

## 好熱菌のタンパク質はなぜ熱に強いのか

赤沼哲史, 山岸明彦

高温環境で生育している好熱菌のタンパク質は高い耐熱性を持つ。好熱菌タンパク質は、高温において平衡論的、速度論的、あるいはその両方で安定化している。熱力学的には、常温菌タンパク質と比べて安定性の温度関数を末広がりにする、最も安定な温度を高温側に移動する、すべての温度域において安定化するという3通りのいずれか、あるいはその組み合わせで高い耐熱性を持つ。高い耐熱性の分子機構としては、二次構造の安定化、疎水性相互作用の強化、イオン結合ネットワークの構築、オリゴマー化、サブユニット間相互作用の強化等による天然状態の安定化、あるいは、ループの短鎖化等による変性状態のエントロピー的な不安定化が提唱されている。また、構造の固さと耐熱性には必ずしも直接的な関連性があるとは言い切れない。結論としては、好熱菌タンパク質は、様々な耐熱機構を組み合わせで高い耐熱性を獲得している。

## 1. はじめに

生物は地球上の至る所に生育している。陸上や海底の熱水地帯、あるいは堆肥内部など、非常に高温の場所に好熱菌は生育している。好熱菌はなぜ高温環境で生育できるのだろうか？タンパク質は生物の生命活動に特に重要な役割を果たしている。タンパク質、特に生育に必須であるタンパク質の変性温度は、生物の生育温度の上限と密接に関わっている<sup>1)</sup>。異なる至適生育温度を持つ生物種に由来する相同タンパク質の安定性は、多くの場合、生育温度付近で同じ程度になる<sup>2)</sup>。すなわち、種々の塩や糖類、分子シャペロンの関与はあるが<sup>3)</sup>、基本的にはタンパク質の耐熱性が生物の生育上限温度を決めている。

好熱菌タンパク質の多くは、高い耐熱性とともにもその他の耐性も有する。たとえばタンパク質分解酵素に対する耐性、タンパク質を変性させるような条件（酸、アルカリ、

変性剤等）に対する耐性も高い。よって、好熱菌タンパク質は工業利用上からも魅力的である。好熱菌タンパク質の耐熱機構を理解することで、非耐熱酵素を自由に耐熱化できるようになるかもしれない。本稿では、これまでの多くの研究を踏まえて、好熱菌タンパク質の耐熱機構について紹介する。

## 2. 平衡論的な安定性

好熱菌タンパク質に関する文献には、好熱菌のタンパク質は熱安定性が高いと記述されている。しかし、この「安定性」という言葉は、しばしば異なった意味で使われる。そこで、最初にタンパク質の「安定性」の指標として頻繁に使われる「平衡論的な安定性」について述べる。

タンパク質は、どの温度でも図1に示すような天然状態(N)と変性状態(U)をとっている。天然状態はタンパク質が触媒活性等の機能を発揮する状態であり、固有の立体構造を持っている。変性状態では、ポリペプチド鎖は特定の構造をとらずランダムコイル状態となっている。タンパク質の天然状態の安定性は、天然状態と変性状態との間のギブスエネルギーの差として考えることができる。これをタンパク質の「平衡論的な安定性」といい、ここでは $\Delta G_{NU}$ と表記する。 $\Delta G_{NU}$ は通常分子と同じように、(1)式に示すエンタルピー項とエントロピー項の差で表せる。

東京薬科大学生命科学部 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

Why are thermophilic proteins thermally stable?

Satoshi Akanuma, Akihiko Yamagishi (Department of Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)

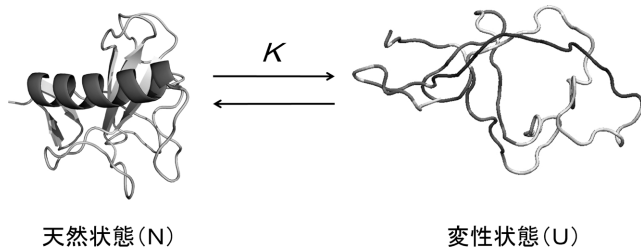


図1 タンパク質の平衡論的安定性

可逆的な変性を示すタンパク質は、天然状態(N)と変性状態(U)との平衡で存在する。平衡定数  $K$  から変性の自由エネルギー変化  $\Delta G_{\text{NU}}$  を求めることができる。

$$\Delta G_{\text{NU}} = \Delta H_{\text{NU}} - T\Delta S_{\text{NU}} \quad (1)$$

タンパク質の天然状態においては、水素結合や疎水性相互作用がエンタルピー項を介して安定化している。逆に、エントロピーは変性状態の方が大きいので、エントロピー項は変性を進める方向に働く。タンパク質の天然構造は、天然構造を安定化する力と、タンパク質を変性させようとする力のバランスのもとに保たれている。

タンパク質の平衡論的な安定性の指標  $\Delta G_{\text{NU}}$  は、図1に示す2状態モデルが成り立つ場合にのみ決定できる。2状態モデルとは、天然状態と変性状態だけが存在し、天然状態から変性状態への変性は可逆的であるというモデルである。

