

マリアナ海溝の底に生きる深海生物の酵素タンパク質の耐圧性のメカニズムを解明 ～たった1個のアミノ酸の違いで酵素の耐圧性が変わる～

名古屋大学シンクロトン光研究センター（センター長：曾田 一雄）の永江 峰幸（ながえ たかゆき）特任助教、渡邊 信久（わたなべ のぶひさ）教授と立教大学大学院の濱島 裕輝（はまじま ゆうき）特別研究員、海洋研究開発機構、広島大学の共同研究チームは、世界最深のマリアナ海溝のチャレンジャー海淵（水深 10,898m）で発見された絶対好圧菌シュワネラベンティカ（DB21MT-2 株）の生育に必須なタンパク質であるイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（IPMDH）について、水深 1 万メートルの水圧（1,000 気圧）でも機能を失わない耐圧性のメカニズムを解明しました。

深海の高水圧に耐えて生息する生物は、耐圧性タンパク質を保有していることが知られていましたが、そうしたタンパク質の圧力耐性のメカニズムは不明でした。今回共同チームが研究した IPMDH は、生物に必須なアミノ酸であるロイシンの生合成過程で働く酵素タンパク質です。アメリカのオナイダ湖で分離された常圧菌シュワネラオネイデンシス（MR-1 株）と絶対好圧菌シュワネラベンティカの IPMDH では、両者のアミノ酸配列や立体構造はほとんど同じですが、前者は 1,000 気圧では活性が 70%程度まで減少するのに対して、後者は 95%以上の活性を維持します。

共同チームでは、常圧菌の IPMDH について、高圧装置（ダイヤモンドアンビルセル）とシンクロトン放射光の高エネルギーで強い X 線を用いて構造解析を行い、圧力によって IPMDH の活性部位の裏側に水分子がクサビのように割込んで行く様子を発見しました。その水分子の場所を比較すると、266 番目のアミノ酸が常圧菌ではセリンであるものが、絶対好圧菌ではアラニンに変わっていました。常圧菌の IPMDH のセリンをアラニンに置き換えた人工変異型 IPMDH（S266A）を作成して、耐圧性を調べたところ、深海生物並の耐圧性を獲得していました。また、逆に深海生物の IPMDH のアラニンをセリンに置き換えると耐圧性を失いました。すなわち、IPMDH の全体で 364 個のアミノ酸のうち、たった1つのアミノ酸の違いで深海型酵素が陸上型酵素になり、逆に陸上型酵素が深海型酵素になったりする事が明らかとなりました。これまで、深海生物のタンパク質の耐圧性の獲得は複雑な要素が絡み合っていて実現されていると考えられてきていましたが、意外なことにたった1つのアミノ酸の違いのレベルで実現されていることが分かりました。

昨年度、あいちシンクロトン光センターで供用を開始した「名古屋大学ビームライン」でも同種の研究が可能となっており、深海生物のタンパク質の耐圧性の不思議の解明のみならず、例えば、有用酵素の工業利用のための高耐圧性付与などの利用の展開が期待されます。

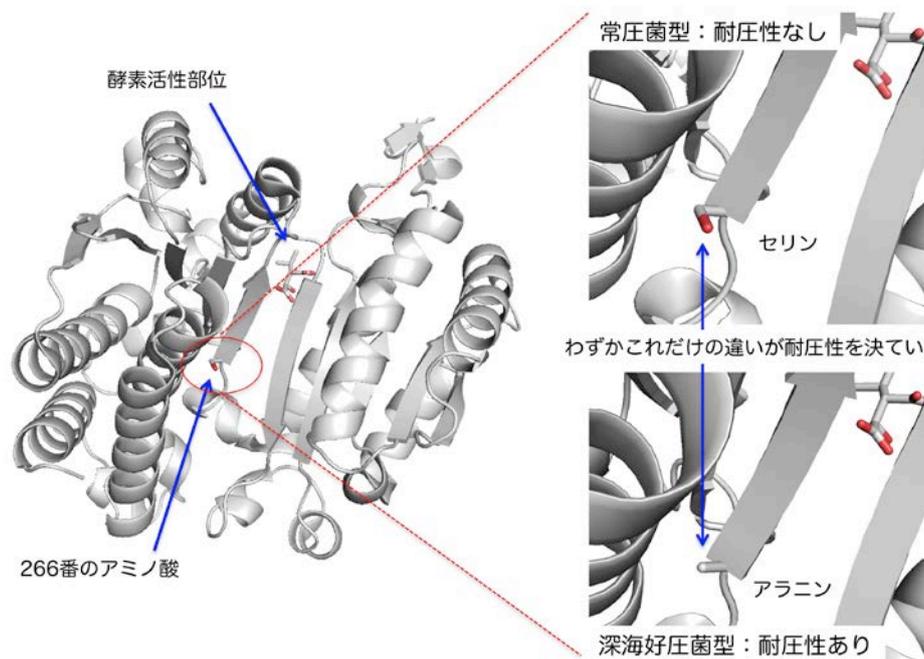
本研究成果は、科学雑誌「Extremophiles」（2月8日付け電子版）に掲載されました。

