

## 低温菌由来の酵素の性質とその構造

工技院・北海道工業技術研究所 石崎紘三

地球上には高緯度地方や深海など多くの低温環境が存在するが、そのような極限環境においても多くの微生物が生息している。低温微生物については生育上限温度などによって分類する Morita<sup>1)</sup> の定義が一般に用いられているが、ここでは総称的に低温菌という言葉を用いる。低温菌は寒冷地における効率的な排水・廃棄物処理、低温海域での油汚染処理などに利用し得るものとして注目されている。現在低温下でも汚染物質の分解活性の高い微生物の探索が行われているが、将来的には遺伝子工学を利用した低温下での活性が高い微生物の創製が期待される。このためには微生物の低温耐性や適応機構の解明、それに関わる特異物質やその遺伝子の単離などが必要である。低温適応に関与するものとして低温下での生体膜の流動性を維持するための膜脂質の組成変化、低温でも高い活性を有する酵素（以下低温酵素）、低温ショックタンパク質などが知られているが、<sup>2)</sup>ここでは低温酵素について最近の研究を紹介する。

これまで種々の低温菌由来の低温酵素が単離され性質が検討されている。低温酵素は中温菌由来酵素に比べ低温下での活性が高いが、一方熱安定性は低い。低温酵素は低温下での活性を維持するためによりフレキシブルな高次構造をとっていると推定されているが、最近低温酵素の詳細な構造と活性の関連についての研究が始まっている。Zuber<sup>3)</sup> は *Bacillus* spp. の高温菌、中温菌、低温菌に由来する乳酸脱水素酵素 (LDH) の一次構造の比較を行った。これらの LDH のアミノ酸配列は60~70%の相同性を持っていた。アミノ酸の置換には明らかな温度依存性が見いだされた。たとえば、非極性のアミノ酸残基では高温 LDH では Phe, Val, Ile が多く、これらが中温および低温 LDH では Leu, Ala, Met などに置換されていた。特に注目されるのは活性部位やサブユニットの接触部位付近において、高温 LDH の12~13個の疎水性残基（特に Ala）が、中温および低温 LDH では親水性残基（特に Ser と Thr）に置換されていたことである。機能的に重要な部位におけるこのようなアミノ酸残基の置換は低温におけるよりフレキシブルで活性の高い、しかし熱安定性は低い構造形成をもたらしていると推定された。このような置換は微生物の新しい温度環境への適応進化の過程で獲得されたものであろう。また、Feller<sup>4)</sup> は南極海から採取した低温菌 *Alteromonas haloplantis* A23 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ (AHA) およびその遺伝子を単離し、酵素の性質や構造を中温菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ (BAA) と比較した。AHA は453のアミノ酸残基から成り、酵素活性至適温度が約 30°C (BAA では約 60°C)、5°C において BAA の約9倍の活性をもつなど低温酵素の性質を有していた。AHA と BAA のアミノ酸配列の詳細な比較が行われた。AHA において特に特徴的なのは活性部位周辺に Gly, Ala, Ser などの小サイズのアミノ酸残基が異常に多く存在することである。このことは BAA のみならず、他の微生物あるいは脊椎動物由来の  $\alpha$ -アミラーゼにも例がない。おそらく、これらの小サイズアミノ酸残基によって活性部位近傍のペプチド鎖がフレキシブルになり、それに伴い低温下での活性が高くなるものと推定された。さらに Devail<sup>5)</sup> は南極海から採取した低温菌 *Bacillus* TA41 由来のプロテアーゼであるズブチリン S41 とその遺伝子を単離した。S41 は309アミノ酸残基から成り、中温菌由来のズブチリンとは52%のアミノ酸配列の相同性を持っており、至適 pH, 広い基質特異性などの性質も類似していた。しかし活性至適温度は約 40°C で中温型ズブチリンより 20°C 程度低く、また 5~20°C での活性は中温型より約4倍高かった。一方、熱安定性は 50°C では中温型の約 1/10 であった。S41 の構造の詳細な解析が行われているが、中温菌や高温菌由来のズブチリンに比べよりフレキシブルな、そして熱感受性の高い構造をとっていることが示唆された。その主要な原因の一つと考えられるのは、分子の表面部分に異常に多く存在する親水性残基（主に Asp が中温および高温型より11~12個多い）である。親水性表面のため分子全体が低密度の構造をとっていると推定された。また、芳香環相互作用や静電的相互作用の数、Ca<sup>2+</sup> の結合親和力などの低下も低温下でのフレキシブルな構造とそれに伴う活性の向上に寄与していると推定された。

このように、低温酵素の低温下での高活性と構造の相関についてのデータが得られてきている。さらにさまざまな酵素について解析が行われることにより、より一般的なルールが見いだされてくるものと期待される。

- 1) Morita, R. Y.: *Bacteriol. Reviews*, **39**, 144 (1975).
- 2) Gounot, A.-M.: *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 386 (1991).
- 3) Zuber, H.: *Biophys. Chem.*, **29**, 171 (1988).
- 4) Feller, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 5217 (1992).
- 5) Davail, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 17448 (1994).