### 3. 平衡論的な安定性の温度依存性

常温生物由来タンパク質は常温付近で最も安定である。高温では  $\Delta G_{\text{NU}}$  が低下し、 $\Delta G_{\text{NU}}$  が0となる温度 ( $T_m$  と表される) で天然状態と変性状態の2つの濃度が等しくなる(図2)。  $T_m$  以上の温度では変性状態が多くなる。好熱菌タンパク質の特徴は、 $T_m$  が常温生物由来タンパク質よりも高いことである<sup>4)</sup>。では、好熱菌タンパク質は熱力学的にはどのようにして高い  $T_m$  を獲得しているのだろうか? 図2は  $\Delta G_{\text{NU}}$  の温度関数(安定性曲線と呼ぶ)を模式的に示している。タンパク質の  $T_m$  を高くするには、安定性曲線を末広がりにする(モデル1)、右に平行移動させる(モデル2)、あるいは、全体的に上にシフトする(モデル3)という3通りが考えられる<sup>5)</sup>。

例えば高度好熱菌 *Thermus thermophilus* と常温菌である大腸菌由来3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)の比較から、好熱菌IPMDHの高い  $T_m$  はモデル1によることが示された<sup>6)</sup>。一方、常温菌(アーキア)と超好熱菌由来ヒストンタンパク質の比較では、超好熱菌タンパク質は安定性曲線を垂直方向へ平行移動させていた(モデル3)<sup>7)</sup>。その他にも、三つのモデルのうちの二つの組み合わせ、あるいは三つすべての組み合わせで高い  $T_m$  を持つ好熱菌タンパク質も知られている<sup>4)</sup>。好熱菌タンパク質においてはモデル1、あるいはモデル1と3の組み合わせに

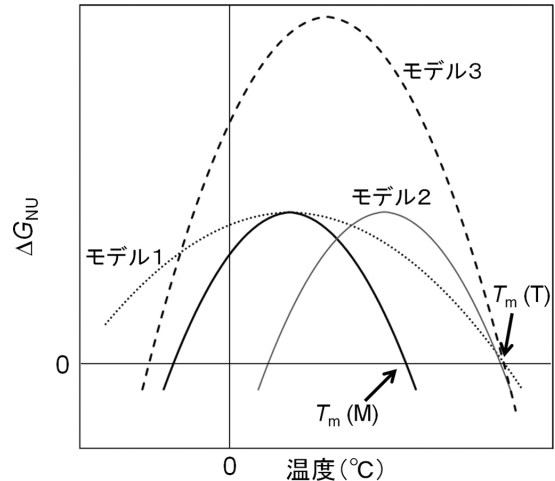


図2  $\Delta G_{\text{NU}}$  の温度関数の模式図

太線が常温生物由来タンパク質の安定性曲線である。この曲線が、末広がりになる(モデル1)、高温側へ平行移動する(モデル2)、あるいは、垂直方向へ平行移動する(モデル3)ことにより、タンパク質の変性温度 ( $T_m$ ) が高温方向へシフトする。 $T_m(M)$  と  $T_m(T)$  はそれぞれ常温生物由来タンパク質と好熱菌由来タンパク質の  $T_m$  を指す。

よって高い  $T_m$  を示す場合が多く、より耐熱性の高い超好熱菌タンパク質では、モデル3あるいはモデル2と3の組み合わせによって  $T_m$  を高めている例が多い<sup>8)</sup>。さらに、好熱菌タンパク質がどのモデルによって高い  $T_m$  を持つようになったかは、そのタンパク質の進化の歴史に依存するという議論もある<sup>9)</sup>。

### 4. 速度論的な安定性

ここまで議論してきたタンパク質の平衡論的な安定性は、天然状態と変性状態とが可逆的な平衡にある場合に限り成立する議論である。しかし、多くのタンパク質の熱変性は不可逆的である。これは、変性したタンパク質が凝集しやすいことに起因する。このような場合、不可逆的な変性速度の温度依存性によってタンパク質の耐熱性を議論することになる。不可逆変性の最も簡単なモデルは(2)式のように表される。



ここで、NとUはそれぞれ天然状態と変性状態、Xは不可逆的な変性状態であり、 $k_i$  はUからXへの速度である。不可逆変性において、 $\text{N} \rightarrow \text{X}$  の変性速度  $k_{\text{obs}}$  と、半分の分子が変性するのに要する時間  $t_{1/2}$  は、それぞれ以下の式で表せる<sup>3)</sup>。

$$k_{\text{obs}} = (k_u \cdot k_i) / (k_f + k_i) \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{obs}} \quad (4)$$

