi, S. Campanaro, M. D'Angelo, F. Simonato, N. Vitolo, F.M. Lauro, A. Cestaro, G. Malacrida, B. Simionati, N. Cannata, C. Romualdi, D.H. Bartlett, G. Valle: Science, **307**, 1459 (2005).
- [3] Y. Nogi, C. Kato, K. Horikoshi: Arch. Microbiol., **170**, 331 (1998).
- [4] K. Nakasone, A. Ikegami, H. Kawano, R. Usami, C. Kato, K. Horikoshi: Extremophiles, **6**, 89 (2002).
- [5] A. Ishii, T. Sato, M. Wachi, K. Nagai, C. Kato: Microbiology, **150**, 1965 (2004).
- [6] A. Ishii, K. Nakasone, T. Sato, M. Wachi, M. Sugai, K. Nagai, C. Kato: J. Biochem., **132**, 183 (2002).
- [7] E. Ohmae, K. Kubota, K. Nakasone, C. Kato, K. Gekko: Chem. Lett., **33**, 798 (2004).
- [8] L.M.I. De Poorter, Y. Suzuki, T. Sato, H. Tamegai, C. Kato: Mar. Biotechnol., **6**, S190 (2004).
- [9] H. Kawano, K. Nakasone, M. Matsumoto, R. Usami, C. Kato, F. Abe: Extremophiles, **8**, 367 (2004).
- [10] F. Abe, C. Kato: in *Extremophiles in Deep-Sea Environments*, eds. K. Horikoshi, K. Tsujii (Springer-Verlag, Tokyo, 1999), pp. 227-248.
- [11] F. Abe: Biosci. Biotechnol. Biochem., **71**, 2347 (2007).

[2008 年 1 月 24 日受理]
© 2008 日本高圧力学会