


 解説

酵素の低温適応と分子進化

山岸明彦

(受取日：2005年12月7日，受理日：2006年1月9日)

Cold Adaptation and Molecular Evolution of Enzyme

Akihiko Yamagishi

(Received December 7, 2005; Accepted January 9, 2006)

There are many cold places around the Earth. From the psychrophiles isolated from those environments, cold-adapted enzymes have been isolated. Cold-adapted enzymes have sufficient activity and sufficient substrate-affinity to support the growth, and show low thermo-stability. Artificially cold-adapted enzymes have been obtained by evolutionary engineering from thermophile enzymes. The analysis revealed one of the cold-adaptation mechanisms: the cold-adapted enzymes showed lower enthalpy of substrate-binding thus providing lower activation enthalpy for high activity at low temperature. Some of the cold-adapted enzymes retained high thermal stability of the original thermophile enzyme. The results suggest that it is possible to reconcile high stability with high activity at low temperature. However, the issue needs further investigation. It has been elucidated that life evolved from the hyperthermophilic common ancestor (Commonote). Accordingly, the *in vitro* evolution experiments for obtaining cold-adapted enzymes from thermophile enzyme are, in a sense, reproducing the evolution of life.

1. 天然の低温適応酵素

自然界には、南極や北極、高山やシベリアの永久凍土など年間を通して温度の低い場所が存在する。また、海の大部分は5℃以下の低温である。こうした環境から低温に適応した菌が採集されている。こうした菌は低温菌と呼ばれている。低温菌といっても様々であり、どの程度の低温で生育すれば低温菌と呼ぶかは研究者によって異なる。しかし、一般に最適生育温度（その菌が最も早く生育する温度）が20℃以下であるような菌は低温菌と呼ばれている。¹⁾

低温では常温菌の生育は大きく抑えられる。その最大の理由は酵素活性が大幅に低下することにある。酵素反応速度はアレニウスの法則に従い、温度の低下に従って指数関数的にその活性を低下させる。従って、常温にすむ微生物

は低温では酵素活性を失って生育できなくなる。もう一つの理由として低温では細胞膜の流動性も減少することがある。膜の流動性の減少によって膜タンパク質の活性が低下する。これに適応するために、低温菌は膜脂質組成を変化させている。こうした点に関しては他の文献²⁾を参考にされたい。本稿では低温適応酵素に関してのみ取り扱うことにする。

低温適応酵素に関しては総説が多数報告されている。³⁻⁶⁾ これまで知られている低温適応酵素を常温酵素や好熱酵素と比較すると、その特徴は以下の3点となる。³⁾ ① 活性の最適温度が低いこと。② 低温（0～30℃）において反応速度定数 (k_{cat}) あるいは酵素の総合活性 (k_{cat}/K_m) が高い事。③ 多くの場合、常温付近で安定性が低いことである。こうした低温適応酵素の具体例や工業利用に関しては文献5

にまとめられている。

酵素反応の速度定数 k_{cat} は酵素の由来（もともとその酵素を持っていた生物種）によって大きくかわり、酵素の速度定数を直接比較することは難しい。しかし、一般に好熱菌、常温菌、低温菌を比較すると、それぞれの生育温度付近で適当な（十分な）反応速度を持つ。しかし、低温適応酵素は至適温度においても常温菌酵素に比べて速度定数が低いこともある。これは低温で酵素活性はそれほど必要でないことに起因するのかもしれない。また、酵素と基質との親和性を反映するミカエリス定数（ K_m ）を比較すると K_m にも温度依存性があり、それぞれの生物の生育温度付近で K_m が同程度になることも知られている。

異なった生物種由来（好熱菌、常温菌、低温菌）の天然の酵素を比較すると、耐熱性はその生育温度に依存する。低温酵素では耐熱性が低下しており、これに起因して活性の至適温度も低下している。これまで、いくつかの酵素に関して好熱菌、常温菌、低温菌の構造を比較する研究が行われた。これらの研究から、低温菌酵素は好熱菌酵素と反対の特徴を持っていることが明らかとなった。^{3,6)} すなわち、疎水性残基が少なく親水性残基が多い。水素結合、芳香基相互作用、塩橋が少ない。サブユニット間の疎水性相互作用が小さいという特徴である。これらの理由により天然状態が不安定化している。また、変性状態のエントロピーを増加させることにより、天然状態から変性状態への変化を促進してタンパク質を不安定化する傾向もみられる。すなわち低温適応酵素では、変性状態でのエントロピーを減少させるプロリン残基が少なく、反対にエントロピーを増加させるグリシン残基が多い。同様に、ループやアミノ末端、カルボキシ末端が長い傾向にある。こうした傾向は、タンパク質を不安定化させる特徴である。^{3,4,6)} タンパク質耐熱性に関しては他の文献^{7,8)}を参照されたい。