※ 本研究の一部は、JSPS 科研費（25450121, 21657027, 24570186）及び私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1201003）の助成を受けたものです。

マリアナ海溝の底に生きる深海生物の酵素タンパク質の耐圧性のメカニズムを解明 ～たった1個のアミノ酸の違いで酵素の耐圧性が変わる～

【ポイント】

- 深海生物のタンパク質の耐圧性がわずか1個のアミノ酸の違いで実現されていることを発見し、その知見に基づいて実際に常圧生物のタンパク質の耐圧化に成功した。
- 「あいちシンクロトロン光センター」の名古屋大学ビームラインでも、今後は同種の研究が展開出来る。



イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の 364 個のアミノ酸のうち、266 番目のわずか1つの違いが、深海の水圧にも耐える性質を決めていた。それを入れ替えることで、耐圧性を自在にコントロールすることが出来た。

【背景】

深海高水圧環境に適応して生息する生命体は、その体の仕組みも高圧環境に適応して働いています。海洋研究開発機構の加藤らによって、世界最深部であるマリアナ海溝・チャレンジャー海淵（水深、10,898m）で、絶対好圧菌シュワネラベンティカ DB21MT-2 株（500 気圧以上の圧力下で生育可、生育至適圧力は 700 気圧以上、図 1）が分離され、研究が進められて来ました。そうした研究によって、それらの好圧菌の作る酵素やタンパク質が、高い圧力下においても一般的に高い活性を保持していることがわかり、その耐圧性は、その菌が生息する深度と相関していることが示唆されていました。しかし、その耐圧性がどういう分子メカニズムで実現されているかについては、いまだに明らかになっていませんでした。

