


 解説

## 超好熱菌由来蛋白質の熱力学的安定化機構

向山 厚, 高野和文

(受取日: 2008年9月10日, 受理日: 2008年10月2日)

## Thermodynamic Stability of a Hyperthermophilic Protein

Atsushi Mukaiyama and Kazufumi Takano

(Received September 10, 2008; Accepted October 2, 2008)

We describe the thermodynamic stability of a hyperthermophilic protein with respect to the equilibrium and kinetic aspects. The stabilization mechanism of a hyperthermophilic protein is found to be characterized by its slow unfolding and this appears to be a common characteristic of hyperthermophilic proteins. It was shown that the buried hydrophobic residues contribute to the kinetic robustness. Furthermore, we discuss whether some concepts about protein stability, which are observed in mesophilic proteins, are applicable to the hyperthermophilic protein.

Keywords: hyperthermophilic protein; stability; folding

## 1. はじめに

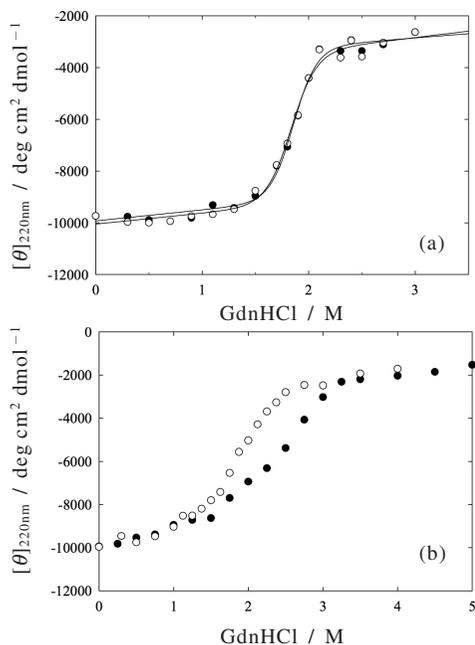
微生物は生育至適温度の違いから, 低温菌 (20 °C以下で生育可能), 中温菌, 好熱菌 (55 °C以上で生育可能), 高度好熱菌 (75 °C以上で生育可能), 超好熱菌 (90 °C以上で生育可能) に分類される。これらが生産する蛋白質は熱に対して異なる安定性を示し, 一般に菌の生育至適温度が高いほど高い安定性を示す。したがって, 超好熱菌由来蛋白質は高い安定性を有しているため, その安定化機構を明らかにすることは蛋白質全般の安定化機構, 構造形成機構に新たな知見を与えることやそれらの普遍性を確立することが期待される。<sup>1)</sup> さらに, 耐熱性の高い蛋白質は産業分野での利用価値が高いため, 安定化機構の理解は蛋白質の応用利用に対しても多大な貢献ができると考えられる。これまでに, (超・高度) 好熱菌由来蛋白質とその中温生物 (生育温度域が20~40 °C程度) 由来ホモログのアミノ酸配列を比べての統計的解析などから, イオン結合の増加などが超好熱菌由来蛋白質の特徴的な安定化因子として提案されてい

る。しかしながら, 実験によって超好熱菌由来蛋白質の熱力学的安定化機構を明らかにした例はまだ少ない。この理由として, 安定性が高いことは研究を行う上で大きな魅力であるが, 多くの場合, 変性温度が高いため変性反応の可逆性に乏しいことが挙げられる。本稿では, 我々が高い可逆性を示す単量体の超好熱菌モデル蛋白質を見出し, このモデル蛋白質を用いた研究により明らかとなった超好熱菌由来蛋白質の構造安定化機構について紹介する。

## 2. 平衡論的・速度論的に安定な超好熱菌由来蛋白質

鹿児島県の小宝島の硫気孔により単離された超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼHII (Tk-RNase HII) はDNA/RNAハイブリッドのRNA鎖のみを特異的に切断する酵素で, 228アミノ酸残基からなる単量体の蛋白質である。また, X線結晶解析によりすでにその立体構造が決定されている。<sup>2)</sup>

