

タンパク質の耐熱化法としては、常温生物由来タンパク質と好熱菌由来の相同タンパク質との配列の比較、立体構造をもとにした理論的設計、ランダムミュートーション、そして好熱菌を宿主とした進化的手法などがある。本研究では、タンパク質耐熱化の一般則を導くため、ロイシン生合成系のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) をモデルタンパク質に選び、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* および常温菌である *Bacillus subtilis* 由来の同酵素の耐熱化を *T. thermophilus* を宿主とした進化工学的手法により行った。この2つの IPMDH のうち *T. thermophilus* の酵素はX線結晶構造解析により立体構造が決定されており、345残基の同一サブユニットからなるホモダイマーであることが明らかになっている。また、各サブユニットは2つの構造ドメインに分けられ、活性部位はドメイン間の溝に存在することが示されている。

キメラ酵素 2T2M6T は *T. thermophilus* IPMDH の配列の一部を *B. subtilis* IPMDH の配列に組み換えた融合タンパク質であり、*T. thermophilus* IPMDH に比べて20℃ 耐熱性が劣化している。このキメラ酵素の遺伝子を染色体中に持つ *T. thermophilus* は、キメラ酵素の耐熱性が低いため生育に IPMDH 活性を必要とする培養条件(すなわちロイシンの存在しない条件)では70℃ までしか生育できない(野生株は80℃ まで生育可)。この組み換え株を76℃ で培養したところ、本来非生育温度であるはずのこの温度でも生育可能となった耐熱化株がいくつか得られた。これらの耐熱化株の遺伝子解析を行ったところ、キメラ酵素の *T. thermophilus* 由来配列中の Ala172 から Val もしくは Leu へのアミノ酸置換が見つかった。この結果に基づいて *T. thermophilus* 野生型 IPMDH の Ala172 をより疎水性の高いアミノ酸である Val、Ile、Leu、Phe に置換したところ、いずれの場合も野生型酵素に比べ耐熱性の上昇が見られた。また、これらの変異型酵素の構造解析から、Val に置換した場合には変異部位周辺に見られた小さな cavity が埋まることによって耐熱性が改善され、Leu あるいは Phe に置換した場合には2つのドメイン間の溝にある活性部位を閉じるようなコンホメーションの変化が起り、これによりドメイン間の相互作用が強化され、また分子全体がコンパクトになることで耐熱化したと推測された。

T. thermophilus IPMDH の Ala172 周辺には、多くの疎水性残基に加えて2つの塩基性残基 (Lys172、His300) が存在する。そこで、172 位に酸性残基である Asp、Glu と中性の極性アミノ酸である Asn、Gln を導入したところ、Glu、Asn、Gln に置換した酵素で耐熱性の上昇が見られた。構造解析からは、これらの極性残基の側鎖のメチレン基は疎水コアを埋め、末端の極性基は周辺の残基と静電相互作用を形成することが示された。

次に、キメラ酵素に代わる非耐熱性 IPMDH として、*T. thermophilus* IPMDH の C 末端数残基を欠損させた変異酵素を作製した。この C 末端欠損型酵素は野生型酵素に比べ大きく耐熱性が劣化しており、この変異酵素の遺伝子が染色体中に組み込まれた *T. thermophilus* 組み換え株は、ロイシン非存在下では65℃ では生育するが75℃ では生育できない。この組み換え株を75℃ で培養したところ3つの独立した耐熱化株が得られたが、これらの株にはポイントミュートーションはなく、かわりに IPMDH 遺伝子の3'末端領域に6、12、21塩基の重複が起こっていた。その結果、C 末端配列がそれぞれ2、4、7残基伸長することで耐熱性が回復したことが明らかになった。