不可逆変性は一定温度に保温したときの変性速度で解析

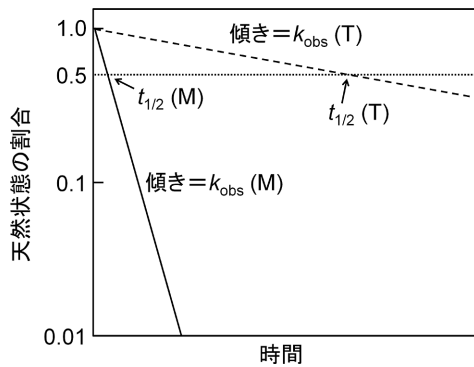


図3 不可逆変性するタンパク質の耐熱性の比較

ある一定温度で保温したときの、天然構造を維持しているタンパク質分子の割合の対数を時間に対してプロットする。直線の傾きが変性速度  $k_{\text{obs}}$  となり、天然状態の割合が半分になるのにかかる時間が  $t_{1/2}$  である。 $k_{\text{obs}}(\text{M})$  と  $k_{\text{obs}}(\text{T})$ 、 $t_{1/2}(\text{M})$  と  $t_{1/2}(\text{T})$  はそれぞれ常温生物由来タンパク質と好熱菌由来タンパク質の  $k_{\text{obs}}$  と  $t_{1/2}$  である。

できる。ある温度における変性分子の割合の対数を時間に対してプロットすることから  $k_{\text{obs}}$  や  $t_{1/2}$  が求まる (図3)。 $k_{\text{obs}}$  や  $t_{1/2}$  は、「速度論的な安定性」の便宜上の指標として頻繁に用いられる。

平衡論的な安定性と速度論的な安定性は、どちらも好熱菌タンパク質の高い耐熱性に重要である。*Sulfolobus islandicus* のプラスミドにコードされたDNA結合タンパク質 ORF56 や超好熱菌由来低温シヨックタンパク質等では、遅い変性速度と高い平衡論的な安定性の両方で、高い耐熱性を持つことが示されている<sup>10,11)</sup>。

### 5. 好熱菌タンパク質の耐熱化機構

次に、タンパク質の安定性を分子的に見るとどうなるだろうか。タンパク質分子の安定性は1) 共有結合、2) 静電相互作用、3) 水素結合、4) ファンデルワールス力 (レナードジョーンズ相互作用)、5) エントロピーを考えればよい。現在、計算機シミュレーションによるタンパク質構造の研究が進んでいるが、まだ安定性の正確な計算はできない。したがって、安定性の分子論的な研究は、以下に述べるようなタンパク質構造の比較、あるいは変異型タンパク質の研究にとどまっている。

これまでに、多くの好熱菌から得られた様々なタンパク質の構造解析から、好熱菌タンパク質の耐熱機構について多様な分子機構が提唱されてきた。たとえば、*Thermotoga maritima* 由来乳酸脱水素酵素 (LDH) は、低温菌あるいは常温菌由来 LDH と比べて、サブユニット内イオンペアの増加、二次構造含量の増加、溶媒に露出した疎水性表面積の減少と電荷アミノ酸の増加、分子内空洞の減少、サブユニット間接触面積の増加が見られる<sup>12)</sup>。ここでは、立体構造解析から推定された好熱菌タンパク質の耐熱化戦略について個別に述べていく。しかし、ここで先に結論を述べ

るならば、好熱菌タンパク質の耐熱化戦略には一つの決定的な戦略があるわけではなく、様々な耐熱化機構が組み合わさっている。

#### 5.1 高温で不安定なアミノ酸の除去

Haney らは超好熱菌 *Methanococcus jannaschii* (*Methanocaldococcus jannaschii*) と、いくつかの *Methanococcus* 属の常温菌のゲノム全体の比較から、アミノ酸組成の違いを研究した<sup>13)</sup>。この比較では、同じ *Methanococcus* 属に由来するタンパク質を用いているため、GC 含量の違いによるアミノ酸組成の偏りを考慮する必要がない。その結果、好熱菌タンパク質では中性の極性アミノ酸 (Gln, Asn, Thr, Ser) が減少していた。Gln と Asn は高温環境下で脱アミド化を受けやすく、この脱アミド化反応は、同じタンパク質中の Ser あるいは Thr 残基によって促進される<sup>14)</sup>。つまり、超好熱菌タンパク質では、脱アミド化を受けるアミノ酸と、脱アミノ化反応を促進するアミノ酸の両方が減少していた。反対に、電荷を持ったアミノ酸、特に、Glu, Arg, Lys の割合が超好熱菌由来タンパク質では大きくなっていった。