直観的に耐熱性はタンパク質の堅さと関連するのではないかと推定される。タンパク質の堅さあるいは残基のゆらぎの測定は難しくその例は多くない。しかし、好熱菌と常温菌の酵素のH/D交換でのゆらぎの測定が行われた。この方法では、アミド基の水素が¹Hから²H（Dあるいは重水素）に交換されるとその振動定数が変化することを赤外吸収（あるいはNMR）で測定する。好熱菌と常温菌の酵素のH/D交換を測定すると、予想通り、耐熱性に依存してタンパク質のゆらぎが大きく変わることが明らかとなった。すなわち、好熱菌由来タンパク質ではH/D交換の速度が遅いものに対して、常温菌由来タンパク質ではH/D交換速度が速くなっていた。⁹⁾あるいは、タンパク質内にあるトリプトファン残基が蛍光を発するが、その蛍光に対して低分子化合物がどの程度影響を与えるかの測定によってもタンパク質の「柔らかさ」が測定された。これも、低温適応酵素にお

いて低分子が内部に浸透しやすく、「柔らかい」という結果が得られた。¹⁰⁾

また、これまで酵素が反応する場合に基質結合部位を覆うループが動くこと、結合サイトを挟むドメインの相互配置が変動して基質を挟み込む事など、タンパク質の動きが伴うことが良く知られている。そこで、酵素の耐熱性が高いと酵素反応性が低くなるのでは無いかと考えられている。この考え方は直感的にわかりやすい。活性と酵素の動きが関連することは無理がない。しかし、酵素反応部位の動きと酵素の耐熱性にどれだけの関連があるのかは、きちんと確かめられているわけではない。⁶⁾この点に関しては後にもう少し議論したい。

2. 低温酵素の進化工学的耐熱化

いずれにせよ、こうした天然の酵素の比較には限界がある。すなわち、異なった生物種の酵素を比較した場合、それらのアミノ酸配列は一般に大きく異なってしまう。従って、酵素の性質の違いを配列の違いで説明することは一般に困難である。また、配列の変異もそれぞれの生育環境への適応によって変化した変異と、適応に無関係にランダムに蓄積した種系統分化に起因するアミノ酸変異が混在している。それらを分離して考察する事は一般に難しい。こうした点を乗り越える研究方法としては、変異型酵素を作成してそれらを比較する方法がある。これまでに、人工的に低温適応した変異型酵素がいくつか報告されている。¹¹⁻¹⁶⁾われわれも、進化分子工学的手法によって低温適応した酵素の作成に成功している。¹⁷⁻²⁰⁾

進化分子工学に関してはこれまでもいくつかの解説が出版されているのでそれらを参照されたい。^{8,21)}進化分子工学は定向進化、分子育種あるいは単に進化工学とも呼ばれている。進化分子工学は改変対象とするタンパク質にランダムに変異を入れて作成したライブラリーの中から、目的とする性質を持つタンパク質を選び出すという手法である。立体構造の情報は必要なく、予め目的の性質を獲得するための理論がわかっている必要もない。われわれはこの方法を用いて低温適応酵素の単離とその酵素特性の解析を行なった。^{17,18,22)}

用いた酵素は3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素という酵素である。この酵素はロイシン合成系に関与しており、*leuB* 遺伝子にコードされている。そこで、*leuB* 遺伝子が欠損した大腸菌を用いて、その細胞中で好熱菌の*leuB* 遺伝子を発現させると、低温では酵素の十分な活性が出ないために大腸菌はロイシンを合成することができない。従って、この菌は低温ではロイシンを含まない培地上で生育できない。ついで、好熱菌の*leuB* 遺伝子にランダムに変異を導入して、ランダム変異を持つ好熱菌*leuB* 遺伝子のプールを作

Table 1 Kinetic parameters of enzymatic reaction of cold-adapted mutant, *T. thermophilus* wild-type, and *E. coli* wild-type IPMDHs.¹⁸⁾

Enzyme	K_m IPM / μ M		K_m NAD / μ M		k_{cat} / s^{-1}		k_{cat}/K_m / $s^{-1} \mu$ M ⁻¹	
	30 °C	60 °C	30 °C	60 °C	30 °C	60 °C	30 °C	60 °C
<i>T. th</i> WT	0.9 (1.00)	2.6 (1.00)	9.2 (1.00)	134.2 (1.00)	0.7 (1.00)	25.5 (1.00)	0.076 (1.00)	0.190 (1.00)
Gly12Ser	0.3 (0.33)	1.5 (0.58)	4.5 (0.49)	82.2 (0.61)	0.9 (1.29)	20.5 (0.80)	0.200 (2.63)	0.249 (1.31)
Lys21Thr	1.7 (1.89)	3.8 (1.46)	7.8 (0.85)	111.4 (0.83)	1.0 (1.43)	19.9 (0.78)	0.128 (1.68)	0.179 (0.94)
Arg85Cys	2.5 (2.78)	4.4 (1.69)	93.7 (10.18)	454.1 (3.38)	4.8 (6.86)	36.4 (1.43)	0.051 (0.67)	0.080 (0.42)
Ser248Thr	0.6 (0.67)	3.4 (1.31)	230.8 (25.09)	990.5 (7.38)	4.0 (5.71)	33.1 (1.30)	0.017 (0.23)	0.033 (0.18)
Ala335Val	0.4 (0.44)	0.8 (0.31)	3.9 (0.42)	60.5 (0.45)	0.8 (1.14)	14.0 (0.55)	0.205 (2.70)	0.231 (1.22)
<i>E. coli</i> WT	2.7 (3.00)	9.1 (3.50)	117.4 (12.76)	864.1 (6.44)	39.8 (56.86)	203.9 (8.00)	0.339 (4.46)	0.236 (1.24)

Relative values with respect to those of *T. thermophilus* wild-type IPMDH are indicated in parentheses.