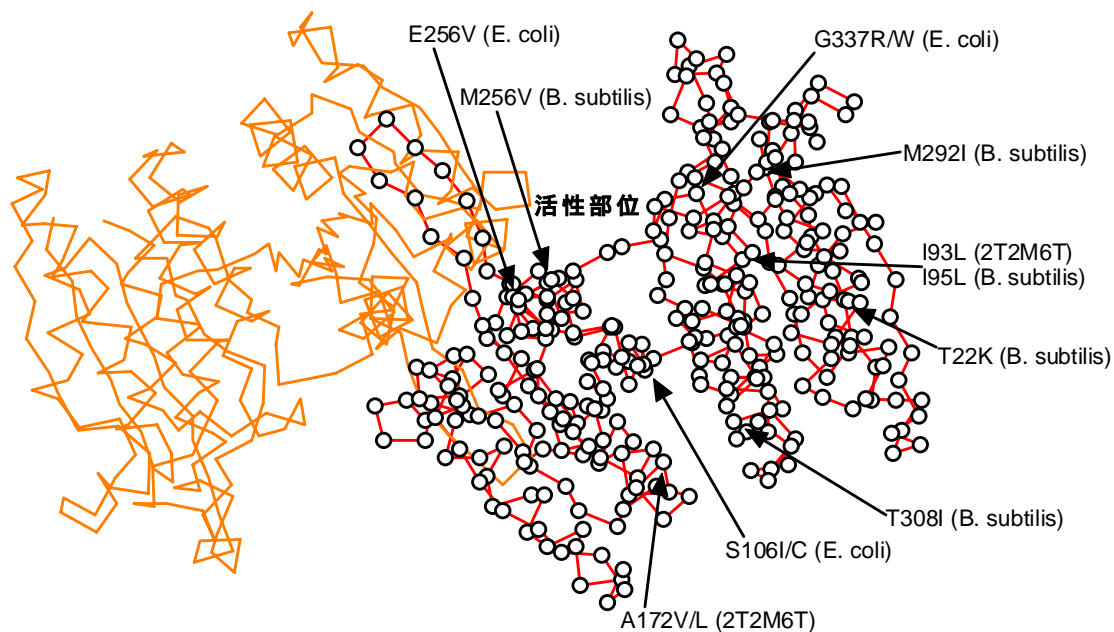


図 1. *T. thermophilus* IPMDH のダイマー構造。一方のサブユニットの残基のみ白丸で示している。キメラ 2T2M6T, *B. subtilis*, *E. coli* 由来 IPMDH の進化的耐熱化で見つかった変異部位に相当する残基を矢印で示している。

常温菌由来タンパク質の進化分子工学的耐熱化のモデル実験として、*B. subtilis* IPMDH の耐熱化を行った。*B. subtilis* IPMDH の遺伝子が染色体中に組み込まれた *T. thermophilus* はロイシン非存在下では 56 °C までしか生育できない。この組み換え株を非生育温度である 61 °C で培養を続けたところ、この温度で生育が可能となった変異株が得られた。同様にして、これを 66、70、73 °C と順次高温で選択していったところ、最終的に 73 °C まで生育が可能となった株が得られた。これらの耐熱化株の遺伝子解析を行ったところ、61 °C では Thr308 Ile が、66 °C で Ile95 Leu、70 °C で Met292 Ile が起こっており、73 °C では Thr22 Lys もしくは Met256 Val のどちらかが起こっていた。これらのアミノ酸置換は独立に *B. subtilis* IPMDH の耐熱性の上昇に寄与するが、その効果は加算的であり、同時に 5 つすべてのアミノ酸置換を含む 5 重置換酵素は野生型酵素に比べ、10 分間のインキュベーションにより活性の 50% が不可逆的に失活する熱処理温度が 13 °C 上昇し、60 °C における一次変性速度は 72 倍遅くなっていた。

また、この 5 重置換酵素のサブユニット間相互作用に関与していると思われる Glu253 を *T. thermophilus* 型より疎水性の高い Leu に置換した 6 重置換酵素を部位特異的変異法により作製したが、この変異酵素の耐熱性はさらに上昇していた。また、この 6 重置換酵素のターン構造を形成している残基である Glu112-Ser-Leu-Ser115 を *T. thermophilus* 型の Pro-Gly-Leu-Glu に置換した 9 重置換酵素もやはり耐熱性の上昇が見られ、活性の 50% が不可逆的に失活する熱処理温度は野生型酵素と比べて 22 °C 上昇し、70 °C における一次変性速度は 900 倍遅くなっていた。

表 1. 進化分子工学によって得られた IPMDH の耐熱化変異部位の立体構造上の位置

分子表面	M292I (Bs), G337W·G337R (Ec)
分子内コア	I93L (2T2M6T), I95L (Bs), T22K (Bs)
ドメイン接触面	S106I·S106C (Ec), A172V·A172L (2T2M6T), T308I (Bs)
サブユニット接触面	M256V (Bs), E256V (Ec)

() 内はそのアミノ酸置換が見いだされた IPMDH の由来生物種を示している。Bs, *B. subtilis*, Ec, *E. coli*, 2T2M6T, キメラ酵素 2T2M6T

本研究ではキメラ酵素と *B. subtilis* IPMDH を *T. thermophilus* を宿主とした進化工学的手法により耐熱化したが、大腸菌 IPMDH の進化工学的耐熱化も行われている。そこで、耐熱化変異が立体構造上どのような部位で起こったのかを明らかにするため、この 3 つの IPMDH の耐熱化実験で見いだされた耐熱化に寄与するアミノ酸置換を *T. thermophilus* IPMDH の結晶構造上にマッピングした (図 1)。その結果、表 1 に示すように分子表面の置換は比較的少なく、逆に分子内部、特にドメイン間やサブユニット間といった構造ユニット間の接触面でのアミノ酸置換が多く起こっていることが示された。このように、IPMDH の耐熱化にはドメイン間やサブユニット間の相互作用、とくに疎水性相互作用を強化することが有効であることが示唆された。