#### 5.2 $\alpha$ ヘリックスの安定化

$\alpha$ ヘリックスは主鎖原子間の水素結合によって形成される。しかし、 $\alpha$ ヘリックスの安定性は $\alpha$ ヘリックスを構成しているアミノ酸の種類によって異なる。その物理的な基礎は必ずしも明らかではないが、どのようなアミノ酸が $\alpha$ ヘリックスに多く含まれるかは統計的に調べられている<sup>15)</sup>。これを $\alpha$ ヘリックス形成能と呼ぶ。 $\alpha$ ヘリックス形成能が高いアミノ酸 (Glu, Met, Ala, Leu 等) は $\alpha$ ヘリックスを安定化し、ひいてはタンパク質構造全体を安定化すると予想される。Petukhov らや Facchiano らは $\alpha$ ヘリックス形成能の違いによる $\alpha$ ヘリックスの高い安定性が好熱菌タンパク質の耐熱性に寄与していると指摘した<sup>16,17)</sup>。なお、 $\alpha$ ヘリックス形成能以外にも、図4に示す方法で、原理的には $\alpha$ ヘリックスを安定化できる。

#### 5.3 疎水性相互作用の最適化

タンパク質の構造上の最も一般的な特徴の一つは、タンパク質内部は疎水性が高く表面は親水的であることである。膜タンパク質を除くほとんどのタンパク質で、疎水性残基は内部に集まり、親水性残基は表面に見られる。すなわち、分子内部の疎水性相互作用はタンパク質の立体構造形成に関わる最も重要な力であるといえる。

タンパク質の安定性に対する疎水性相互作用の重要性は、多くのタンパク質で $\Delta G_{\text{NU}}$ が最大となる温度が、疎水性相互作用が最も大きくなる20℃付近であることから予想される。これは、常温生物由来タンパク質だけではなく好熱菌由来タンパク質においても成り立っている<sup>18)</sup>。

超好熱菌由来タンパク質の疎水コアを形成する疎水性残基の耐熱性への寄与が、超好熱菌 *Thermococcus ko-*

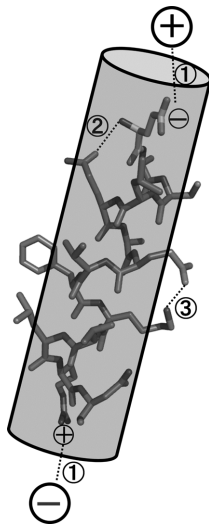


図4  $\alpha$ ヘリックスの安定性に関わる因子

$\alpha$ ヘリックス形成能、主鎖間の水素結合以外にも、①電荷を持ったアミノ酸とヘリックス双極子（円柱で示している）との相互作用、②末端のフリーのNH基、あるいはCO基との水素結合形成、③ $\alpha$ ヘリックス内の側鎖間の相互作用が、原理的には $\alpha$ ヘリックスを安定化できる。

*dakaraensis* 由来リボスクレアーゼ HII を用いた研究からも確かめられた。Dong らは疎水コアを形成する Ile または Leu を、より小さい Ala に置換した変異体を作製し、それらの解析から、疎水コアを形成する疎水性アミノ酸が超好熱菌タンパク質の遅い変性速度に重要であることを示した<sup>19)</sup>。

ただし、単純に分子内部の疎水性の増大による耐熱性の上昇を期待することはできない。疎水性残基の中で疎水性のより高い残基は、側鎖の体積がより大きい。したがって、タンパク質内部の疎水性を増大させることは、同時に内部の残基を大きくすることになる。つまり、分子内部への疎水性の大きいアミノ酸残基の導入は、構造に歪みを生じさせる原因となりうる。分子内部の疎水性相互作用の増大による耐熱性の上昇は、疎水コアのパッキングを改善する場合にのみ成立する。

#### 5.4 立体構造のコンパクト化

好熱菌タンパク質は、常温菌由来相同タンパク質と比較して小さい傾向がある<sup>20)</sup>。これはとりわけ表面に露出したループの短鎖化として見られる。小さいタンパク質は変性反応における熱容量変化 ( $\Delta C_p$ ) が小さくなる傾向がある。小さい  $\Delta C_p$  は  $\Delta G_{NU}$  の温度関数を末広がり (図1のモデル1) にするので、高温領域での安定性を高めることができる。

また、タンパク質の安定性は天然状態と変性状態との自由エネルギー差によって決まるので、変性状態が不安定になると、相対的に天然状態が安定化する。変性状態では、

ポリペプチド鎖は天然状態と比べてよりランダムな運動をするので、エントロピー的にはより好ましい状態といえる。ポリペプチド鎖が短いほど変性状態のエントロピーは小さくなるので、小さいタンパク質ほど天然状態が安定になるという解釈もできる<sup>21)</sup>。好熱菌タンパク質にしばしば見られるループ領域中のプロリン数、 $\beta$ 炭素で分岐したアミノ酸数の増加傾向も、変性状態のエントロピーを小さくすることで天然状態を安定化しているのかもしれない<sup>3)</sup>。