Each mutant is indicated by the original residue, position of the residue and the resulting residue in each cold-adapted mutant.

T. th WT: Wild type IPMDH of *Thermus thermophilus*.

E. coli WT: Wild type IPMDH of *Escherichia coli*.

K_m : Michaelis constant.

k_{cat} : Activity coefficient.

成する。これはランダム変異ライブラリーと呼ばれる。この好熱菌 *leuB* 遺伝子のライブラリーで大腸菌を形質転換した後、低温でロイシンを含まない培地上で生育させた。もし、*leuB* 遺伝子に入っている変異によって低温での酵素活性が上昇すると、その *leuB* 遺伝子をもつ大腸菌はロイシン合成ができるようになり、低温でもロイシン無しの培地で生育できるようになる。こうして、低温でも生育できるようになった大腸菌を選び出すことによって、低温適応した酵素をコードする *leuB* 遺伝子を選び出した。^{17,18)}

我々は、こうした実験を行う材料として、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の *leuB* 遺伝子を用いた。この遺伝子を材料として、進化分子工学的手法で低温適応酵素の単離を行った。高度好熱菌 *T. thermophilus* は 70 °C で最も良く生育し (至適生育温度 70 °C という)、50 °C から 80 °C で生育可能な好熱菌の一種である。この好熱菌の *leuB* 遺伝子が大腸菌内で発現させると、大腸菌は 42 °C では生育できるが、低温での酵素活性が低いために 30 °C では生育できない。好熱菌 *leuB* 遺伝子のランダム変異ライブラリーを作成して、選択を行い、30 °C でも生育可能な大腸菌を十数株単離した。^{17,18)} 30 °C では通常の微生物の考えでは常温であり低温とはいわないのがふつうであるが、好熱菌にとっては十分に低温であるといえる。また、こうして単離した変異酵素は、さらに低い温度でも活性を上昇していることが明らかとなった。そこで、ここではこうして単離した酵素も低温適応酵素と呼ぶことにする。

Table 1 にはこれまで我々が解析した低温適応変異酵素の酵素反応特性の一例を示した。変異酵素はそのアミノ酸変異によって表記してある。たとえば、Val126Met は、126

番目のバリン残基をメチオニンに変換した酵素であることを表している。まず、好熱菌酵素 (*T.th*WT) の反応速度定数 (k_{cat}) を大腸菌酵素と比較すると、好熱菌酵素は高温では高い値を示し、その値は大腸菌の 30 °C での値とほぼ同じであることがわかる。また、基質 (IPM) や補酵素 (NAD) との親和性を反映するミカエリス定数 (K_m) を比較した場合も同様に、60 °C での好熱菌酵素の値が大腸菌酵素の 30 °C の値に近い事がわかる。好熱菌酵素にランダムに変異を導入した中から選択された酵素は実際に好熱菌野生型酵素よりも低温に適応している事が明らかとなった。しかもそれらの多くはいずれも、たった一カ所のアミノ酸残基の変異によって低温に適応していた。

低温適応酵素を詳細に見ると、それらは 2 種類に分類することができた。^{17,18)} すなわち、30 °C で酵素反応速度定数 (k_{cat}) の増加している変異酵素 (k_{cat} 増加型: Arg85Cys, Ser248Thr) と、酵素反応速度定数にはあまり変化が見られないが基質および補酵素との親和性が低下して酵素反応の総合的指標である k_{cat}/K_m が増加している変異酵素 (K_m 減少型: Gly12Ser, Lis21Thr, Ala335Val) の 2 種類である。 k_{cat} 増加型では同時に K_m の増加が起きていることも注目される特徴であった。

それでは、これらの低温適応変異酵素はどのような機構で低温適応したのであろうか? その一端を明らかにするために、低温適応変異酵素の活性の温度依存性を測定した (**Fig.1**)。^{17,18)} まず、野生型の好熱菌酵素と野生型の大腸菌酵素を比較すると、 k_{cat} の温度依存性が好熱菌酵素のほうが大きい。低温適応酵素の活性の温度依存性を見ると、 k_{cat} 増加型の低温適応酵素において k_{cat} の温度依存性が低下してい