我々はまず, 一定温度での平衡論的安定性を求めるために, 変性剤である塩酸グアニジン (GdnHCl) を用いた変



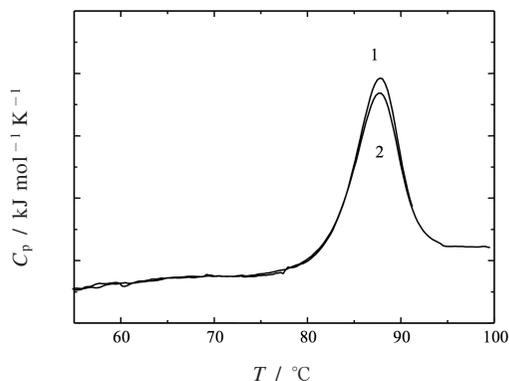
**Fig.1** GdnHCl-induced unfolding (closed circles) and refolding (open circles) curves of Tk-RNase HII at (a) 50 °C in two weeks and (b) 20 °C in one month. For unfolding, Tk-RNase HII was incubated in GdnHCl at different concentrations. For refolding, the protein, which was unfolded completely at a 4 M GdnHCl concentration, was diluted with buffer and the diluted protein solution was incubated.<sup>3)</sup>

性剤変性を波長 220 nm の CD スペクトル変化で追跡した。<sup>3)</sup> 50 °C, pH 9.0 で測定を行ったところ, GdnHCl 変性は完全に可逆的であり, およそ 2 週間で反応が平衡に達することが確認された (**Fig.1(a)**)。得られた変性曲線を変性過程が二状態転移であると仮定した式(1), (2)で, GdnHCl 変性における熱力学的パラメーターを算出した。

$$y = \{ (b_n^0 + a_n [D]) + (b_u^0 + a_u [D]) \exp [(\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m [D]) / (RT)] \} / \{ 1 + \exp [(\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m [D]) / (RT)] \} \quad (1)$$

$$C_m = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) / m \quad (2)$$

ここで,  $y$  はある GdnHCl 濃度  $[D]$  において観測される  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$  の値である。 $b_n^0$ ,  $b_u^0$  はそれぞれ天然状態, 変性状態の  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$  を示し,  $a_n$ ,  $a_u$  はそれぞれ転移前, 転移後領域の直線の傾きを表している。 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  は GdnHCl が含まれていないときの変性に伴う  $\Delta G$  の値である。 $m$  は  $\Delta G$  を



**Fig.2** Reversibility of heat denaturation of Tk-RNase HII at pH 9.0. Curves 1 and 2 represent the first and second scans.<sup>3)</sup>

GdnHCl 濃度に対して直線近似したときの傾きであり,  $C_m$  は変性中点における GdnHCl 濃度を示す。 $T$  は測定温度 (単位は K) を,  $R$  は気体定数を表している。50 °C における Tk-RNase HII の  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  と  $m$  の値はそれぞれ 43.6 kJ mol<sup>-1</sup>, 23.6 kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> であった。50 °C における  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の値はこれまでに報告されている多くの中温生物由来蛋白質と比べてかなり大きく, Tk-RNase HII は非常に安定であることを示している。しかしながら, 20 °C でも同様の測定を試みたが, 1 ヶ月経過した後でも, 反応が平衡に達していないことが, 変性と巻き戻り反応による転移曲線が一致しないことから確かめられた (**Fig.1(b)**)。一般に, 中温生物由来の蛋白質では数時間のうちに反応が平衡に達することから, これは変性反応あるいは巻き戻り反応またはその両方が非常に遅いために生じた現象であると考えられる。つまり, Tk-RNase HII が平衡論的に安定化しているだけでなく, 速度論的にも安定化していることが示唆された。

次に, Tk-RNase HII の熱変性を断熱型示差走査熱量計 (DSC) により測定した。測定後のサンプルを冷却し再度測定したところ, ほぼ同じような DSC カーブが得られたことから, 熱変性においても高い可逆性を示すことが確認された。超好熱菌由来蛋白質はその高い安定性のために高温で変性するので, 変性するとすぐに凝集することがしばしば見られる。従って, 熱変性においてこれほど高い可逆性を示す超好熱菌由来蛋白質は珍しい。Tk-RNase HII の DSC カーブは単一の吸熱ピークが観測された (**Fig.2**)。しかしながら, DSC カーブから求められる変性中点の温度 ( $T_m$ ) の値は昇温速度を小さくするほど低下した。例えば昇温速度 90 °C h<sup>-1</sup> での  $T_m$  の値は 89.2 °C であったが, 昇温速度 5 °C h<sup>-1</sup> での  $T_m$  の値は 87.2 °C であった。もし, 変性速度が