#### 5.5 イオン結合、イオン結合ネットワークによる静電相互作用の強化

超好熱菌タンパク質は分子表面に電荷を持ったアミノ酸を多く持つ傾向がある<sup>22)</sup>。超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の二価金属耐性に関わるタンパク質である CutA1 は、中性条件下での変性温度が 148.5°C と非常に高い耐熱性を持つ。このタンパク質はホモ三量体であり、他の生物種由来 CutA1 と比較すると、サブユニット内のイオン結合の数が極端に多い。さらに、イオン結合のネットワークが分子表面一面に広がっており、このことが高い耐熱性をもたらしていると考えられた<sup>23)</sup>。超好熱菌 *T. maritima* 由来ヒストン様 DNA 結合タンパク質 HU ( $T_m = 80.5^\circ\text{C}$ ) では、Arg9, Lys13, Glu34, Lys38 が分子表面でイオンペアネットワークを形成しているのに対し、*Bacillus stearothermophilus* 由来 HU タンパク質 ( $T_m = 61.6^\circ\text{C}$ ) では Glu34-Lys38 の一对のイオン対しか存在しない<sup>24)</sup>。また、二量体構造を持つ *Pyrococcus furiosus* 由来クエン酸合成酵素の高い耐熱性も、サブユニット間のイオン結合ネットワークに起因すると推測された<sup>25)</sup>。

しかしながら超好熱菌タンパク質に見られるイオン結合が耐熱性に関わっていない例もある。例えば、*P. furiosus* 由来ルブレドキシンの Lys6-Glu49 イオンペアには安定化の効果はない<sup>26)</sup>。これはイオン結合の形成によるエンタルピーの増加以上に、二つのアミノ酸が固定されることによるエントロピーコストが大きいからかもしれない<sup>27)</sup>。タンパク質表面の電荷の多少が構造に及ぼす影響については様々な議論がある。Greaves と Warwicker は、超好熱菌タンパク質の分子表面によく見られる電荷を持ったアミノ酸の多さは、むしろ水の誘電率が高温になるほど大きいことに対応して、高温環境下でのタンパク質の凝集抑制に寄与していると述べている<sup>28)</sup>。さらに、Kumer と Nussinov は、電荷のタンパク質に与える影響は温度により異なり、高温では活性部位やサブユニット構造を保つことに寄与するが、低温ではタンパク質の溶解度を高め、むしろ活性部位のフレキシビリティを高めることに寄与するとしている<sup>29)</sup>。

#### 5.6 オリゴマー化

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) は多くの微生物から精製されている。これまでにオリゴマー構造が

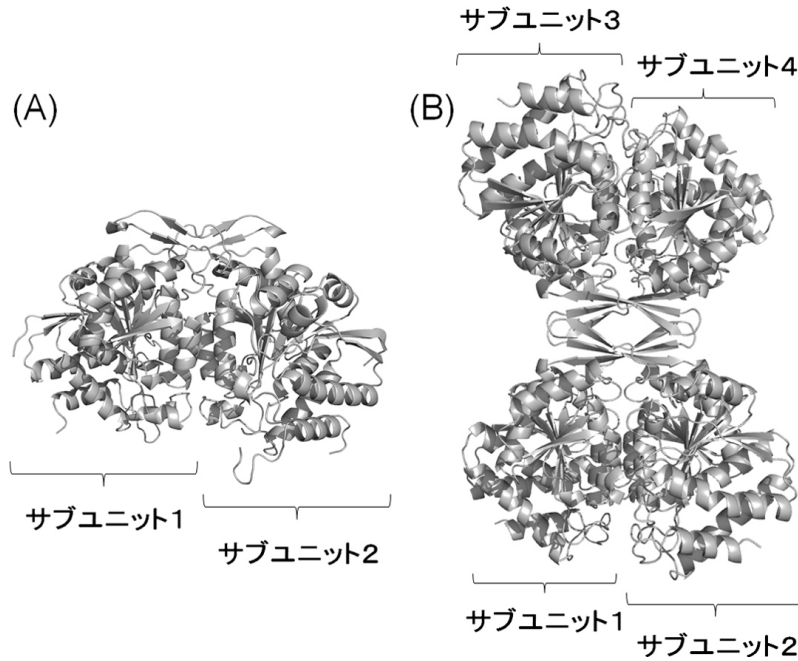


図5 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) のオリゴマー構造の比較  
 $T_m$  が  $87^\circ\text{C}$  である *T. thermophilus* IPMDH (A) は、他の生物種由来 IPMDH と同様の二量体構造を形成するが、 $T_m$  が  $96^\circ\text{C}$  である *S. tokodaii* IPMDH (B) は四量体構造を持つ。

調べられた IPMDH のほとんどがホモ二量体タンパク質であるが、唯一の例外として最も高い耐熱性を持つ超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来 IPMDH はホモ四量体構造を持つ (図5)。タンパク質のオリゴマー化は、サブユニット接触面における相互作用を増やすので、エンタルピー項の寄与により天然構造を安定化できる<sup>30)</sup>。よって、*S. tokodaii* 由来 IPMDH の四量体構造は高い耐熱性に関与していると予想される。この他にも、常温生物由来タンパク質と比較してより高次のオリゴマー構造が、好熱菌タンパク質に見られる場合が多い<sup>31,32)</sup>。