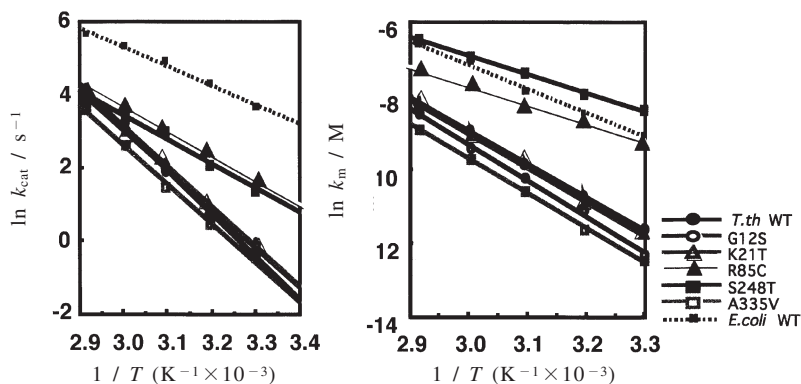


Fig.1 Arrhenius plots and van't Hoff Plots of cold adapted and wild type IPMDHs.¹⁸⁾ Marks are indicated in the figure. Each mutant corresponds each of the followings: Gly12Ser, Lys21Thr, Arg85Cys, Ser248Thr, Ala335Val.

Table 2 Thermodynamic parameters of enzymatic reaction of cold-adapted mutant, *T. thermophilus* wild-type, and *E. coli* wild-type IPMDHs (30 °C).¹⁸⁾

Enzyme	ΔG_m	$\Delta\Delta G_m$	ΔH_m	$\Delta\Delta H_m$	$T\Delta S_m$	$T\Delta\Delta S_m$	ΔG^\ddagger	$\Delta\Delta G^\ddagger$	ΔH^\ddagger	$\Delta\Delta H^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	$T\Delta\Delta S^\ddagger$
	kJ mol ⁻¹											
<i>T. th</i> WT	-29.2	0	-74.9	0	-45.6	0	75.2	0	94.8	0	19.5	0
Gly12Ser	-31.0	-1.8	-81.1	-6.2	-50.2	-4.6	74.6	-0.6	86.4	-8.4	11.7	-7.8
Lys21Thr	-29.6	-0.4	-77.5	-2.6	-47.6	-2.0	74.4	-0.8	88.0	-6.8	13.4	-6.1
Arg85Cys	-23.4	5.8	-42.7	32.2	-19.4	26.2	70.3	-4.9	50.7	-44.1	-19.5	-39.0
Ser248Thr	-21.1	8.1	-42.1	32.8	-20.4	25.2	70.8	-4.4	52.8	-42.0	-17.9	-37.4
Ala335Val	-31.4	-2.2	-78.0	-3.1	-46.5	-0.9	75.4	0.2	86.5	-8.3	10.7	-8.8
<i>E. coli</i> WT	-22.8	6.4	-54.6	20.3	-31.7	13.9	65.0	-10.2	43.6	-51.2	-21.3	-40.8

ΔG_m : Gibbs energy change between NAD⁺-bound state and initial state.

ΔH_m : Enthalpy change between NAD⁺-bound state and initial state.

$T\Delta S_m$: Change in entropic terms between NAD⁺-bound state and initial state.

ΔG^\ddagger : Gibbs energy change between activation state and NAD⁺-bound state.

ΔH^\ddagger : Enthalpy change between activation state and NAD⁺-bound state.

$T\Delta S^\ddagger$: Change in entropic terms between activation state and NAD⁺-bound state.

Term with $\Delta\Delta$ indicates the difference between those of each mutant IPMDH and of *T. thermophilus* wild type IPMDH.

ることが明らかとなった。同時に K_m の温度依存性も顕著に低下していた。 k_{cat} の温度依存性の低下は反応に関わる活性化エンタルピー変化の減少を、 K_m の温度依存性の低下は補酵素と酵素の結合状態形成に関わるエンタルピー変化の絶対値の減少を反映している。この酵素は反応に基質と補酵素が関与しているが、低温適応には補酵素の結合が大きく影響していた。そこで以下の議論ではもっぱら補酵素の結合と反応速度定数に関して議論する。しかし、こうした議論はおそらく基質結合に関してもあてはまると予想される。

上述の k_{cat} および K_m の温度依存性の解析から、補酵素(NAD⁺)結合に関するギブズエネルギー変化とエンタルピー変化、また補酵素結合から反応の活性化状態への活性化

ギブズエネルギー変化と活性化エンタルピー変化を算出して**Table 2**にまとめた。まず、低温適応酵素の特徴を見ると、 k_{cat} 増加型の低温適応酵素と K_m 減少型の低温適応酵素で反応に関するエネルギー状態変化の特徴が異なっていた。そして、 k_{cat} 増加型の低温適応酵素では補酵素と酵素の結合に関わるギブズエネルギー変化 ΔG_m の絶対値が減少し、それに伴って活性化ギブズエネルギー変化 ΔG^\ddagger も大きく減少していた。さらに、その変化をもたらす要因はエンタルピー変化にあった。すなわち、低温適応酵素では補酵素と酵素の結合に関わるエンタルピー変化 ΔH_m の絶対値が減少し、それに伴って活性化エンタルピー変化 ΔH^\ddagger が大きく減少していた。 k_{cat} 増加型の低温適応酵素では活性化エンタルピー