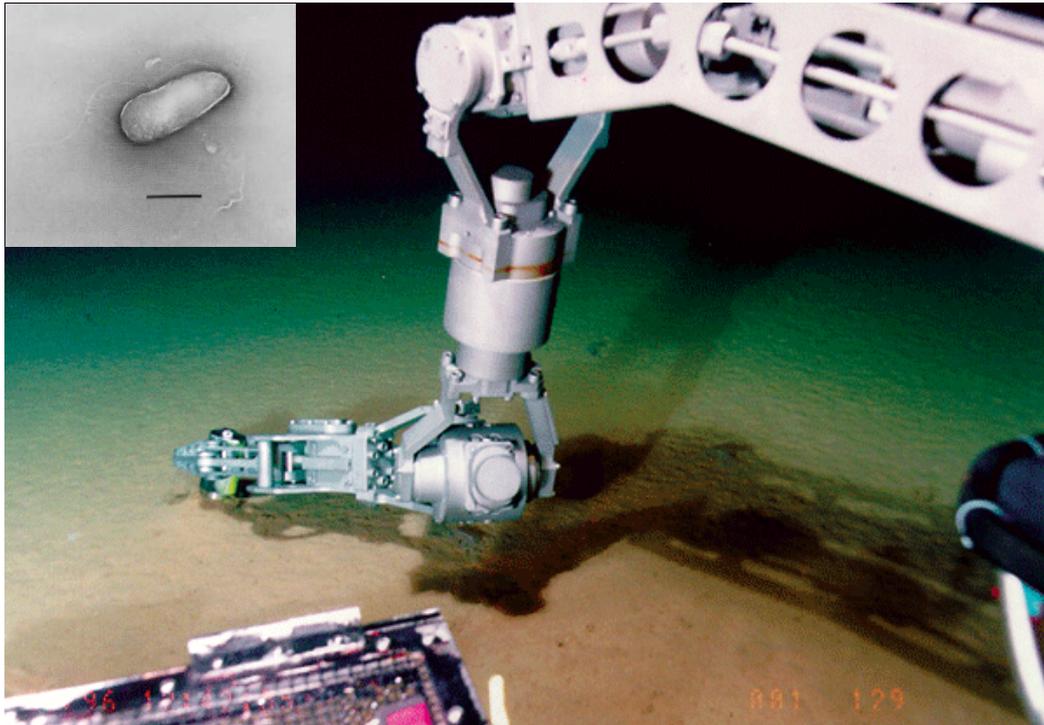


図 1. 大深度無人深海探査船、初代「かいこう」によるマリアナ海溝での無菌採泥サンプリングの様子と、この泥から分離された絶対好圧菌シュワネラベンティカ DB21MT-2 株の電子顕微鏡写真（横バーは 1 ミクロン）。

【研究の内容】

今回、こうした深海生物のもつ高圧適応のメカニズムを明らかにすることを目的として、名古屋大学と立教大学、海洋研究開発機構、広島大学の共同研究チームでは、シュワネラベンティカ DB21MT-2 株の酵素タンパク質イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の耐圧性についてダイヤモンドアンビルセル (DAC、図 2) と呼ばれる高圧装置とシンクロトロン放射光の高エネルギー高輝度の X 線を用いる高圧条件下のタンパク質立体構造解析法で調べました。IPMDH は、生物に必須なアミノ酸であるロイシンの生合成過程で働く酵素タンパク質です。アメリカのオナイダ湖で分離された常圧菌シュワネラオネイデンシス (MR-1 株) と絶対好圧菌シュワネラベンティカの IPMDH では、両者のアミノ酸配列や立体構造はほとんど同じですが、前者は 1,000 気圧では活性が 70% 程度まで減少するのに対して、後者は 95% 以上の活性を維持します。

共同研究チームでは、常圧菌の IPMDH について、圧力によって IPMDH の活性部位の裏側に水分子がクサビのように割込んで行く様子を発見しました。その水分子の場所を比較すると、IPMDH の 266 番目のアミノ酸が常圧菌ではセリンであるものが、絶対好圧菌ではアラニンに変わっていました。常圧菌の IPMDH のセリンをアラニンに置き換えた人工変異型 IPMDH (S266A) を作成して (図 3) のような装置で耐圧性を調べたところ、深海生物並の耐圧性を獲得していました。また、逆に深海生物の IPMDH のアラニンをセリンに置き換えると耐圧性を失いました。すなわち、IPMDH の全体で 364 個のアミノ酸のうち、たった 1 つのアミノ酸の違いで深海型酵素が陸上型酵素になり、逆に陸上型酵素が深海型酵素になったりする事が明らかとなりました (図 4)。

また、これらの変異型酵素を結晶化し、高圧条件下における立体構造を調べたところ、266 番目の

アミノ酸が陸上酵素型のセリンの場合、活性中心の裏側に存在するくぼみ部分に 3 つの水分子が留まるのに対し、深海酵素型のアラニンの場合は、これらの水分子が留まらないことが観測されました（図 5）。すなわち陸上酵素が圧力に対して感受性であるのは、加圧条件下においてこのくぼみ部分に水分子がクサビ状に侵入し、親水性アミノ酸のセリンと水素結合して留まることによって酵素分子の動きが抑制されることで酵素活性が抑制されるという現象が起こったと推定されます。それに対して深海酵素では、この部分が疎水性アミノ酸のアラニンであるため、加圧下でも水分子が結合出来ずクサビ状に留まらないため、活性発現に重要な分子の柔軟性が補償されているというメカニズムがわかりました（図 6）。