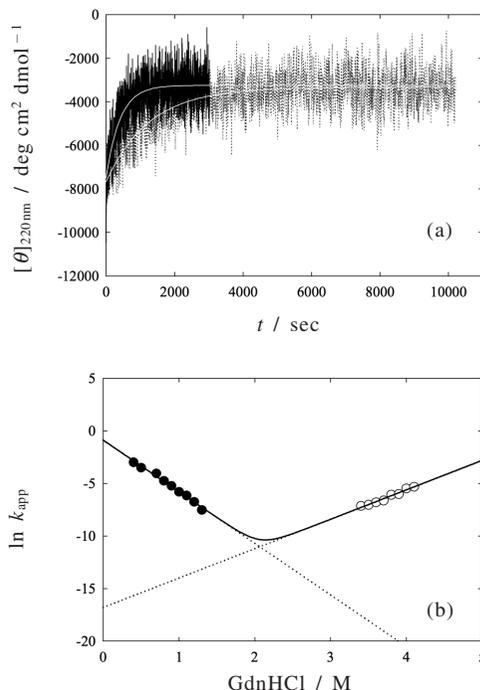
昇温速度より大きく、測定条件下において平衡系に達しているのであれば、このような現象は観測されない。このことから、Tk-RNase HIIの熱変性は、変性速度がきわめて小さいためにこれらの昇温速度条件下では平衡に達していないことがわかる。一方、中温生物由来蛋白質の熱変性ではこのような昇温速度に対する依存は見られず、多くの場合、昇温速度を60 °C h<sup>-1</sup>に設定すると、測定条件下において平衡に達している。以上のGdnHCl変性、および熱変性測定の結果から、Tk-RNase HIIは高い平衡論的、速度論的な安定性を示すことが明らかとなった。

そこで、Tk-RNase HIIの速度論的安定性について詳細な解析を行うために、50 °CでのGdnHCl変性による変性反応、および巻き戻り反応の速度実験をmanual mixingによるGdnHCl濃度ジャンプにより行った。反応はCDスペクトルの波長220 nmの値を指標とし、すべての変性、巻き戻り反応は1相の速度相で近似した (Fig.3(a))。GdnHClの終濃度を変えて測定を行い、見かけの反応速度定数 ( $k_{app}$ ) の対数値をGdnHCl終濃度に対してプロットした (Fig.3(b))。得られた結果を、式(3)で近似した。

$$\ln k_{app} = \ln \{k_r(\text{H}_2\text{O}) \exp(-m_r[D]) + k_u(\text{H}_2\text{O}) \exp(+m_u[D])\} \quad (3)$$

ここで、 $k_u(\text{H}_2\text{O})$  と  $k_r(\text{H}_2\text{O})$  はそれぞれGdnHClの含まれていない溶液中での変性、巻き戻り反応の速度定数である。 $m_u$  と  $m_r$  はそれぞれ  $k_u$  と  $k_r$  のGdnHCl濃度依存性を表す。Tk-RNase HIIの変性、巻き戻り反応は転移前、転移後の領域でのみ測定した。 $k_u(\text{H}_2\text{O})$  と  $k_r(\text{H}_2\text{O})$  の値は式(3)を用いて算出した。50 °Cにおける  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  と  $k_r(\text{H}_2\text{O})$  の値はそれぞれ  $5.0 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 、 $0.78 \text{ s}^{-1}$ であり、また  $m_u$  と  $m_r$  の値はそれぞれ  $2.8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $5.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。Tk-RNase HIIの変性、巻き戻り反応が二状態転移であるならば、水中における平衡定数  $K$  は  $k_u(\text{H}_2\text{O})/k_r(\text{H}_2\text{O})$  で計算することができる。こうして求められる50 °Cでの  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の値は  $44.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。この値は平衡実験から得られた値 ( $43.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) とほぼ一致している。従って、巻き戻り反応の条件下において、安定な中間体が存在しないことを示唆している。さらに様々な温度で速度実験を行い、各温度における  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の値を求め、その温度依存性を調べた。