変化が減少して温度依存性が低くなっているため、低温での活性があまり低下しない。この事によって低温でも高い反応速度を維持していた。そして、反応のエンタルピー変化の減少は、補酵素結合に関わるエンタルピー変化が減少したことによっている。すなわち、低温適応酵素は補酵素結合を弱くすることによって活性化エンタルピー変化を減少させ、それによって低温に適応していることになる。こうした反応のダイアグラムを Fig.2 に示した。

こうした低温適応変異酵素の特性を耐熱性の好熱菌酵素

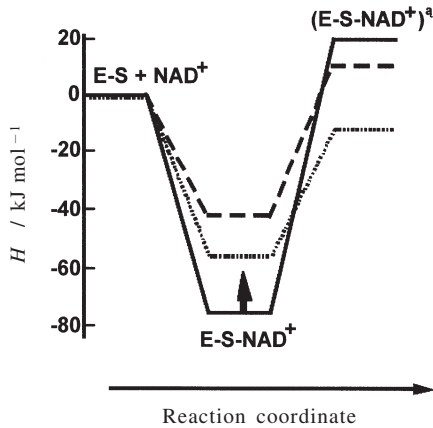


Fig.2 Enthalpy profiles of k_{cat} -improved mutant (Broken line) and wild type (*T. thermophilus*: solid line, and *E. coli*: dotted line) IPMDH.¹⁸⁾ Left, middle and right positions represent enzyme-substrate complex with free NAD^+ , enzyme-substrate- NAD^+ complex and activation state of the ternary complex, respectively.

と比較すると次のように考えることが出来る。すなわち、好熱菌酵素では高温で反応するので活性化エンタルピー変化が大きいことは問題にならない。一方高温では結合エンタルピー変化が少ないと十分な補酵素結合が得られず、細胞内の補酵素濃度では十分な反応速度が得られない。そこで、活性化エンタルピー変化が増大するという負の要素を甘受して結合エンタルピー変化を充分にとり結合の安定性を確保している。反対に、低温では少ない結合エンタルピー変化でも充分安定な補酵素結合を確保できる。そこで、低温適応変異酵素では結合エンタルピー変化を減少させることによって、活性化エンタルピー変化を減少させて低温での反応効率を上昇させている。

以上の議論では、補酵素結合前に対する活性化状態のエネルギー差が変化しないことを前提にして議論を行った。この事は必ずしも自明ではない。(ここで、以降の議論では補酵素と酵素が結合する前の状態に対する状態変化の大きさを便宜的に、単に高さで表記する。) 活性化状態のギブズエネルギーの高さは k_{cat}/K_m で表される反応全体の効率を反映する。したがって、仮に補酵素結合状態のギブズエネルギーの高さの上昇が起きたとしても、活性化状態のギブズエネルギーの高さが上昇したならば反応効率はむしろ低下してしまう。しかし、進化的選択の場合には反応効率の低下したものは選択されない。結果的に活性化状態はあまり変化せず、活性化エンタルピー変化が減少して低温での反応速度の増加した変異酵素のみが選択されたものと推定される。^{17,18)}

ついで、低温での結合エンタルピー変化の減少と活性化エンタルピー変化の減少をもたらした分子的機構を明らかにするために、 k_{cat} 低温適応変異型酵素の一つ Val126Met の変異を詳細に解析した。²⁰⁾ まず、この変異部位のアミノ