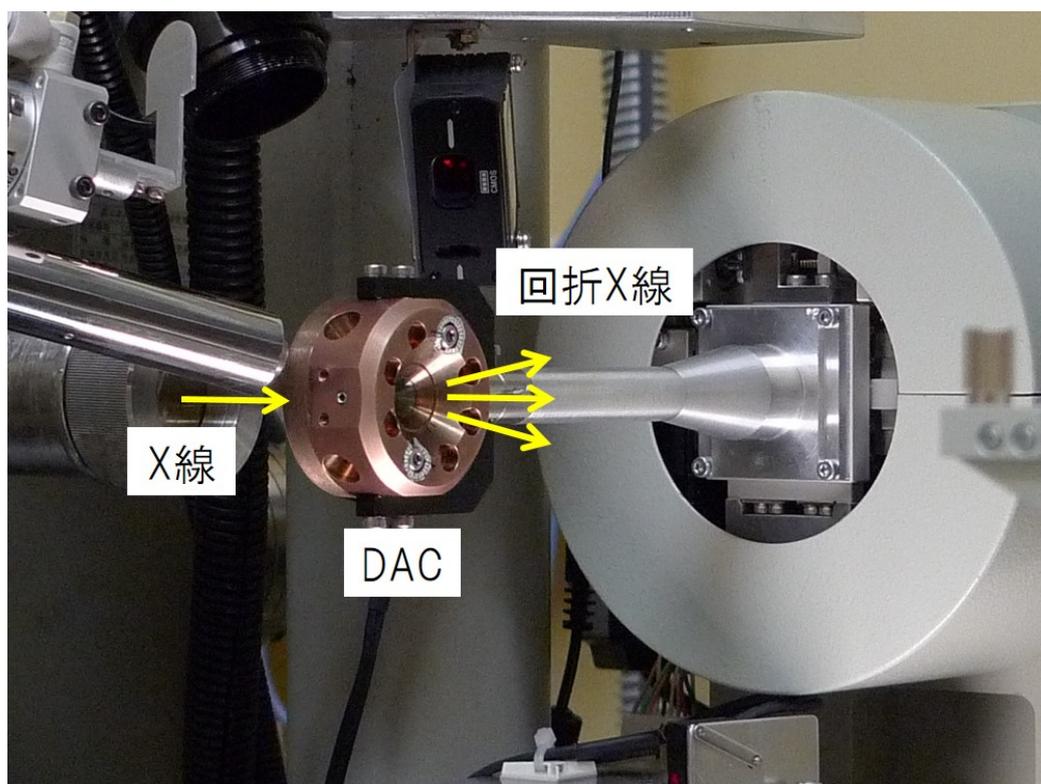


図 2. 高圧条件下のタンパク質立体構造を調べるためのダイヤモンドアンビルセル（DAC）の写真。高エネルギー加速器研究機構の放射光科学研究施設のビームライン AR-NW12A の回折計に搭載した様子。なお、現在では、同様な実験環境をあいちシンクロトロン光センターの名古屋大学ビームラインにも構築しています。