### 5.7 サブユニット間相互作用の強化

大腸菌、枯草菌、高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来 IPMDH は、いずれもホモ二量体を形成する。サブユニット接合面には、各サブユニットの2本の平行 $\alpha$ ヘリックスが接近して会合し、サブユニット間相互作用を疎水性相互作用で安定化している (図6)。好熱菌 IPMDH のサブユニット接合面の疎水性残基 Leu と Val を、それぞれ常温菌型の Glu と Met に置き換えると耐熱性が著しく低下し、逆に大腸菌 IPMDH、あるいは枯草菌 IPMDH のこれらの部位に好熱菌型の Leu と Val を導入すると耐熱性が上昇した<sup>33,34)</sup>。つまり、サブユニット間の強い疎水性相互作用が好熱菌 IPMDH の高い耐熱性に重要であることを示している。

*P. horikoshii* 由来アシルホスファターゼ (PhAcP) はホモ二量体構造からなる耐熱性の高い酵素である。PhAcP

の高解像度結晶構造から、13個の電荷を持ったアミノ酸から構成されるイオンペアネットワークがサブユニット接触面に形成されていることが示された。このイオンペアネットワークの形成によるサブユニット間相互作用の強化が、高い熱安定性に寄与していると推測された<sup>35)</sup>。

サブユニット間相互作用の強化の重要性は、ランダム変異とスクリーニングによるタンパク質の耐熱化実験からも示されている。著者らの研究室では、常温菌、好熱菌を含む様々な生物種由来 IPMDH の耐熱化を行ってきた。その結果、多くの耐熱化に寄与するアミノ酸置換を同定したが、これらのアミノ酸置換はサブユニット間やドメイン間といった構造単位間に比較的多く見られた。タンパク質の耐熱性の違いは、ドメイン間あるいはサブユニット間といった構造単位の結合の強さによるのかもしれない。

### 5.8 不完全な熱変性状態

*Bacillus amyloliquefaciens* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ ( $T_m=86^\circ\text{C}$ ) と *B. licheniformis* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ ( $T_m=101^\circ\text{C}$ ) の熱変性状態は、変性剤により完全に変性した場合と比べコンパクトな構造を保っている<sup>36)</sup>。コンパクトな熱変性状態は変性に伴うエントロピー変化が小さいので、天然状態の相対的な安定性を高めることになる<sup>37)</sup>。

*T. thermophilus* IPMDH もその分子サイズから推定されるよりもはるかに小さい $\Delta C_p$ を持つ<sup>6)</sup>。この場合も、変性状態における構造破壊が不完全であり、いくらかの疎水コアを保持していることに起因しているのかもしれない。

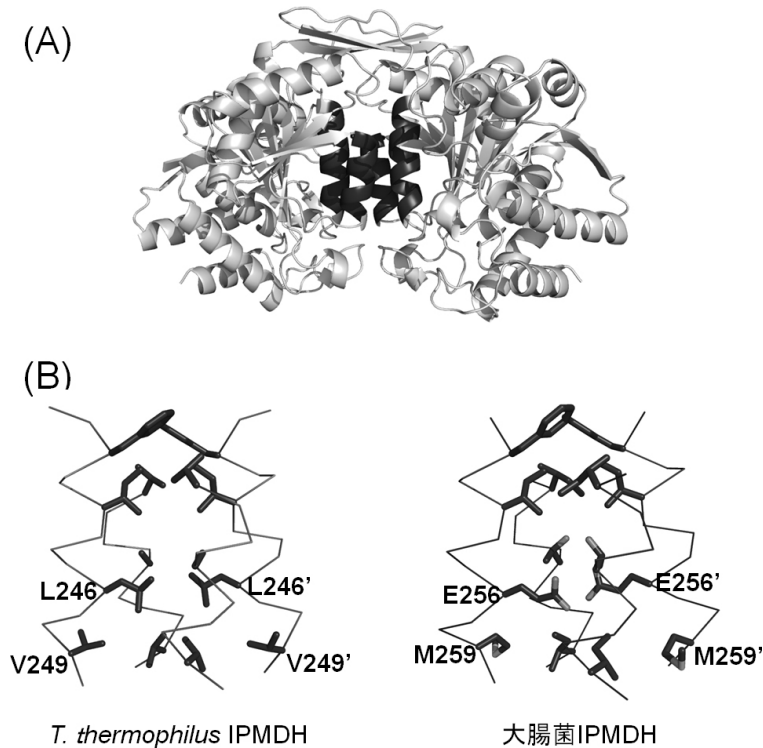


図6 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) のサブユニット接触面  
 (A) *T. thermophilus* IPMDH の二量体構造。二量体形成は接近した4本の $\alpha$ ヘリックス（濃い色で示してある）上の疎水性アミノ酸残基間の相互作用で安定化されている。(B) *T. thermophilus* IPMDH と大腸菌 IPMDH におけるサブユニット間相互作用に関わるアミノ酸残基の比較。*T. thermophilus* IPMDH では Leu246 と Val249 である部位が、大腸菌 IPMDH は親水性、あるいは、疎水性の弱い Glu256 と Met259 とに置き換わっている。