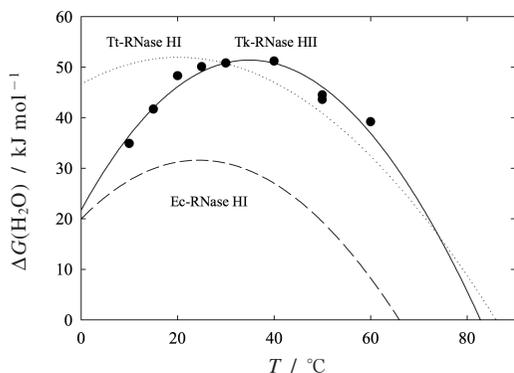
$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の温度依存性を調べるために、10 °Cから60 °Cの温度範囲で、Tk-RNase HIIの変性、巻き戻り反応を測定した。いずれの温度においても、GdnHCl変性は可逆的であり、反応は1相で近似した。上記と同じように、反応の速度定数のGdnHCl濃度依存性から  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  と  $k_r(\text{H}_2\text{O})$  の値を算出し、各温度における  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  を求めた。 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  を温度に対してプロットしたところ、40 °C付近で最大とな



**Fig.3** (a) Kinetic traces of unfolding to a final concentration of (1) 3.4 and (2) 3.9 M GdnHCl. Unfolding curves were fitted to a single exponential. (b) GdnHCl concentration dependence of the apparent rate constants ( $k_{app}$ ) of the unfolding (open circles) and refolding (closed circles) kinetics of Tk-RNase HII at 50 °C. The dotted line represents the fit of Eq.3.<sup>3)</sup>

った (Fig.4)。

では、実際にTk-RNase HIIの熱力学的安定性を生育環境の異なる生物由来の蛋白質と比較すると、どれほどの違いが見られるのだろうか？ RNase Hファミリーの中で、これまでに大腸菌由来RNase HI (Ec-RNase HI) や高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来RNase HI (Tt-RNase HI) の構造安定性やフォールディング機構が詳細に調べられている。<sup>4,5)</sup> Tk-RNase HIIを含むこれら三つの蛋白質の  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の温度依存性は、ほとんどの温度でTk-RNase HII と Tt-RNase HI はともにEc-RNase HI よりも安定であることを示している (Fig.4)。しかしながら、Tk-RNase HIIの変性速度は他の二つの蛋白質よりも著しく小さい。25 °Cにおける水中でのTk-RNase HIIの変性反応の速度定数 ( $6.0 \times 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$ ) はEc-RNase HI ( $1.1 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ , pH 5.5) に比べて  $10^5$  倍程度、Tt-RNase HI ( $4.0 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ , pH 5.5) に比べて  $10^4$  倍程度小さい。一方、巻き戻



**Fig.4** Thermodynamic stability profiles of Tk-RNase HII, Ec-RNase HI, and Tt-RNase HI.<sup>4)</sup> The solid, dashed, and dotted lines represent Tk-RNase HII, Ec-RNase HI, and Tt-RNase HI.<sup>3)</sup>

り速度に関しては、三つの蛋白質間に大きな違いは見られない。つまり、一見同じように安定であると思われる高度好熱菌由来蛋白質と比べても、超好熱菌由来蛋白質の安定化メカニズム、速度論的安定性は異なっていることが今回の研究から明らかとなった。

Tk-RNase HIIと同じように速度論的安定性を有する超好熱菌由来の多量体の蛋白質 (*Pyrococcus furiosus* 由来 pyrrolidone carboxyl peptidase (4量体) や *Thermotoga maritima* 由来 dihydrofolate reductase (2量体) など) が幾つか報告されている。<sup>6,7)</sup> つまり本研究から、高い速度論的安定性が多量体の超好熱菌由来蛋白質だけでなく、単量体としてもその特徴を有していることを示している。一方、これら速度論的安定性を示す超好熱菌由来蛋白質の巻き戻り速度はその中温生物由来のホモログと比べて大きな違いは見られない。速度論的観点から蛋白質の安定性を増加させる方法としては、変性速度を小さくする、もしくは巻き戻り速度を大きくすることが考えられる。超好熱菌由来蛋白質では、巻き戻り速度を大きくするのではなく変性速度を小さくすることが、高温環境への主要な適応戦略なのかもしれない。

