

解 説

酵素の構造安定性と機能における
キャビティーと水和の役割
—深海微生物由来酵素からの知見—

大前 英司^a, 宮下 由里奈^a, 加藤 千明^b

^a 広島大学 大学院理学研究科

^b 海洋研究開発機構 海洋生物多様性研究分野

(受取日: 2015年10月27日, 受理日: 2015年11月19日)

**Role of Cavity and Hydration on Structural Stability
and Function of Enzymes
- Findings from Deep-Sea Bacterial Enzymes -**

Eiji Ohmae^a, Yurina Miyashita^a, and Chiaki Kato^b

^a Graduate School of Science, Hiroshima University

^b Department of Marine Biodiversity Research, Japan Agency
for Marine-Earth Science and Technology

(Received Oct. 27, 2015; Accepted Nov. 19, 2015)

To elucidate the molecular adaptation mechanisms of enzymes to the high hydrostatic pressure of deep sea, we compared the structure, stability, and function of dihydrofolate reductase (DHFR) from a deep-sea bacterium, *Moritella profunda* (mpDHFR), with those from *Escherichia coli* (ecDHFR). The backbone structure of mpDHFR almost overlapped with that of ecDHFR. However, the structural stability of both DHFRs was quite different: mpDHFR was more thermally stable than ecDHFR but less stable against urea and pressure unfolding. The smaller volume changes due to unfolding suggest that the native structure of mpDHFR involves a smaller amount of cavity and/or an enhanced hydration compared to ecDHFR. The enzymatic activity of the wild-type ecDHFR decreased under high pressure, but mpDHFR showed the maximum activity around 50 MPa, and the D27E mutant of ecDHFR exhibited pressure-activation. The inverted activation volumes of these DHFRs suggest the changes in the cavity and hydration of the transition-state in the rate-determining step of the enzymatic reaction. Since the cavity and hydration depend on the amino acid side chains, DHFR could adapt to the deep-sea environment without altering their backbone structure. The results indicate the importance of cavity and hydration on the molecular adaptation of proteins to the deep-sea environments.

Keywords: cavity and hydration, deep-sea, enzyme, hydrostatic pressure, molecular adaptation.



大前 英司
Eiji Ohmae
E-mail: ohmae@hiroshima-u.ac.jp



宮下 由里奈
Yurina Miyashita
E-mail: miyashita@hiroshima-u.ac.jp



加藤 千明
Chiaki Kato
E-mail: kato_chi@jamstec.go.jp

1. はじめに

圧力は温度と並んで、蛋白質の構造やダイナミクス、蛋白質と蛋白質、あるいは、蛋白質とリガンドとの相互作用に影響を与える重要なパラメーターである。それゆえ、蛋白質に対する圧力の効果は古くから研究されてきた。¹⁻⁶⁾ 近年では、圧力と様々な実験手法が組み合わせられ、蛋白質の安定性や機能、とりわけ、水和とダイナミクスに対する多くの知見が得られるようになってきた。⁶⁻¹²⁾

蛋白質の構造安定性に対する圧力の効果を概観すると、200 MPa 程度までの比較的低い圧力では、オリゴマー蛋白質のサブユニットの解離などが見られ、さらに高い 500 MPa 程度の圧力をかけると、多くの蛋白質がアンフォールドする。^{11,12)} それゆえ、蛋白質の機能に対する圧力の効果を研究するときには、比較的低い圧力が用いられ、蛋白質の構造安定性に対する圧力の効果を研究するときには、より高い圧力が用いられる傾向にある。また、蛋白質の構造安定性や機能は、他の蛋白質やリガンドとの解離・会合、立体構造の変化、化学反応などの、様々な熱力学的現象の組み合わせであるため、蛋白質に対する圧力の効果は、2つの熱力学的パラメーター、すなわち、平衡定数と速度定数に対する圧力の効果として理解することができる。

一方、近年の有人・無人潜水調査船の開発と運用、および、分子生物学的手法の発展は、高圧力下に生息する深海微生物に由来する蛋白質を入手・研究することを可能にした。¹³⁻¹⁵⁾ 深海(ここでは深度 1,000 m 以上の海とする)は、低温・高水圧の極限環境である。深海には太陽光が届かないため、光合成を行う生物は生存できないが、海底から湧き出る熱水や冷水中に含まれる、メタン・硫化水素などをエネルギー源とする、地球の表層とは切り離された、独自の生態系が存在している。深海微生物の細胞が高水圧で押し潰されてしまわないためには、細胞の内外が同じ圧力になっていることが必要である。このため、細胞内で働く蛋白質は必然的に、高圧力下で機能することを要求される。また、これを可能にするためのメカニズムは、蛋白質分子自身に内包されていなければならない。このような深海微生物由来蛋白質の耐圧機構を、分子レベルで解明することは、蛋白質の構造と機能の関係を理解する上で有意義な、新しい知見をもたらすと期待される。本稿では、深海微生物由来酵素の圧力に対する構造安定性と機能を、常圧微生物由来の相同酵素と比較し、酵素の構造安定性と機能に対するキャビティーと水和の役割を検討した結果を紹介する。

2. 深海微生物由来酵素の立体構造

深海微生物 *Moritella profunda* は、西アフリカ沖の深度 2,815 m の大西洋海底で採集された泥の中から単離された細菌で、生育最適圧力が 22 MPa、生育最適温度が 2 °C の好圧・好冷性細菌である。¹⁶⁾ 16S リボゾーマル RNA 遺伝子の塩基配列の比較から、この菌は大腸菌 (*Escherichia coli*) などの常圧微生物と近縁で、同じ *Moritella* 属の常圧性細菌から進化して深海に適応したと考えられる。¹⁷⁾ したがって、この菌由来の酵素は、酵素の高圧力環境適応機構を解明するという研究目的には好適である。