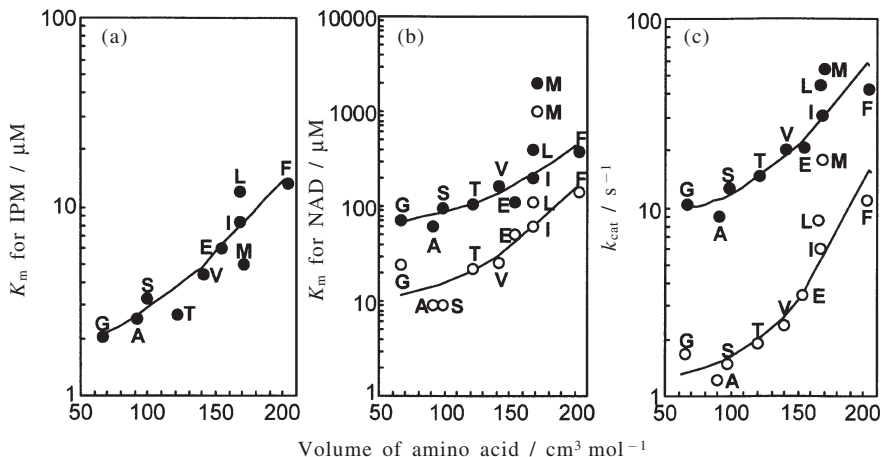


Fig.3 K_m and k_{cat} of mutants at Met126 of IPMDH from *T. thermophilus*.²⁰⁾

酸を、もとの野生型 Val と低温適応変異型 Met の他の 8 種のアミノ酸残基に置換した変異型酵素を作製した。アミノ酸残基を変えることによって、 k_{cat} と K_m は変化した (Fig.3)。進化的低温適応で得られた Val126Met の変異以外にも低温での k_{cat} が野生型より増加する変異もあったが、その中でも Val126Met の活性が最も高かった。この座位のアミノ酸残基の特性と低温での酵素活性を比較したところ、 k_{cat} あるいは K_m をアミノ酸残基の体積の関数として図示したときに良く曲線上にのることが分かった。そして、この座位のアミノ酸体積が大きくなるに従って k_{cat} と K_m が増加することが分かった。さらに、これらの変異酵素の活性の温度依存性からギブズエネルギー変化やエンタルピー変化を見積もった。すると k_{cat} と K_m の変化は、補酵素結合のエンタルピー変化 ΔH_m の減少に伴い、活性化ギブズエネルギー変化 ΔG^\ddagger が減少することによりもたらされていることが明らかとなった (Table 3)。²⁰⁾

この酵素の活性化状態 (反応の律速段階) は生成物の酵素からの脱離過程であることが反応速度論解析から推定されている。これは、分子形状の変化を考慮しなければ、補酵素結合の逆の過程と考える事が出来る。とりわけ、補酵素である NAD⁺ はその酸化型と還元型で分子形状はほとんど変わらない。従って、補酵素結合の親和性を低下させることが、生成物の分離過程を促進する方向に作用し、低温での活性上昇をもたらせたと解釈することができる。²⁰⁾

さて、こうした低温適応酵素の耐熱性を調べたところ、その内のいくつかは野生型好熱菌 IPMDH の持つ高い耐熱性を保持していた。^{17,18)} 前項で述べた様に、天然の低温適応酵素では低温での活性が常温菌酵素に比べて高いが耐熱

性は低い。低温での活性と、ゆらぎ (柔らかさ)、耐熱性の三つの要素が関連づけて考えられている。しかし、耐熱性を保ちつつ低温活性を上昇させることができるという我々の実験結果は、高い耐熱性と高い低温活性が少なくとも部分的に両立しうることを示している。しかし、まだ二つの可能性の結論がでたわけではない。すなわち天然の低温適

Table 3 Gibbs energy changes for mutants at Met126 of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *T. thermophilus*.²⁰⁾

Residue	ΔG_m	ΔG^\ddagger	ΔG_1^\ddagger
	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹
Gly	27.5	74.9	47.3
Ala	28.6	75.8	47.3
Ser	27.2	74.5	47.3
Thr	28.0	74.9	46.9
Glu	25.0	72.9	47.7
Val (wild)	27.5	72.9	46.9
Ile	25.2	72.0	46.9
Lue	23.7	71.2	47.3
Phe	23.7	71.2	47.3
Arg	29.5	76.2	46.9
Met	18.0	69.5	51.5

ΔG_m : Gibbs energy change between NAD⁺-bound state and initial state.

ΔG^\ddagger : Gibbs energy change between activation state and NAD⁺-bound state.

ΔG_1^\ddagger : Gibbs energy change between activation state and initial state.

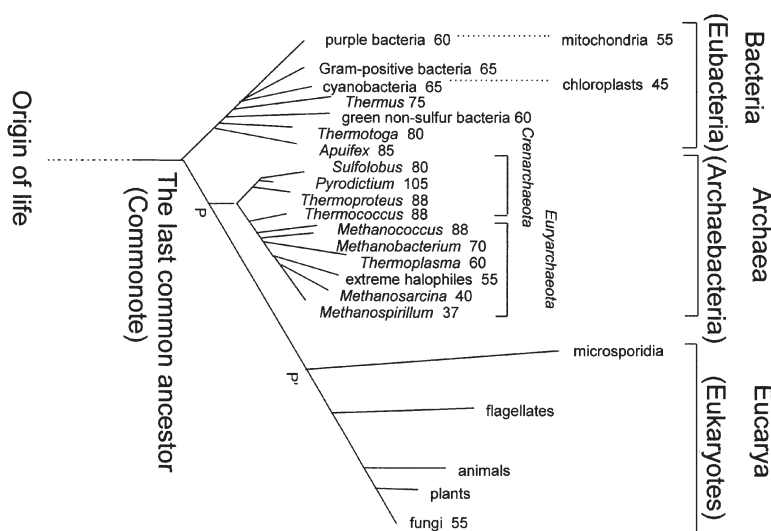


Fig.4 General phylogenetic tree of life constructed by Woese *et al.*²³⁾ Optimum growth temperature of each organism is indicated after each species name.²⁴⁾

応酵素の低い耐熱性が低温での高活性を得るための必然なのか,あるいは低温では耐熱性を維持する必然性(選択圧)がないためなのか,結論はでない。⁶⁾

3. 生物の進化の方向としての低温適応

さてこれまで,まず天然の低温適応酵素に関して解説し,次いで人工的に低温適応させた酵素に関して解説してきた。それではこうした酵素の変化は実際の生物進化とどのような関係にあるのだろうか。最後に,酵素の低温適応と生物進化に関してふれたい。結論からいうと,生物は高温から低温に適応してきたということがわかってきた。そして上述の低温適応実験は,実際の生物がたどってきた低温適応過程を実験室内で再現したものと考えることができる。