### 3. 分子内部の疎水相互作用

蛋白質の安定化機構に関してはこれまで中温生物由来蛋白質を対象として精力的に行われてきた。中でも、疎水相互作用は蛋白質立体構造を安定化する重要な因子のひとつであり、その熱力学的安定性への寄与は詳細に調べられている。<sup>8)</sup> 例えば、Ile から Val への1アミノ酸置換による変異体は、その安定性が2.1 ~ 7.5 kJ mol<sup>-1</sup>減少することが示されている。<sup>9)</sup> さらに分子内部のメチル基は平均約5.3 kJ

**Table 1** Thermodynamic parameters for GdnHCl-induced unfolding of the WT and mutants of Tk-RNaseHII at 50 °C.<sup>11)</sup>

	$C_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G(H_2O)^*$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
WT	1.85	23.6 ± 2.8	
I6A	1.32	22.1 ± 1.1	-12.2
I15A	1.47	18.0 ± 0.8	-8.9
I20A	1.05	24.0 ± 1.5	-18.5
L33A	1.03	20.6 ± 1.1	-19.0
I56A	1.13	22.4 ± 1.8	-16.6
L92A	1.33	25.1 ± 1.2	-12.0
I102A	1.12	24.7 ± 1.6	-16.9
L118A	0.90	24.7 ± 1.5	-22.0
L147A	1.38	25.9 ± 1.2	-10.9

\*  $\Delta\Delta G(H_2O) = m_{av} (C_m(\text{mutant}) - C_m(\text{WT}))$ .  $m_{av} = 23.1$  kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>.

mol<sup>-1</sup>の安定化への寄与があることが報告されている。<sup>10)</sup> しかしながら、これらの結果は常温生物由来蛋白質を対象とした研究によるものであるため、超好熱菌由来蛋白質であるTk-RNase HIIにおいてもこのような関係が成り立つのかどうかはわからない。また、Tk-RNase HIIの高い安定性は極めて小さい変性速度によってもたらされている。幾つかの超好熱菌由来蛋白質においても同様の結果が報告されているが、その詳細な分子機構はまだ明らかにされていない。そこで、我々は分子内部に位置するLeuまたはIleをAlaに変えた1アミノ酸置換変異体を作成し、それらの安定性、および速度論的安定性に対する寄与を調べることにした。<sup>11)</sup> GdnHCl変性による変性曲線を測定し、50 °Cにおける各変異体の $\Delta G(H_2O)$ の値を野生型と比較したところ、8.9 ~ 22.0 kJ mol<sup>-1</sup>減少した (Table 1)。同様の変異による効果が中温生物由来蛋白質において詳細に調べられており、安定性が4.6 ~ 24.3 kJ mol<sup>-1</sup>の範囲で減少することが報告されている。<sup>12)</sup> この安定性の変化の違いは主に変異部位の環境の違いや変異による構造変化などに起因している。さらに、Tk-RNase HIIにおいて、LeuまたはIleのAlaへの変異は平均して15.2 kJ mol<sup>-1</sup>の安定性の減少をもたらした。これはメチル基あたり5.1 kJ mol<sup>-1</sup>の安定化への寄与を示し、以前に報告されている値 (5.3 kJ mol<sup>-1</sup>) に匹敵する値であった。このことは主に多くの中温生物由来の蛋白質において見られる疎水相互作用による安定化が超好熱菌由来の蛋白質であるTk-RNase HIIにおいても成り立ち、その定量的な効果は蛋白質の持つ安定性 (耐熱性) に依存しないことを示している。

また、それぞれの変異体のGdnHCl変性による変性、巻

**Table 2** Thermodynamic parameters for GdnHCl-induced unfolding of the WT and active-site mutants of Tk-RNaseHII at 50 °C.<sup>15)</sup>

	$C_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O})^*$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
WT	1.85	23.6 ± 2.8	
D7A	2.18	18.6 ± 2.2	6.96
E8A	2.39	19.8 ± 1.9	11.1
E8Q	1.97	15.6 ± 1.3	2.48
D105A	2.17	23.7 ± 2.7	6.60
D135A	2.37	20.3 ± 2.2	10.7

\*  $\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = m_{\text{av}} (C_m(\text{mutant}) - C_m(\text{WT}))$ .  $m_{\text{av}} = 20.2$  kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>.