また私たちの研究室では、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をモデル酵素として研究を進めている。DHFR は、NADPH を補酵素として、ジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に還元する反応を触媒する酵素である。生成物の THF は、核酸塩基の合成に必要であるため、DHFR は細胞が分裂・増殖する過程で必須の酵素であり、生物が生育している環境条件下で確実に機能している。また、大腸菌由来 DHFR (ecDHFR) の立体構造や酵素反応機構に関して

は、詳細な研究が為されている。¹⁸⁻²¹⁾ このため DHFR は、酵素の環境適応機構を研究する上で最適なモデル酵素と言える。以上のような理由から私たちは、深海微生物 *M. profunda* 由来 DHFR (mpDHFR) の、構造・安定性および機能を、ecDHFR と比較・検討することによって、酵素の高圧力適応機構を、分子レベルで解明することを目指した。

mpDHFR の一次構造を ecDHFR と比較すると、全長は 3 残基長い 162 残基で、3, 68, 162 残基目に、それぞれ 1 残基の挿入がある。しかしながら、アミノ酸残基の 55 % が両 DHFR で一致しており、立体構造はほぼ同じであると予測された。精製蛋白質の、円二色性 (CD) および蛍光スペクトルの測定結果からも、両 DHFR がよく似た構造を持っていることが推測された。さらに X 線結晶構造解析を行った結果、両者の骨格構造はほとんど一致することが判明した (Fig.1A)。²²⁾ mpDHFR 以外にも私たちは、マリアナ海溝の深度 10,898 m の底泥から分離された深海微生物 *Shewanella benthica*²³⁾ 由来の、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (sbIPMDH) と、同属の常圧菌 *S. oneidensis*²⁴⁾ 由来の同じ酵素 (soIPMDH) の X 線結晶構造解析も行ったが、両者の骨格構造も一致していた (Fig.1B)。²⁵⁾ これらの結果から、酵素の高圧力適応機構は、特徴的な立体構造に由来しているわけではないと考えられる。

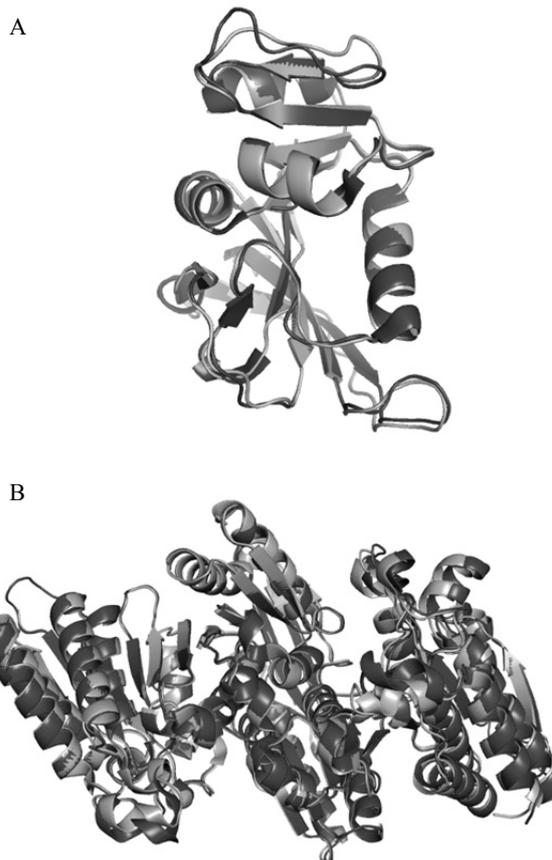


Fig.1 Comparison of crystal structures of deep-sea enzymes and their normal homologues. (A) Dihydrofolate reductase from *Moritella profunda* (PDB ID: 2ZZA, black) and *Escherichia coli* (PDB ID: 1RX2, gray). (B) 3-Isopropylmalate dehydrogenase from *Shewanella benthica* (PDB ID: 3VMK, black) and *Shewanella oneidensis* (PDB ID: 3VMJ, gray). The figure was drawn using PyMol (<http://www.pymol.org/>).

3. 深海微生物由来酵素の構造安定性

両 DHFR の構造安定性を比較するために、まず CD スペクトルで熱安定性を測定したところ、興味深い結果が得られた。ecDHFR は 70 °C 程度の温度で完全に unfold^(注1)したが、mpDHFR は 80 °C の高温下でも unfold しなかったのである (Fig.2A)。²²⁾ 先に述べたように、*M. profunda* は生育最適温度が 2 °C の好冷性細菌であるから、この結果は、好冷性細菌由来の蛋白質が必ずしも好冷性 (熱に対して不安定) とは限らないことを示している。このような異常な熱安定性は、mpDHFR のみに限らず、他の幾つかの深海微生物由来 DHFR でも見られ、深海微生物由来酵素の特徴の一つと考えられる。²⁶⁾ しかしながら、加熱・冷却後に酵素活性を測定したところ、ecDHFR の活性は元に戻ったのに対し、mpDHFR の活性はほとんど回復しなかった。²⁶⁾ このことから、mpDHFR の二次構造は unfold していないが、三次構造は加熱により壊れていると考えられる。