ここで,これまでの議論と全く異なる点に一時話題を移す。それは全生物の進化である。**Fig.4**に示したのは,リボソームRNA遺伝子の配列をもとに作成された全生物の進化系統樹である。^{24,25)} 生命の起源で誕生した生物は,全生物の共通の祖先(Commonote)から二つに別れる。その一方は現在の細菌(Bacteria)の仲間となった。もう一方は更に二つにわかれ,古細菌(Archaea)と真核生物(Eukarya)となった。古細菌はメタンを生成するメタン菌や温泉にすむ好熱菌の仲間である。真核生物は動物,植物,カビの仲間である。この図のそれぞれの枝の端が現在のそれぞれの生物種に対応する。生物種名の後に書いてある数字はそれぞれの生物種の生育温度である。この系統樹の根本付近には,80℃以上の高温にすむ超好熱菌が多いことがわかる。このことから,全生物の共通の祖先は超好熱菌ではないかという仮説が提案されていた。もし,この仮説が正しければ祖先型の生物は高い耐熱性をもつタンパク質を持っていたはずである。そこで我々は,この仮説を確かめる実験を行った。^{26,27)}

実験材料として低温適応の実験でも用いた3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素をもちいた。まず,現存する生物が

もつこの酵素の遺伝子配列から系統樹を作成した。ついで系統樹作成法に準じた解析から,全生物の共通の祖先が持っていたアミノ酸配列を推定した。そのアミノ酸配列を現存する超好熱菌の持つ酵素の配列と比較すると超好熱菌の配列は祖先型のアミノ酸配列とよく似ていた。しかし,共通の祖先と現存する超好熱菌酵素で異なった配列も見られた。そこで,超好熱菌酵素に共通の祖先が持っていたアミノ酸配列を変異導入する実験を行った。すなわち,超好熱菌3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素遺伝子に祖先型のアミノ酸残基を変異として導入し,祖先型変異酵素を七つ作成した。それらの遺伝子を大腸菌内で発現し,精製した祖先型変異酵素の耐熱性を測定したのが**Fig.5**である。この図はタンパク質の2次構造含量を222 nmのCDで測定している。タンパク質の二次構造は温度をあげていくと次第に失われていく。材料として用いた酵素は超好熱菌由来の酵素なので耐熱性が非常に高く,96℃でやっとその二次構造の半分が失われる。祖先型アミノ酸を導入した酵素七つのうち五つは,もとの野生型超好熱菌酵素よりも高い耐熱性を示した。すなわち,全生物の共通の祖先が持っていた酵素は現在の超好熱菌酵素よりもさらに耐熱であったことが分かった。^{26,27)}

同様の実験を他の二つの酵素に関しても行った。^{28,29)} そして,同様に祖先型のアミノ酸残基を現存する超好熱菌酵素に導入すると,耐熱性が増加する傾向が確認された。これらの結果から,全生物の共通の祖先は現存する超好熱菌よりも更に高温に生育していたと推定された。全生物の共通の祖先がなぜ超好熱菌だったのか,生命の起源もまた高温であったのか等これに関する議論は他の総説を参照されたい。^{25,27)} いずれにしても,この結果は超好熱菌の耐熱酵素が生物進化の過程で低温に適応してきたことを示している。従って一つ前の節で紹介した低温適応進化実験は,それを実験室内で再現したものと考えることができる。

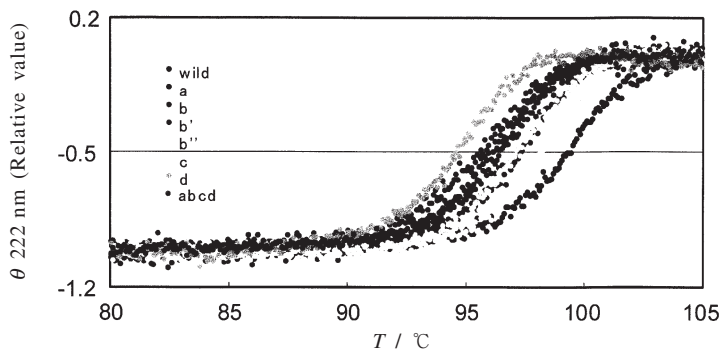


Fig.5 Thermal stability of ancestral mutant IPMDHs of hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. Denaturation of protein is monitored by CD at 222 nm.²⁶⁾ Approximation curves are for the mutant d, b', wild-type, mutant abcd, c, b, b'' and a from left to right.