## 6. 耐熱性と立体構造の固さ

好熱菌由来タンパク質の高い耐熱性は、その構造の固さによるという考えがある。IPMDH は揺らぎの大きさと耐熱性の相関を調べるモデル材料として使われた。Závodszky らは、大腸菌と *T. thermophilus* 由来 IPMDH の局所的な構造の揺らぎの大きさを水素/重水素 (H/D) 交換法により調べた<sup>38)</sup>。その結果、25℃ における H/D 交換の割合は、好熱菌 IPMDH の方が大腸菌 IPMDH よりも著しく小さく、揺らぎの小さい固い構造を持つことが示された。また、人工的に耐熱性を向上させた T4 リゾチーム変異体の結晶構造が、野生型に比べて温度因子が小さくなっていた例も構造の固さと耐熱性との相関を示唆している<sup>39)</sup>。

しかしながら、耐熱性と構造の固さは関連しないという例も多くある。*P. furiosus* 由来ルブレドキシソと常温菌 *Clostridium pasteurianum* 由来ホモログはどちらもマルチターン配列がコンホメーション変化を示す。このマルチターンループの揺らぎの大きさを比較すると、超好熱菌酵素の揺らぎの方が大きい。さらに、常温菌ルブレドキシソに超好熱菌のマルチターン配列を導入したキメラ酵素は、

耐熱性は上昇したものの、タンパク質全体の主鎖の揺らぎは大きくなった<sup>40)</sup>。また、 $T_m$  が 15℃ 異なる *B. amyloliquefaciens* 由来  $\alpha$ -アミラーゼと *B. licheniformis* 由来  $\alpha$ -アミラーゼの揺らぎの大きさに明確な差はなく、揺らぎの温度依存性に関しても両酵素で差は見られなかった<sup>36)</sup>。このような結果は、タンパク質構造の揺らぎの大きさと耐熱性との間に必ずしも直接的な関連はないことを示している。直感的に結びつけて考えがちな構造の固さと耐熱性の関係は、そう単純なものではなさそうである。

## 7. ま と め

ここまで議論してきたように、変性が可逆的であれ不可逆的であれ、好熱菌タンパク質は二次構造の安定化、疎水性相互作用の強化、イオンペアネットワークの構築等により天然状態を安定化するか、あるいは、変性状態でのエントロピーを低下して変性状態を不安定にすることによって高温領域での天然状態を安定化している。このような、好熱菌タンパク質の立体構造解析（と常温生物由来相同タンパク質との比較）から得られた耐熱機構は、非耐熱タンパク質の耐熱化に利用された。一方で、非耐熱タンパク質の

耐熱化法としてしばしば用いられている二つの Cys 残基間のジスルフィド結合の導入<sup>41,42)</sup>は、好熱菌タンパク質が採用している戦略ではない。むしろ、好熱菌タンパク質には Cys は含まれないか、あったとしてもごく少数である場合が多い。

以上述べてきたように、好熱菌タンパク質の耐熱機構は様々であり、完全に理解するまでにはまだまだ長い道のりがある。特定のタンパク質を比較する場合、進化の過程で蓄積された中立的なアミノ酸置換が多く、単なる構造の比較だけから耐熱性の違いに寄与しているアミノ酸残基を同定することは困難である。さらに、様々な耐熱化戦略が混在しているために、タンパク質の耐熱性の理解は大変難しい。

筆者らは、タンパク質の耐熱性や立体構造に関する一切の知識無しに耐熱化する方法として、祖先型アミノ酸を推定し、それをタンパク質に導入するという方法を開発し、いくつかのタンパク質の耐熱化を行った<sup>43)~45)</sup>。そこで同定したアミノ酸置換による耐熱化機構は様々であり、たとえば分子内部の疎水性を高める、水素結合を新しくつくる、あるいは新規のイオン結合の形成といった具合であった。現段階での結論をあえていうのであれば、好熱菌タンパク質の耐熱化戦略は一つの決定的な戦略があるわけではなく、一つ一つは必ずしも効果が大きいわけではない様々な耐熱化機構が組み合わさることによって高い耐熱性を獲得しているということであろう。好熱菌にとってみれば、タンパク質が高温で安定でありさえすれば、その機構はどうでもいいのかもしれない。