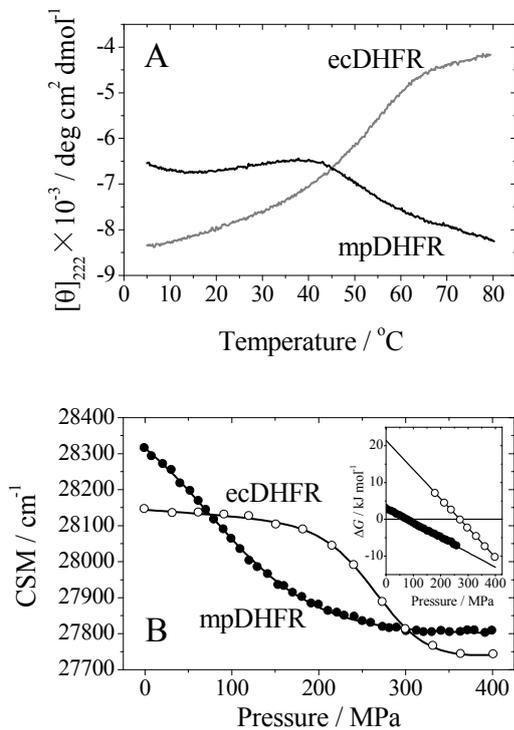


Fig.2 (A) Temperature dependence of the molar ellipticity at 222 nm ($[\theta]_{222}$) of ecDHFR (gray) and mpDHFR (black) at pH 8.0. (B) Pressure dependence of the center of fluorescence spectral mass (CSM) of ecDHFR (open circle) and mpDHFR (filled circle) at 25 °C and pH 8.0. The solvent used was 20 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol. Lines represent theoretical fits to the two-state unfolding model. (Inset) Pressure dependence of the Gibbs free energy change due to unfolding of ecDHFR (open circle) and mpDHFR (filled circle). Lines represent least-squares linear fits.

次に、圧力に対する構造安定性を蛍光スペクトルで測定したところ、予想に反して、mpDHFR よりも ecDHFR の方が圧力に対して安定なことがわかった (Fig.2B)。²²⁾ mpDHFR は 200 MPa 程度の圧力で完全に unfold してしまうが、ecDHFR は 200 MPa 程度までは構造を保持しており、さらに高圧力をかけると徐々に unfold した分子が増加し、350 MPa 以上の圧力では、概ね全ての分子が unfold する。この結果は、深海微生物由来の蛋白質が必ずしも耐圧性が高いとは限らないことと、逆に、常圧微生物由来の蛋白質

でも耐圧性が高いものがあることを明瞭に示しており、たいへん興味深い。二状態転移モデルを用いた以下の式により測定結果を解析し、unfold に伴う体積変化を算出した。

$$CSM_P = \frac{CSM_N + CSM_U \exp\{-(\Delta G^\circ + P\Delta V) / RT\}}{1 + \exp\{-(\Delta G^\circ + P\Delta V) / RT\}} \quad (1)$$

ここで CSM_P は、各圧力下で測定した蛍光スペクトルの重心の波数である。また CSM_N , CSM_U は、それぞれ、Native 状態と Unfold 状態の蛍光スペクトルの重心の波数で、その圧力依存性は直線で近似している。 ΔG° は両状態間の常圧下における Gibbs 自由エネルギー変化を、 ΔV は両状態間の体積変化を示しており、 P , T , R はそれぞれ、圧力、温度、気体定数を表している。解析の結果、Table 1 に示したように、mpDHFR の方が ecDHFR よりも unfold に伴う体積変化 (負数の絶対値) が小さいことがわかった。

Table 1 Partial molar volume changes of ecDHFR and mpDHFR due to pressure- and urea-induced unfolding at 25 °C and pH 8.0.

	Volume change / ml mol ⁻¹	
	Pressure	Urea
ecDHFR	-77 ± 8	-85 ± 7
mpDHFR	-45 ± 3	-53 ± 7

The solvent used was 20 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol.

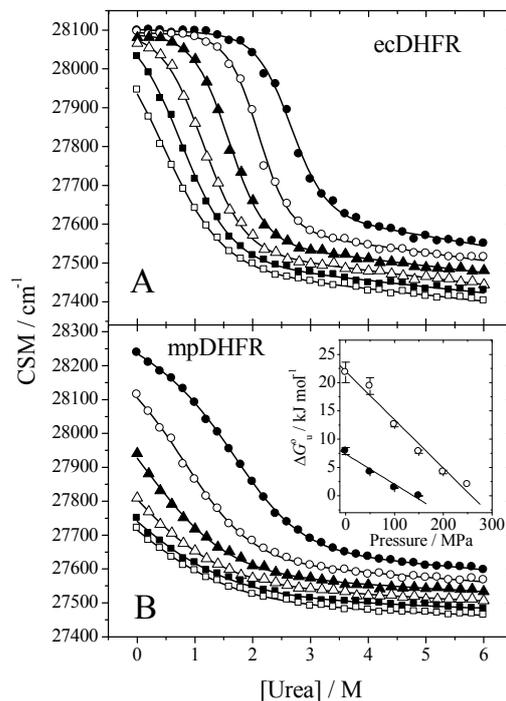


Fig.3 Urea concentration dependence of the center of fluorescence spectral mass (CSM) of ecDHFR (A) and mpDHFR (B) at 25 °C and pH 8.0 under various pressures. The solvent used was 20 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol. Symbols indicate 0.1 (filled circle), 50 (open circle), 100 (filled triangle), 150 (open triangle), 200 (filled square), and 250 (open square) MPa. Lines represent theoretical fits to the two-state unfolding model. (Inset) Pressure dependence of the Gibbs free energy change due to unfolding of ecDHFR (open circle) and mpDHFR (filled circle). Lines represent least-squares linear fits.