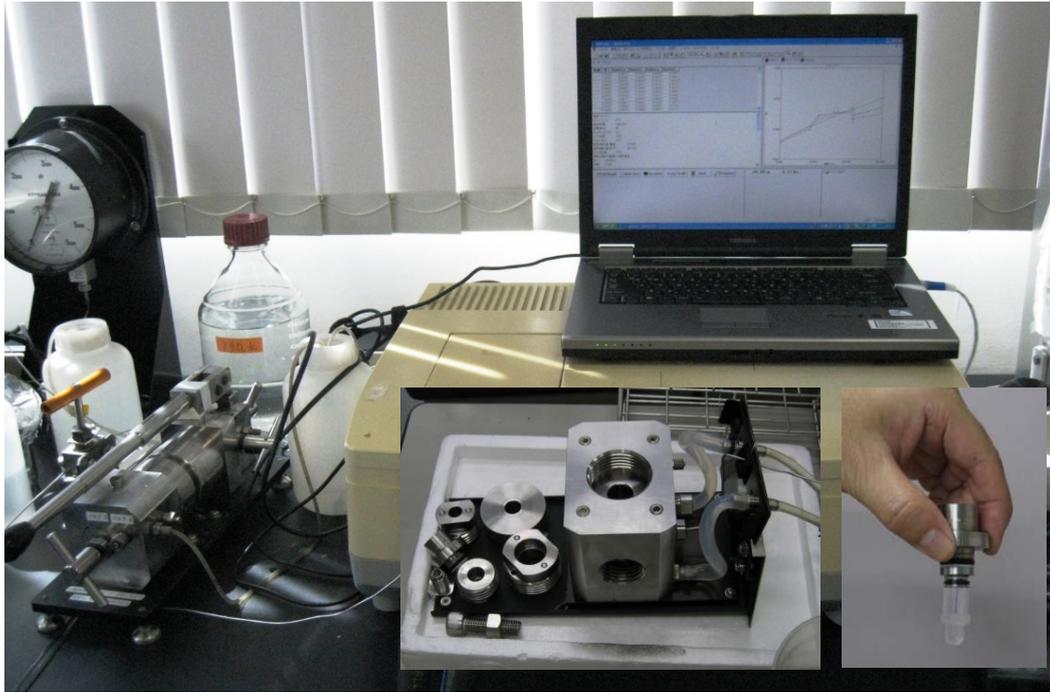


図 3. 高圧分光光度計

分光的に測定できる酵素の活性を最大 400MPa まで測定することが可能な装置です。
下の写真は、加圧セルチャンバーと加圧容器内にセッティングする円筒形石英セル。

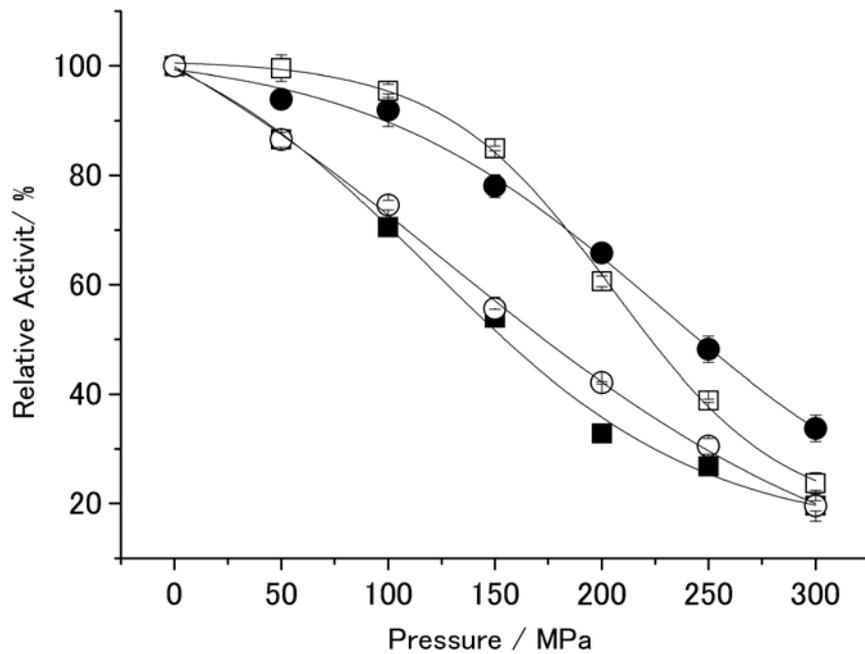


図 4. 各変異酵素の各圧力下での活性比較.