文 献

- 1) 荒木 忠, 「極限環境微生物ハンドブック」, サイエンスフォーラム, p.149 (1991).
- 2) 荒木 忠, 「極限環境微生物ハンドブック」, サイエンスフォーラム, p.163 (1991).
- 3) N. J. Russell, *Extremophiles* **4**, 83 (2000).
- 4) G. Gianese, P. Argos, and S. Pascarella, *Protein Eng.* **14**, 141 (2001).
- 5) R. Cavicchioli, K. S. Siddiqui, D. Andrews, and K. R. Sowers, *Curr. Opin. Biotech.* **13**, 253 (2002).
- 6) A. Hoyoux, V. Blaise, T. Collins, S. D'Amico, E. Gratia, A. L. Huston, J.-C. Marx, G. Sonan, Y. Zeng, G. Feller, and C. Gerday, *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 317 (2004).
- 7) 油谷克英, 中村春木, 「蛋白質工学」, 朝倉書店 (1991).
- 8) 山岸明彦, 「タンパク質工学—生命科学系分野のための—」, 加藤昭夫編著, 医学出版, p.89 (2003).
- 9) A. Svingor, J. Kardos, I. Hajdu, A. Nemeth, and P. Zavodszky, *J. Biol. Chem.* **276**, 28121 (2001).
- 10) D. Georgette, B. Damien, V. Blaise, E. Depieeux, V. N. Uversky, C. Gerday, and G. Feller, *J. Biol. Chem.* **278**, 37015 (2003).
- 11) S. Taguchi, A. Ozaki, and H. Momose, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 492 (1998).
- 12) P. L. Wintrode, K. Miyazaki, and F. H. Arnold, *J. Biol. Chem.* **275**, 31635 (2000).
- 13) A. Merz, M. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W. P. C. Stemmer, C. Yanofsky, and K. Kirschner, *Biochemistry* **39**, 880 (2000).
- 14) K. Miyazaki, P. L. Wintrode, R. A. Grayling, D. N. Rubingh, and F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **297**, 1015 (2000).
- 15) M. Roovers, R. Sanches, C. Legrain, and N. Glansdorff, *J. Bacteriol.* **183**, 1101 (2001).
- 16) A. Loenn, M. Gardonyi, W. Can Zyl, B. Hahn-Haegerdal, and R. C. Otero, *Eur. J. Biochem.* **269**, 157 (2002).
- 17) T. Suzuki, M. Yasugi, F. Arisaka, A. Yamagishi, and T. Oshima, *Protein Eng.* **14**, 85 (2001).
- 18) M. Yasugi, M. Amino, T. Suzuki, T. Oshima, and A. Yamagishi, *J. Biochem.* **129**, 477 (2001).
- 19) M. Yasugi, T. Suzuki, A. Yamagishi, and T. Oshima, *Protein Eng.* **14**, 601 (2001).
- 20) T. Suzuki, M. Yasugi, F. Arisaka, T. Oshima, and A. Yamagishi, *Protein Eng.* **15**, 471 (2002).
- 21) 山岸明彦, 「Series ニューバイオフィジクス II 第9巻 生体ナノマシンの分子設計」, 共立出版, p.70 (2001).
- 22) 山岸明彦, 化学と生物 **38**, 118 (2000).
- 23) C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4576 (1990).
- 24) A. Yamagishi, T. Kon, G. Takahashi, and T. Oshima, In "Thermophiles: The key to molecular evolution and the origin of life?" J. Wiegel, and M. Adams Eds. p.287, Taylor & Francis Ltd., London (1998).
- 25) 山岸明彦, 「シリーズ進化学 第3巻 化学進化・細胞進化」, 石川 統編, 岩波書店, p.9 (2004).
- 26) J. Miyazaki, S. Nakaya, T. Suzuki, M. Tamakoshi, T. Oshima, and A. Yamagishi, *J. Biochem.* **129**, (2001).
- 27) 山岸明彦, 地学雑誌 **112**, 197 (2003).
- 28) H. Iwabata, K. Watanabe, T. Ohkuri, S. Yokobori, and A. Yamagishi, *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 393 (2005).
- 29) K. Watanabe, T. Ohkuri, S. Yokobori, and A. Yamagishi, *J. Mol. Biol.* **355**, 664 (2006).

要 旨

自然界には低温の場所が多く、そこに生息する低温菌から低温適応酵素が得られている。低温適応酵素は低温で十分な活性と十分な基質結合能を持ち、耐熱性が低いという特徴を持っている。酵素の低温適応機構を研究するために、好熱菌酵素を材料として低温適応酵素を進化工学的に作成する実験を行った。得られた低温適応酵素は基質（補酵素）結合エンタルピー変化と活性化エンタルピー変化が共に減少していた。それによって低温での高酵素活性を実現していた。低温適応酵素の中には高い耐熱性を保持したまま低温での活性が上昇したものがあつた。この実験結果は、耐熱性と低温での高活性が両立するというを示す結果である。しかし、これがどの程度一般性を持つかという点については今後の研究が必要である。全生物の進化の過程で超好熱菌から低温への適応が起きたことが明らかになりつつある。従って、好熱菌酵素を基にした進化工学的低温適応実験は、生物の進化を再現する実験といえる。

山岸明彦 Akihiko Yamagishi
 東京薬科大学生命科学部, Faculty of Life Science, Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Science. TEL. 0426-76-7139, FAX. 0426-76-7145, e-mail: yamagish@LS.toyaku.ac.jp
 研究テーマ：好熱菌の進化生化学
 趣味：The Lord of the Rings