さらに、尿素に対する構造安定性を比較した。まず大気圧下で CD と蛍光スペクトルを用いて測定した結果、mpDHFRの方がecDHFRよりも尿素に対して不安定であることがわかった。²²⁾ 二状態転移モデルを用いて解析した結果、どちらのDHFRでも、CDと蛍光の測定結果から得られる熱力学的パラメーターが誤差範囲内で一致した。それゆえ、蛍光を用いて様々な圧力下での尿素に対する安定性を測定し、その結果から unfold に伴う体積変化を算出することにした (Fig.3)。得られた結果から、尿素を用いた unfold でも圧力の場合と同様に、mpDHFRの方がecDHFRよりも unfold に伴う体積変化が小さいことがわかった (Table 1)。

4. 蛋白質の unfold に伴う体積変化

ここで、蛋白質の unfold に伴う体積変化が何に由来するかを示そう。二状態転移モデルでは以下のように、Native 状態 (N 状態) と Unfold 状態 (U 状態) との平衡を仮定する。^{注2)}



ル・シャトリエの原理より、平衡にある系を加圧すると、体積が減少する方向に平衡はシフトする。このとき、圧力は系 (蛋白質溶液) 全体にかけられているため、実際に変化するのは溶液全体の体積であり、(2)の平衡も、溶液全体の体積が減少する方向にシフトする。

溶液全体の体積 V_t は、どちらの状態でも以下の式で表すことができる。

$$V_t = \sum n_i V_i \quad (3)$$

ここで n_i と V_i は、溶液に含まれる i 番目の成分のモル数と部分モル体積である。したがって、溶液全体の体積変化 ΔV_t は、以下の式で表される。

$$\Delta V_t = \sum n_i^U V_i^U - \sum n_i^N V_i^N \quad (4)$$

ここで上付きの N と U はそれぞれ、N 状態と U 状態を表している。高圧セルは密閉系で物質の出入りがない上に、蛋白質の unfold は化学反応を伴っていないため、各成分のモル数 n_i は不変である。したがって式(4)は、以下のように表せる。

$$\Delta V_t = \sum n_i \Delta V_i \quad (5)$$

ここで、 ΔV_i は蛋白質の unfold に伴う各成分の部分モル体積の変化である (Fig.4)。

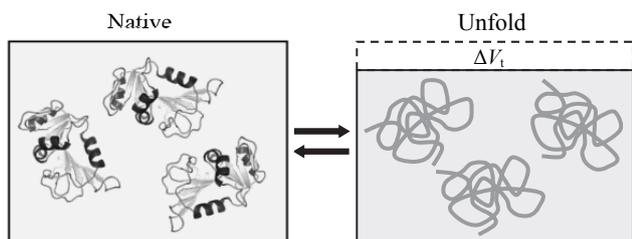


Fig.4 Schematic drawing of volume change due to protein unfolding.

ΔV_i は測定セルの体積に依存した値であり、単位も mL なので、蛋白質 1 mol あたりの体積変化に換算するために、これを溶液に含まれる蛋白質のモル数 n_p で規格化する。この値が実験的に得られる体積変化 ΔV_{obs} である。

$$\Delta V_{obs} = \frac{1}{n_p} \sum n_i \Delta V_i = \Delta V_p + \sum_{i \neq p} \frac{n_i}{n_p} \Delta V_i \quad (6)$$

ここで、 ΔV_p は蛋白質自身の unfold に伴う部分モル体積変化である。各成分と蛋白質のモル数の比 n_i/n_p は、仕込み時

における各成分と蛋白質のモル濃度の比 c_i/c_p に置き換えることができるため、以下の式が得られる。

$$\Delta V_{obs} = \Delta V_p + \sum_{i \neq p} \frac{c_i}{c_p} \Delta V_i \quad (7)$$

式(7)は、実験的に得られる体積変化 ΔV_{obs} には、蛋白質自身の部分モル体積変化のみならず、溶液中に存在する他の成分の部分モル体積変化も含まれていることを、明確に示している。また他の成分からの寄与には、その成分と蛋白質とのモル濃度の比 (c_i/c_p) が、重みとしてかかっていることにも注意が必要である。一般的な実験系における蛋白質のモル濃度は、NMR 実験で数 mM 程度、蛍光や活性測定などの実験では、数 μM ~ 数 nM 程度であるのに対して、他の成分の濃度はこれらより高く、緩衝剤成分や塩などで数十 ~ 数百 mM、水にいたっては 55 M 余りも存在していることに注意が必要である。

ここまでの式の誘導には、いかなる近似も用いていないが、ここで話を簡単にするために、最も単純な系、すなわち、蛋白質と水のみを考慮することにしよう。この場合、式(7)は以下のように簡略化できる。

$$\Delta V_{obs} = \Delta V_p + \frac{c_w}{c_p} \Delta V_w \quad (8)$$

ここで c_w と ΔV_w は、水のモル濃度と、蛋白質の unfold に伴う水の部分モル体積変化である。

蛋白質自身の体積は、蛋白質を構成する原子の体積 V_a と、原子間の空隙 (キャビティ) の体積 V_c とに分けることができる。また水の体積は、蛋白質と相互作用している水 (水和水) の体積 V_h と、蛋白質と相互作用していない水 (バルク水) の体積 V_b とに分けることができる。したがって式(8)は、以下のように表せる。

$$\Delta V_{obs} = \Delta V_a + \Delta V_c + \frac{c_h}{c_p} \Delta V_h + \frac{c_b}{c_p} \Delta V_b \quad (9)$$