き戻り反応を測定した。その結果、各変異体の変性速度は野生型にくらべて  $10^1 \sim 10^3$  倍程度大きくなっていることがわかった。一方、巻き戻り反応においては、いずれの変異体も野生型に比べてゆっくと巻き戻すが、その速度の差は総じて10倍以下であった。このことは今回の変異による安定性の減少は主に変性速度が大きくなったことに起因していることを示している。つまり、Tk-RNase HIIのきわめて遅い変性速度は分子内部の疎水相互作用によってもたらされていることを意味している。今回の結果は超好熱菌由来蛋白質に見られる速度論的安定化機構に関与する相互作用を明らかにした初めての例である。

#### 4. 機能 — 安定性相関

蛋白質の立体構造はそれを安定化する因子と不安定化する因子のわずかなエネルギーバランスによって維持されていることが知られている。中でも、機能に重要な役割を果たす部位は構造安定性の観点から見れば必ずしも至適でないことが、これまでの中温生物由来の蛋白質の研究で報告されている（蛋白質における「機能と構造安定性の取引 (trade-offs)」）。<sup>13,14)</sup> しかし、このような関係は超好熱菌由来蛋白質のような高い安定性を有している蛋白質においても成り立つのだろうか？

そこでこの疑問に答えるために、Tk-RNase HIIの活性部位を構成するアミノ酸をひとつずつ別のアミノ酸に置換した変異体の熱力学的安定性と酵素活性を調べ、超好熱菌由来蛋白質の構造と機能の関係について検証した。<sup>15)</sup> Tk-RNase HIIの活性部位は Asp7, Glu8, Asp105, Asp135の四つの酸性アミノ酸残基からなり、野生型および活性部位変異体 (D7N, E8A, E8Q, D105A, およびD135A) の酵素活性測定を50 °C, pH 9.0で行った。その結果、D7N, E8A, D105A, そしてD135Aは野生型に比べて活性が著しく低下していた。一方、E8Qの活性は野生型と比べてそ

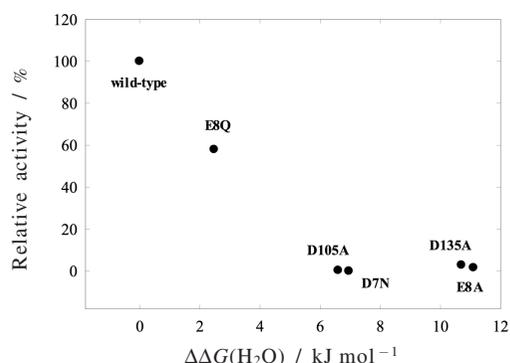


Fig.5 Correlation between the  $\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  values from GdnHCl-induced unfolding and the relative activity.<sup>15)</sup>

れほど大きく減少しなかった。GdnHCl変性による平衡論的安定性に関しては、E8Q変異体を除くすべての活性部位変異体は野生型に比べて7.0 ~ 11.1 kJ mol<sup>-1</sup>安定化していることがわかった (Table 2)。E8Q変異体は2.5 kJ mol<sup>-1</sup>しか安定性の増加がなかった。野生型の酵素活性を100%としたときのそれぞれの活性部位変異体の相対活性の値を、GdnHCl変性から得られた野生型に対する各活性部位変異体の $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ の差 ( $\Delta\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ ) に対してプロットしたところ、顕著な相関が見られ (Fig.5), Tk-RNase HIIの活性部位においても、今回の実験の置換の範囲内では機能と安定性のtrade-offsが成り立つことが示された。つまり本研究結果は、超好熱菌由来蛋白質のように高い安定性を有している蛋白質も機能を獲得するためには安定性を犠牲にしなければならないことを意味している。

一般に酵素活性は高温のほうが高くなることを考えれば、機能と安定性のtrade-offsが超好熱菌由来蛋白質において成り立つ必要はないのかもしれない。今回の結果は、中温生物由来蛋白質と同じように超好熱菌由来蛋白質も機能と安定性のtrade-offsを示すことを実証している。このことは、中温生物由来の蛋白質も超好熱菌由来蛋白質も同様の構築原理によりその立体構造を形成し、進化的に結びついていることを意味していると思われる。

#### 5. 低分子化合物による安定化

生体内には様々な物質が濃厚に存在しており、それらとの相互作用や物理的効果が蛋白質の構造安定性に影響を及ぼしていると考えられている。その中でもスクロースなどの糖、アミノ酸やその誘導体、そしてトリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) などのアミン類のような低分子化合物はosmolyteと呼ばれ、蛋白質の安定化剤として知られてい