## 文 献

- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., & Oshima, T. (1998) *Protein Sci.*, **7**, 698-705.
- Kumar, S., Tsai, C.J., & Nussinov, R. (2001) *Biochemistry*, **40**, 14152-14165.
- Sterner, R. & Liebl, W. (2001) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 39-106.
- Razvi, A. & Scholtz, J.M. (2006) *Protein. Sci.*, **15**, 1569-1578.
- Nojima, H., Ikai, A., Oshima, T., & Noda, H. (1977) *J. Mol. Biol.*, **116**, 429-442.
- Motono, C., Oshima, T., & Yamagishi, A. (2001) *Protein. Eng.*, **14**, 961-966.
- Li, W.T., Grayling, R.A., Sandman, K., Edmondson, S., Shriver, J.W., & Reeve, J.N. (1998) *Biochemistry*, **37**, 10563-10572.
- Luke, K.A., Higgins, C.L., & Wittung-Stafshede, P. (2007) *FEBS J.*, **274**, 4023-4033.
- Berezovsky, I.N. & Shakhnovich, E.I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12742-12747.
- Zeeb, M., Lipps, G., Lilie, H., & Balbach, J. (2004) *J. Mol. Biol.*, **336**, 227-240.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schroder, K., Marahiel, M. A., Jaenicke, R., & Schmid, F.X. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 229-235.
- Auerbach, G., Ostendorp, R., Prade, L., Korndorfer, I., Dams, T., Huber, R., & Jaenicke, R. (1998) *Structure*, **6**, 769-781.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C. R., & Olsen, G.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3578-3583.
- Wright, H.T. (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 1-52.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978) *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **47**, 45-148.
- Petukhov, M., Kil, Y., Kuramitsu, S., & Lanzov, V. (1997) *Proteins*, **29**, 309-320.
- Facchiano, A.M., Colonna, G., & Ragone, R. (1998) *Protein. Eng.*, **11**, 753-760.
- Kahsai, M.A., Martin, E., Edmondson, S.P., & Shriver, J.W. (2005) *Biochemistry*, **44**, 13500-13509.
- Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2008) *J. Mol. Biol.*, **378**, 264-272.
- Chakravarty, S. & Varadarajan, R. (2000) *FEBS Lett.*, **470**, 65-69.
- Thompson, M.J. & Eisenberg, D. (1999) *J. Mol. Biol.*, **290**, 595-604.
- Cambillau, C. & Claverie, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 32383-32386.
- Tanaka, T., Sawano, M., Ogasahara, K., Sakaguchi, Y., Ba-gaudtinov, B., Katoh, E., Kuroishi, C., Shinkai, A., Yokoyama, S., & Yutani, K. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 4224-4230.
- Christodoulou, E., Rypniewski, W.R., & Vorgias, C.R. (2003) *Extremophiles*, **7**, 111-122.
- Arnott, M.A., Michael, R.A., Thompson, C.R., Hough, D.W., & Danson, M.J. (2000) *J. Mol. Biol.*, **304**, 657-668.
- Strop, P. & Mayo, S.L. (2000) *Biochemistry*, **39**, 1251-1255.
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C.J., & Nussinov, R. (2000) *Proteins*, **38**, 368-383.
- Greaves, R.B. & Warwicker, J. (2007) *BMC. Struct. Biol.*, **7**, 18.
- Kumar, S. & Nussinov, R. (2004) *Chembiochem.*, **5**, 280-290.
- Goodsell, D.S. & Olson, A.J. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 105-153.
- Maes, D., Zeelen, J.P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M.H., Backmann, J., Martial, J.A., Wyns, L., Jaenicke, R., & Wierenga, R.K. (1999) *Proteins*, **37**, 441-453.
- Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N., & Van Beeumen, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2801-2806.
- Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., & Oshima, T. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **260**, 499-504.
- Kirino, H., Aoki, M., Aoshima, M., Hayashi, Y., Ohba, M., Yamagishi, A., Wakagi, T., & Oshima, T. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **220**, 275-281.
- Cheung, Y.Y., Lam, S.Y., Chu, W.K., Allen, M.D., Bycroft, M., & Wong, K.B. (2005) *Biochemistry*, **44**, 4601-4611.
- Fitter, J. & Haber-Pohlmeier, S. (2004) *Biochemistry*, **43**, 9589-9599.
- Robic, S., Guzman-Casado, M., Sanchez-Ruiz, J.M., & Marqusee, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11345-11349.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, & Petsko, G.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7406-7411.
- Wray, J.W., Baase, W.A., Lindstrom, J.D., Weaver, L.H., Po-teete, A.R., & Matthews, B.W. (1999) *J. Mol. Biol.*, **292**, 1111-1120.

- 40) LeMaster, D.M., Tang, J., Paredes, D.I., & Hernandez, G. (2005) *Proteins*, **61**, 608–616.
- 41) Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M., & Matthews, B.W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6562–6566.
- 42) Ivens, A., Mayans, O., Szadkowski, H., Jurgens, C., Wilmanns, M., & Kirschner, K. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1145–1153.
- 43) Watanabe, K., Ohkuri, T., Yokobori, S., & Yamagishi, A. (2006) *J. Mol. Biol.*, **355**, 664–674.
- 44) Iwabata, H., Watanabe, K., Ohkuri, T., Yokobori, S., & Yamagishi, A. (2005) *FEMS Microbiol. Lett.*, **243**, 393–398.
- 45) Shimizu, H., Yokobori, S., Ohkuri, T., Yokogawa, T., Nishikawa, T., & Yamagishi, A. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 1060–1069.
-