ここで ΔV_a 、 ΔV_c 、 ΔV_h 、 ΔV_b は、蛋白質の unfold に伴うそれぞれの成分のモル体積変化、 c_h と c_b は水和水とバルク水のモル濃度である。蛋白質を構成する原子の体積は、蛋白質の構造には依存しないので、 ΔV_a はゼロである。またバルク水の体積も、蛋白質の構造には依存しないので、 ΔV_b もゼロである。したがって、実験的に得られる体積変化 ΔV_{obs} は、以下のようにキャビティと水和水の体積変化のみに帰属される。

$$\Delta V_{obs} = \Delta V_c + \frac{c_h}{c_p} \Delta V_h \quad (10)$$

一見すると、式(10)では ΔV_{obs} が蛋白質濃度 c_p に依存するように見えるが、 c_p が増加すれば c_h も増加し、 c_h/c_p は一定に保たれる。このとき式(9)に戻って考えると、 $c_w (=c_h+c_b)$ が一定なので、 c_b/c_p が減少することになるが、 ΔV_b がゼロなので、 c_b/c_p の値が変化しても ΔV_{obs} は変化しない。したがって、 ΔV_{obs} は蛋白質濃度や実験手法によらず、一定の値になる。^{注3)}

また、式(10)は Kauzmann が示した水中における蛋白質の部分モル体積を表す以下の式²⁷⁾からも、容易に導くことができる。

$$V_p = V_a + V_c + \delta V_h \quad (11)$$

ここで、 δV_h は蛋白質 1 mol あたり (式(10)では水和水 1 mol あたり) の水和水による水の体積変化である。

蛋白質と水以外の成分を含む系に話を戻そう。これらの成分の ΔV_{obs} に対する寄与は、

$$\frac{c_i}{c_p} \Delta V_i \quad (12)$$

で表されるから、蛋白質と比較して成分の濃度が非常に高い (c_i/c_p が大きい) 場合、あるいは、N 状態または U 状態のどちらかにおいて、その成分と蛋白質が特異的に相互作用する (ΔV_i が大きい) 場合には、これらの成分の寄与により ΔV_{obs} が大きく変化することになる。前者が尿素や塩酸グアニジンなどの変性剤や、グリセロールなどの安定化剤を加えた場合に相当し、後者が酵素质質や補因子などのリガンドを加えた場合に相当することは、容易に想像できるだろう。逆に、蛋白質と比較して成分の濃度がそれほど高くなく、しかも、N 状態と U 状態のどちらでも蛋白質との相互作用に差がないような成分 (緩衝剤や還元剤など) に関しては、 ΔV_{obs} に対する寄与を無視することができる。

また、式(7)の両辺に定数として圧力 P を乗じると、以下の式が導出できる。

$$\Delta G_{obs} = \Delta \mu_p + \sum_{i \neq p} \frac{c_i}{c_p} \Delta \mu_i \quad (13)$$

ここで、 ΔG_{obs} は実験的に得られる蛋白質の unfold に伴う Gibbs 自由エネルギー変化、 $\Delta \mu_p$ および $\Delta \mu_i$ は蛋白質および各成分の化学ポテンシャル変化である。式(13)は、実験的に得られる蛋白質の unfold に伴う Gibbs 自由エネルギー変化にも、他の成分からの寄与が含まれていることと、高濃度の変性剤や安定化剤、あるいは低濃度のリガンドの存在により、蛋白質の構造安定性が大きな影響を受けることを明確に示している。なお式(13)は、自由エネルギーと化学ポテンシャルの関係式

$$G = \sum n_i \mu_i \quad (14)$$

から、 ΔV_{obs} と同様にして導くことも可能である。

5. 酵素の構造安定性におけるキャビティーと水和の役割

以上のように、水中における蛋白質の unfold に伴う体積変化は、キャビティーと水和水の体積変化に帰属できる。一般的な蛋白質では、N 状態よりも U 状態のキャビティー体積の方が少ない (ΔV_c が負である) ことから、この差が大きな蛋白質ほど、unfold に伴う体積変化が大きく (ΔV_{obs} が絶対値の大きい負の値になる)。一方、水和はバルク水から水和水への水分子の変化であり、水和水の体積はバルク水よりも小さい (ΔV_h が負である) ことから、unfold に伴う水和水の増加が多い (c_h/c_p が大きい) ほど、体積変化が大きくなる。Table 1 に示したように、mpDHFR の unfold に伴う体積変化が ecDHFR よりも小さいということは、mpDHFR の unfold に伴うキャビティーか水和量 (あるいはその両方) の変化が、ecDHFR よりも小さいことを意味している。両 DHFR の分子量がほぼ同じであることや、尿素による unfold 状態では残存構造がほとんど残らないことを考慮すると、これらの違いは、主として N 状態の違いに由来すると考えられる。すなわち、mpDHFR の N 状態におけるキャビティーが ecDHFR よりも少ないか、水和量が ecDHFR よりも多いと考えられる。

それゆえ、両 DHFR の結晶構造を用いてキャビティーを計算してみたが、あまり明確な差は見られなかった。しかしながら、両 DHFR の比容 (単位重量当たりの体積で、部分モル体積を分子量で除したものと) と断熱圧縮率を実測してみたところ、mpDHFR の方が ecDHFR よりも比容と圧縮率ははるかに小さいことがわかった。mpDHFR の比容は繊維状蛋白質に匹敵するほど小さく、N 状態において広い溶媒露出表面積と、多量の水和水を持っていると考えられる。また、蛋白質の unfold に伴う熱容量の変化 (ΔC_p) は、疎水性側鎖の露出に伴う水和水の増加によるものであるから、N 状態で多量の水和水を持っている mpDHFR では、 ΔC_p が

小さくなり、Gibbs 自由エネルギー変化の温度依存性が小さくなって、熱に対して安定になったと考えられる。以上のことから、N 状態における水和量の違いが、mpDHFR と ecDHFR の構造安定性の違いに大きな影響を与えていると考えられる。