る。低分子化合物による安定化は、変性状態の水和効果によると考えられ、osmolyte効果と呼ばれているが、その詳細な機構は明らかにされておらず、特に超好熱菌由来蛋白質のようなすでに高い構造安定性が備わっている蛋白質においてもその効果が適用できるかはわかっていない。超好熱菌も中温生物同様、細胞内においてosmolyteを生産していることが知られている。そこでTk-RNase HIIの安定性に対するosmolyteの効果について調べた。<sup>16)</sup>今回はosmolyteによる安定化の研究においてよく用いられる低分子化合物のひとつであるTMAOを用いた。

TMAOによる安定化を定量的に評価するために、TMAO非存在下、および様々な濃度のTMAO存在下におけるTk-RNase HIIのGdnHCl変性を測定した。測定は50℃、pH 9.0で行い、CDスペクトルの波長220 nmの値を追跡することで調べた。TMAO存在下においてもGdnHClによる変性は高い可逆性を示した。TMAO濃度が増加するにつれて、 $C_m$ の値が増加し、Tk-RNase HIIの安定性が増加することが明らかになった。また、さまざまな濃度のTMAO存在下におけるTk-RNase HIIの熱変性を、CDスペクトルの波長220 nmの値を追跡することで調べた。熱変性の実験条件下では反応が平衡系に達しないので、熱力学的パラメーターは求めることができないが、昇温速度60℃h<sup>-1</sup>、1 M TMAO存在下での見かけの $T_m$ 値は92.5℃にまで上昇し、Tk-RNase HIIはTMAOによって安定化することがわかった。

次に、TMAO存在下での変性、巻き戻り反応の反応速度を測定することで、TMAOによるTk-RNase HIIの安定性の増加について検証した。反応は波長225 nmのCDスペクトルの値を追跡することで調べた。TMAOの有無に関わらず、すべての変性、巻き戻り反応は1相の速度相で近似した。その結果、0.5 M TMAO存在下では、変性速度がより小さく、かつ巻き戻り速度がより大きくなっていることがわかった。見かけの反応速度定数( $k_{app}$ )の対数値をGdnHCl終濃度に対してプロットし、式(3)で近似することで、 $k_u(H_2O)$ と $k_r(H_2O)$ の値を算出した。0.5 M TMAO存在下での $k_u(H_2O)$ の値(1.14 × 10<sup>-8</sup> s<sup>-1</sup>)はTMAO非存在下(8.13 × 10<sup>-8</sup> s<sup>-1</sup>)に比べて、約8倍小さい値であった。また、0.5 M TMAO存在下での $k_r(H_2O)$ の値(2.08 s<sup>-1</sup>)はTMAO非存在下(0.28 s<sup>-1</sup>)に比べて、約7倍大きい値であった。これらの結果は、TMAOがTk-RNase HIIの変性速度、巻き戻り速度に対して同程度に寄与していることを示している。

超好熱菌由来蛋白質はすでに高い構造安定性を有していることを考えると、超好熱菌由来蛋白質がosmolyteで安定化する必要はないのかもしれない。しかしながら、超好熱菌由来蛋白質も中温生物由来蛋白質同様にosmolyteによ

って安定化することが明らかとなった。Osmolyteを利用して安定性を高める戦略は蛋白質の安定性やそれらを産出する宿主の生育環境に関わらず共通であると示唆される。

Bolenらはosmolyteを含まない溶媒からosmolyteを含む溶媒へのアミノ酸の移行エネルギーを求めた実験結果から、osmolyteと蛋白質主鎖との不利な相互作用のために、osmolyteは蛋白質の天然状態、変性状態のコンフォメーションを不安定化するが、主鎖が溶媒に露出している変性状態のほうをより不安定化するために、結果として蛋白質の安定性が増加すると提案している。<sup>17)</sup> Osmolyteが蛋白質の天然状態、変性状態のコンフォメーションをととも不安定化すると仮定した場合、今回の結果は提案されている安定化機構を支持する結果であるといえる。