6. 酵素の機能における水和の役割

一方、両 DHFR の酵素活性の圧力依存性を調べたところ、ecDHFR は加圧に伴って活性が低下するのに対して、mpDHFR は約 50 MPa で最大活性を示した (Fig. 5A)。²²⁾ このような加圧による活性の増加は、他のいくつかの深海微生物由来 DHFR でも見られたが、深海微生物由来 DHFR でも、加圧に伴って活性が低下するものもあり、深海微生物由来酵素が必ずしも好圧性を示すわけではない。^{14,15)}

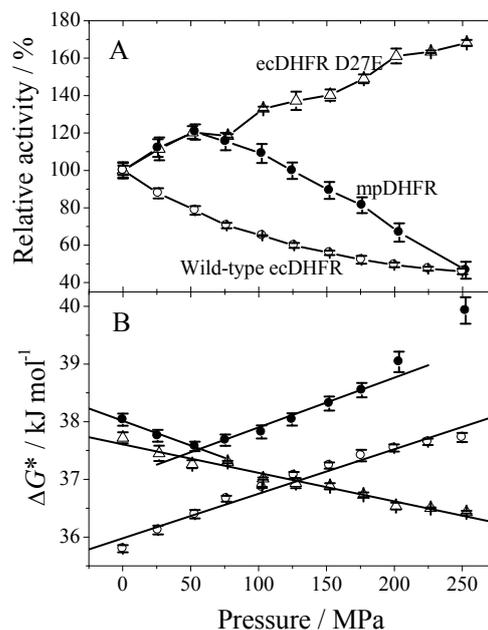


Fig.5 (A) Pressure dependence of relative activities of the wild-type (open circle) and D27E mutant (open triangle) ecDHFR and mpDHFR (filled circle) at 25 °C and pH 7.0. The solvent used was 20 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 250 μM NADPH, and 250 μM DHF. (B) Pressure dependence of the apparent activation free energies of the wild-type (open circle) and D27E mutant (open triangle) ecDHFR and mpDHFR (filled circle). Lines represent least-squares linear fits.

最初に述べたように、酵素反応は多くのステップから成り立っているが、酵素のターンオーバー速度は、これらの内の最も遅いステップ (律速過程) の速度により決定される。圧力はそれぞれのステップに対して独立に寄与するため、常圧下で律速過程になっているステップが、高圧下では高速になり、常圧下では高速なステップが、高圧下では律速過程になることもあり得る。このような場合には、特定の圧力で反応速度の圧力依存性が反転する。^{11,28)} DHFR の場合、補酵素 (NADPH) と基質 (DHF) の結合過程、酸化還元反応過程、2つの生成物 (NADP⁺ と THF) の解離過程の、少なくとも 5つの反応ステップが存在しており、ecDHFR の常圧下での律速過程は THF の解離過程であることが知られている¹⁹⁾ が、mpDHFR では、50 MPa を境に律速過程が変化すると考えられる。

一般に温度一定の条件下では、反応速度定数 k に対する圧力の効果から、以下の式により活性化体積 ΔV^* が算出できる。

$$\Delta V^* = \frac{\partial(-RT \ln k)}{\partial P} \quad (15)$$

酵素反応の場合、基質濃度が十分に高いときには、Michaelis-Menten の式より反応速度 v は以下ようになる。

$$v = k_{cat} [E_t] \quad (16)$$

ここで、 k_{cat} は酵素反応速度定数、 $[E_t]$ は酵素の全濃度である。式(15)、(16)より、基質飽和条件下で、酵素濃度を一定にして酵素反応速度の圧力依存性を測定した場合には、 ΔV^* を以下の式により求めることができる。²⁹⁾

$$\Delta V^* = \frac{\partial(-RT \ln k_{cat})}{\partial P} = \frac{\partial(-RT \ln v)}{\partial P} \quad (17)$$

両 DHFR の酵素反応速度の圧力依存性の結果から ΔV^* を算出したところ (Fig.5B), ecDHFR では $7.5 \pm 0.2 \text{ ml mol}^{-1}$ と正の値であったのに対して、mpDHFR では $0.1 \sim 50 \text{ MPa}$ の範囲で、 $-8.6 \pm 2.5 \text{ ml mol}^{-1}$ と負の値であった (Table 2)。また、mpDHFR の $50 \sim 250 \text{ MPa}$ における ΔV^* は、 $8.6 \pm 0.9 \text{ ml mol}^{-1}$ で、ecDHFR と同程度の値であった。この結果から、mpDHFR の高圧力条件下 (50 MPa 以上) での律速過程は、ecDHFR と同じ (THF の解離) と考えられるが、低圧力条件下 ($0.1 \sim 50 \text{ MPa}$) での律速過程は、これらとは異なっていると考えられる。

Table 2 Activation volume corresponding to enzymatic function of the wild-type and D27E mutant ecDHFRs and mpDHFR at 25 °C and pH 7.0.

DHFR	Activation volume / ml mol ⁻¹
Wild-type ecDHFR	7.5 ± 0.2 (0.1–250 MPa)
ecDHFR D27E	-4.8 ± 0.1 (0.1–250 MPa)
mpDHFR	-8.6 ± 2.5 (0.1–50 MPa) 8.6 ± 0.9 (50–250 MPa)

The solvent used was 20 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 250 μM NADPH and 250 μM DHF. The values in parentheses show the pressure range using for calculation.

遷移状態理論に基づく、 ΔV^* は律速過程における遷移状態と基底状態との間の体積変化を示しており、式(9)で示した unfold の場合と同様に、両状態間のキャビティーと水和量の変化を反映している。酵素反応過程における酵素の構造変化は、unfold のような大きなものではないと考えられるので、これらのキャビティーや水和量の変化は、活性部位やリガンド結合部位周辺の、比較的ローカルな構造変化に伴うものと考えられる。例えば、 $0.1 \sim 50 \text{ MPa}$ における mpDHFR の負の ΔV^* の場合、酸化還元反応過程が律速過程であり、遷移状態では、反応中間体に生じた部分的な電荷が、水和により安定化されているという可能性が考えられる。

一方、ecDHFR や 50 MPa 以上の mpDHFR のような正の ΔV^* の場合、遷移状態は基底状態と比較して、キャビティーの増加か脱水和 (あるいはその両方) が起こっていないなければならない。生成物解離反応の中間体としてよく検討される、結合サイトが開いた構造 (いわゆる open 構造) は、基底状態よりも水和量が増加すると考えられることから、それ以上のキャビティーの増加を伴っているのであれば、正の ΔV^* を伴う反応の遷移状態の構造としては不適切である。正の ΔV^* がどのような構造変化に由来するのかはまだ不明であるが、酵素反応速度が圧力に依存するという事実は、それだけで、その酵素の機能発現にキャビティーや水

和が大きな役割を果たしていることを明確に示している。

7. 常圧微生物由来酵素の改変

Fig.5A に示したように、野生型の ecDHFR は、加圧に伴って活性が低下する圧力感受性酵素である。ecDHFR の活性部位の Asp27 を Glu に置換した変異体 (D27E) では、基質との結合能が低下すると同時に、活性の最適 pH が酸性側にシフトする³⁰⁾ ことから、基質結合部位周辺の溶媒への露出度が増加していると考えられた。そこで、ecDHFR D27E 変異体の酵素活性の圧力依存性を測定したところ、加圧に伴って活性が増加する好圧性酵素になっていた (Fig.5A)。³¹⁾ ecDHFR D27E 変異体の低圧力条件下 ($0.1 \sim 50 \text{ MPa}$) での活性の増加は、mpDHFR とほぼ一致しており、 $0.1 \sim 250 \text{ MPa}$ の範囲から得られた ΔV^* も、 $-4.8 \pm 0.1 \text{ ml mol}^{-1}$ と比較的近い値であった (Table 2)。Asp から Glu への変異は、側鎖にメチレン (CH_2) 1 個を追加するだけであるから、ecDHFR の立体構造はほとんど変化しない。実際、ecDHFR D27E 変異体の結晶構造は既知である (PDB ID: 1DRA) が、野生型とほとんど完全に一致する。これらの結果は、ecDHFR D27E 変異体の酵素反応の律速過程が mpDHFR と同じになったことにより、見かけの活性の圧力依存性が変化したことを示している。Fig.2B に示したように、ecDHFR の Native 構造は 200 MPa 程度まで保持されることから、ecDHFR D27E 変異体は、 $10,000 \text{ m}$ 程度の深海の高圧力環境下でも、十分に機能することができる。

最近私たちは IPMDH に関しても同様の結果を得た。常圧微生物由来の soIPMDH は加圧により活性が低下する圧力感受性酵素であるが、深海微生物由来の sbIPMDH は 100 MPa まで常圧下と同等の活性が保持される耐圧性酵素である。³²⁾ S266A の置換により soIPMDH は、sbIPMDH (266 位は Ala) と同様の耐圧的な酵素活性を示すようになる。³³⁾ Ser から Ala への置換も、側鎖から水酸基 1 個を除去するだけなので、soIPMDH の立体構造はほとんど変化しない。ダイヤモンドアンビルセルを用いて、高圧下で結晶構造解析を行った結果、野生型 soIPMDH の活性部位裏側の溝に位置する Ser266 周辺に、加圧下では 3 分子の水分子が侵入する³⁴⁾ のに対して、S266A 変異体では、加圧しても水分子の侵入が見られないことがわかった。³³⁾ これらの結果は、深海微生物由来酵素が高圧力環境に適応する際に、水との相互作用の制御が重要な役割を果たしていることを示している。

8. おわりに

本稿で示したように、深海微生物由来酵素の立体構造は、常圧微生物由来の相同酵素とほとんど同じであるが、その構造安定性と機能は、大きく異なっている。この違いは、キャビティーと水和量の違いによるものであり、これらはアミノ酸側鎖の種類により大きく変化する。したがって深海微生物由来酵素は、キャビティーと水和量を制御することによって、主鎖の立体構造を変えることなしに、深海の高圧環境に適応しているものと考えられる。また、深海以外の多くの極限環境 (高温、低温、酸性、アルカリ性、高塩濃度など) に生育する生物由来の蛋白質に関しても、その立体構造は、基本的には、マイルドな環境に生育する生物由来の相同蛋白質と同じであることから、蛋白質の極限環境適応機構には、キャビティーや、水和をはじめとする他の成分との分子間相互作用の制御が重要であると考えられる。今後、熱測定データを組み合わせることで、極限環境生物由来蛋白質の環境適応機構を、より詳細に明らかにできるだろう。

注1) 本稿では、蛋白質の特異的な立体構造が失われることを「unfold」と呼び、活性が失われることを示す「変性 (denature)」とは区別している。

注2) 二状態転移モデルは、「状態」を2つと仮定しているだけなので、「構造 (conformation)」が2つである必要はない。平易なアナロジーとして、*n*-ヘキサン気液平衡を取り上げる。気液両相において、ヘキサン分子のとり conformation は多数あるが、状態は気体と液体の2つだけである。ヘプタン、オクタン、... と分子の鎖長を伸ばしていくと、分子のとり得る conformation の数は飛躍的に増加するが、状態の数は変わらない。蛋白質の unfold も同じで、両状態、とりわけ Unfold 状態では、非常に多くの構造 (conformation) をとることができるが、これは状態の数とは関係がない。また Unfold 状態の構造の数は、蛋白質分子の鎖長 (アミノ酸残基数) に依存するが、状態の数は鎖長には依存せず、比較的分子量の小さい典型的な蛋白質では2つである。