## 6. まとめ

超好熱菌由来蛋白質の安定化機構の研究は可逆性に乏しいことが多いため、まだ十分に明らかにされていない。我々はTk-RNase HIIが高い可逆性を示す単量体のモデル蛋白質であることを見出し、その安定化機構を調べることで新たな知見の発掘、およびこれまで得られている知見の検証を行った。その結果、Tk-RNase HIIの安定化機構が極めて小さい変性速度によってもたらされていることを明らかにし、分子内部の疎水相互作用が関与していることがわかった。この速度論的な安定化が超好熱菌由来蛋白質に特徴的な性質であると考えられる。一方、機能と安定性の関係や低分子化合物による安定化といった構造特性がTk-RNase HIIにおいても成立することから、これらの特性が安定性(耐熱性)に関わらず全ての蛋白質において共通であり、中温生物由来蛋白質と超好熱菌由来蛋白質が構造構築機構において進化的に結びついていることが明らかとなった。今回の結果が蛋白質の安定化機構のさらなる理解、および産業分野での蛋白質の利用を目指した応用研究に貢献することを期待したい。

## 文 献

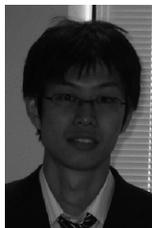
- 1) C. Vieille and G. J. Zeikus, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1 (2001).
- 2) A. Muroya, D. Tsuchiya, M. Ishikawa, M. Haruki, M. Morikawa, S. Kanaya, and K. Morikawa, *Protein Sci.* **10**, 707 (2001).
- 3) A. Mukaiyama, K. Takano, M. Haruki, M. Morikawa, and S. Kanaya, *Biochemistry* **43**, 13859 (2004).
- 4) J. Hollien and S. Marqusee, *Biochemistry* **38**, 3831 (1999).
- 5) J. Hollien and S. Marqusee, *J. Mol. Biol.* **316**, 327 (2002).
- 6) K. Ogasawara, M. Nakamura, S. Nakura, S.

- Tsunasawa, I. Kato, T. Yoshimoto, and K. Yutani, *Biochemistry* **37**, 17537 (1998).
- 7) T. Dams and R. Jaenicke, *Biochemistry* **38**, 9169 (1999).
- 8) K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, *J. Mol. Biol.* **280**, 749 (1998).
- 9) B. W. Matthews, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 139 (1993).
- 10) C. N. Pace, *J. Mol. Biol.* **226**, 29 (1992).
- 11) H. Dong, A. Mukaiyama, T. Tadokoro, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya, *J. Mol. Biol.* **378**, 264 (2008).
- 12) K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, *Protein Eng.* **16**, 5 (2003).
- 13) E. M. Meiering, L. Serrano, and A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **225**, 585 (1992).
- 14) G. I. Yakovlev, V. A. Mitkevich, K. L. Shaw, S. R. Trevino, S. Newsom, C. N. Pace, and A. A. Makarov, *Protein Sci.* **12**, 2367 (2003).
- 15) A. Mukaiyama, M. Haruki, M. Ota, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya, *Biochemistry* **45**, 12673 (2006).
- 16) A. Mukaiyama, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **71**, 110 (2008).
- 17) D. W. Bolen and I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.* **310**, 955 (2001).

でなく、速度論的にも安定化していることが明らかとなった。この速度論的な安定化メカニズムが超好熱菌由来蛋白質に特徴的であることが示唆される。またこの蛋白質の機能に重要な部位は安定性の観点から見れば至適ではないことや、安定性を向上させることが報告されている低分子化合物によってさらに安定化されることがわかった。これらの構造特性は蛋白質の持つ安定性に関係しない普遍的な性質だと考えられる。

## 要 旨

90℃以上の高温環境下で生育する超好熱菌が産出する蛋白質の安定性や変性過程を円二色性スペクトルによる分光学的手法やDSCによる熱測定によって熱力学的に調べた。研究対象に用いた超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来RNase HIIIの安定性はこれまで報告されている常温生物由来の蛋白質に比べて、平衡論的に安定化しているだけ



向山 厚 Atsushi Mukaiyama  
自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Science, TEL. 0564-59-5233, e-mail: atsushi@ims.ac.jp  
研究テーマ：蛋白質の構造物性に関する研究



高野和文 Kazufumi Takano  
大阪大学大学院工学研究科, Graduate School of Engineering, Osaka Univ., TEL.&FAX. 06-6879-4157, e-mail: ktakano@mls.eng.osaka-u.ac.jp  
研究テーマ：生体分子の物性と応用