上記のヘキサンのアナロジーは、蛋白質の構造と安定性に関して重要なポイントを2点示している。1点目は、「Native 状態の構造も1つとは限らないこと」である。2点目は、「蛋白質の構造安定性は、基本的には、分子内の相互作用ではなく、分子間の相互作用により決定されていること」である。蛋白質の unfold 実験は、通常、蛋白質-蛋白質間の相互作用が無視できるような希薄な溶液で行われるため、蛋白質の構造安定性を決めるような分子間相互作用は、主として蛋白質と水分子の間に存在している。

注3) 式(10)では、加圧により蛋白質の構造が変化するのに、実験的に得られる ΔV_{obs} に蛋白質の構造は寄与しないことになり、奇妙に思われるかもしれない。しかしながら、これはアルキメデスが風呂の中で体を動かしても風呂の湯が溢れなかったのと同じで、溶液中で蛋白質の構造が変わっても、それ自体は溶液の体積を変化させない。

謝 辞

本稿は、月向邦彦教授 (広島大学)、渡邊信久教授 (名古屋大学)、赤坂一之教授 (近畿大学)、北原亮准教授 (立命館大学)、らとの共同研究の成果に基づくものです。各氏に深く謝意を表します。

文 献

- 1) P. W. Hochachka, T. W. Moon, and T. Mustafa, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **26**, 175–195 (1972).
- 2) M. Gross and R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* **221**, 617 (1994).
- 3) V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, and C. Balny, *Proteins* **24**, 81–91 (1996).
- 4) D. B. Northrop, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 71–79 (2002).
- 5) K. Heremans, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 1157–1165 (2005).
- 6) J. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 145–159 (2002).
- 7) R. Lange and C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 80–93 (2002).
- 8) K. Ruan and C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 94–102 (2002).
- 9) Y. Suzuki, G. Sasaki, S. Miyashita, T. Sawada, K. Tamura, and H. Komatsu, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 345–356 (2002).
- 10) E. Paci, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 185–200 (2002).
- 11) M. Groß, G. Auerbach, and R. Jaenicke, *FEBS Lett.* **321**, 256–260 (1993).

- 12) C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 201–209 (2002).
- 13) E. Ohmae, Y. Miyashita, and C. Kato, *Extremophiles* **17**, 701–709 (2013).
- 14) C. Murakami, E. Ohmae, S. Tate, K. Gekko, K. Nakasone, and C. Kato, *J. Biochem.* **147**, 591–599 (2010).
- 15) C. Murakami, E. Ohmae, S. Tate, K. Gekko, K. Nakasone, and C. Kato, *Extremophiles* **15**, 165–175 (2011).
- 16) Y. Xu, Y. Nogi, C. Kato, Z. Liang, H. J. Rüger, D. De Kegel, and N. Glansdorff, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 533–538 (2003).
- 17) C. Kato and Y. Nogi, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 223–230 (2001).
- 18) M. R. Sawaya and J. Kraut, *Biochemistry* **36**, 586–603 (1997).
- 19) C. A. Fierke, K. A. Johnson, and S. J. Benkovic, *Biochemistry* **26**, 4085–4092 (1987).
- 20) D. D. Boehr, D. McElheny, J. H. Dyson, and P. E. Wright *Science* **313**, 1638–1642 (2006).
- 21) Q. Wan, B. C. Bennett, M. A. Wilson, A. Kovalevsky, P. Langan, E. E. Howell, and C. Dealwis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 18225–18230 (2014).
- 22) E. Ohmae, C. Murakami, S. Tate, K. Gekko, K. Hata, K. Akasaka, *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 511–519 (2012).
- 23) C. Kato, L. Li, Y. Nogi, Y. Nakamura, J. Tamaoka, and K. Horikoshi, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1510–1513 (1998).
- 24) K. Venkateswaren, D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K. H. Neelson, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 705–724 (1999).
- 25) T. Nagae, C. Kato, and N. Watanabe, *Acta Crystallogr. F* **68**, 265–268 (2012).
- 26) E. Ohmae, K. Gekko, and C. Kato, *High Pressure Bioscience* (K. Akasaka, H. Matsuki eds.) pp. 423–442, Springer (2015).
- 27) W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **14**, 1–63 (1959).
- 28) P. Masson and C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta* **1724**, 440–450 (2005).
- 29) E. Ohmae, M. Tatsuta, F. Abe, C. Kato, N. Tanaka, S. Kunugi, K. Gekko, K. Gekko, *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1115–1121 (2008).
- 30) C. L. David, E. E. Howell, M. N. Farnum, J. E. Villafranca, S. J. Oatley, and J. Kraut, *Biochemistry* **31**, 9813–9822 (1992).
- 31) E. Ohmae, Y. Miyashita, A. Tate, K. Gekko, S. Kitazawa, R. Kitahara, and K. Kuwajima, *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 2782–2794 (2013).
- 32) Y. Hamajima, N. Nagae, N. Watanabe, Y. Yamada, T. Imai, and C. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 469–471 (2014).
- 33) Y. Hamajima, T. Nagae, N. Watanabe, E. Ohmae, Y. Kato-Yamada, and C. Kato, *Extremophiles* **20**, 177–186 (2016).
- 34) T. Nagae, T. Kawamura, L. M. G. Chaves, K. Niwa, M. Hasegawa, C. Kato, and N. Watanabe, *Acta Crystallogr. D* **68**, 300–309 (2012).