- : 深海酵素、○: 深海酵素の A266S 変異体、
- : 陸上酵素、□: 陸上酵素の S266A 変異体

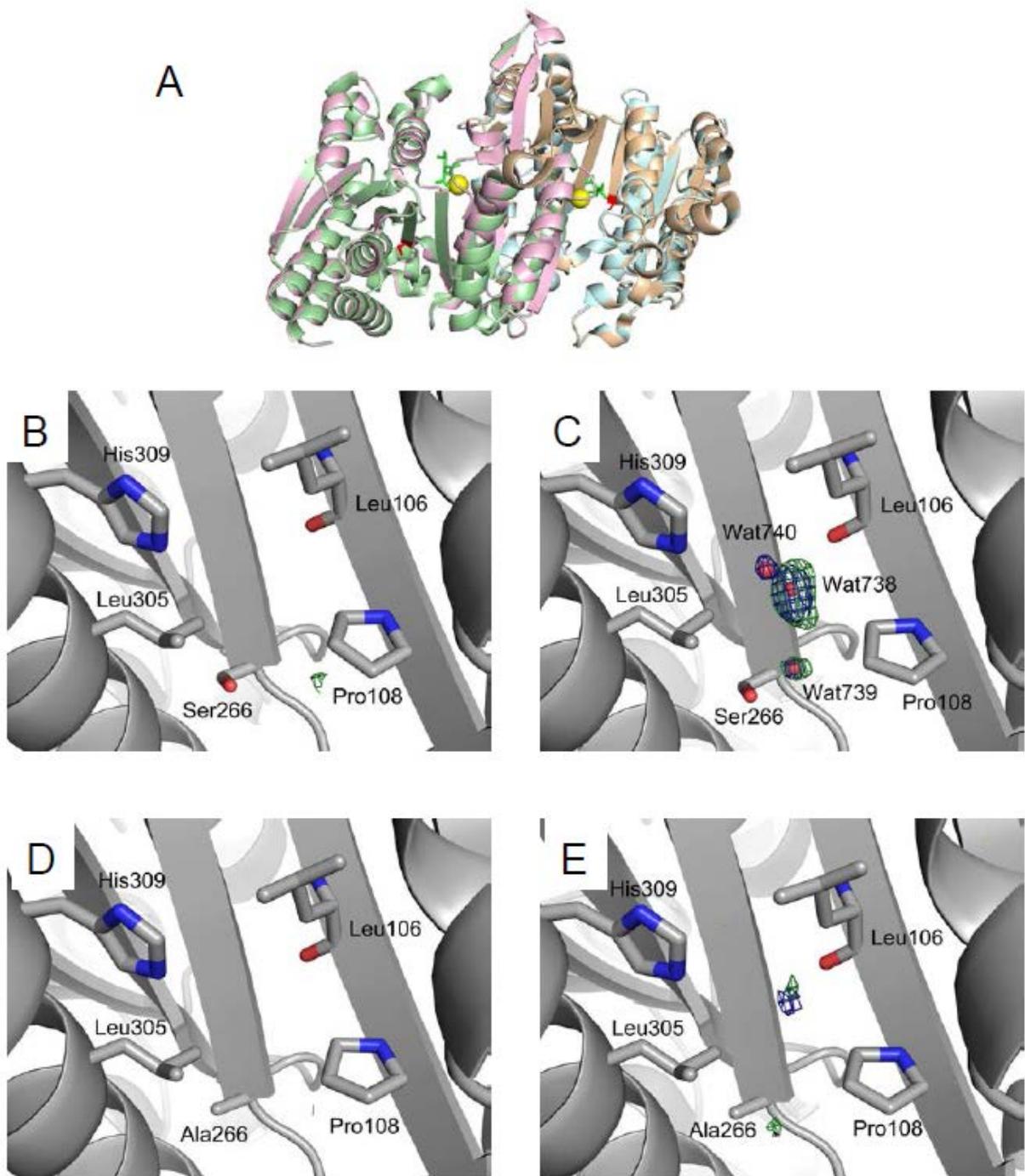


図 5. A.陸上酵素（ピンク；サブユニット 1、ブラウン；サブユニット 2）および陸上酵素の S266A 変異型（グリーン；サブユニット 1、シアン；サブユニット 2）の全体構造。ライトグリーン；基質（イソプロピルリンゴ酸）、イエローボール；マグネシウムイオン。
 B-E は活性中心裏側のくぼみ部分を拡大したもの。B、陸上酵素の大気圧下の構造。C、陸上酵素の加圧下の構造。3 つの水分子（Wat738~740）が留まっている。D、深海型酵素の大気圧下の構造。E、深海型酵素の加圧下の構造。266 番目のアミノ酸残基がアラニンに変わったことで水が留まらなくなっている。

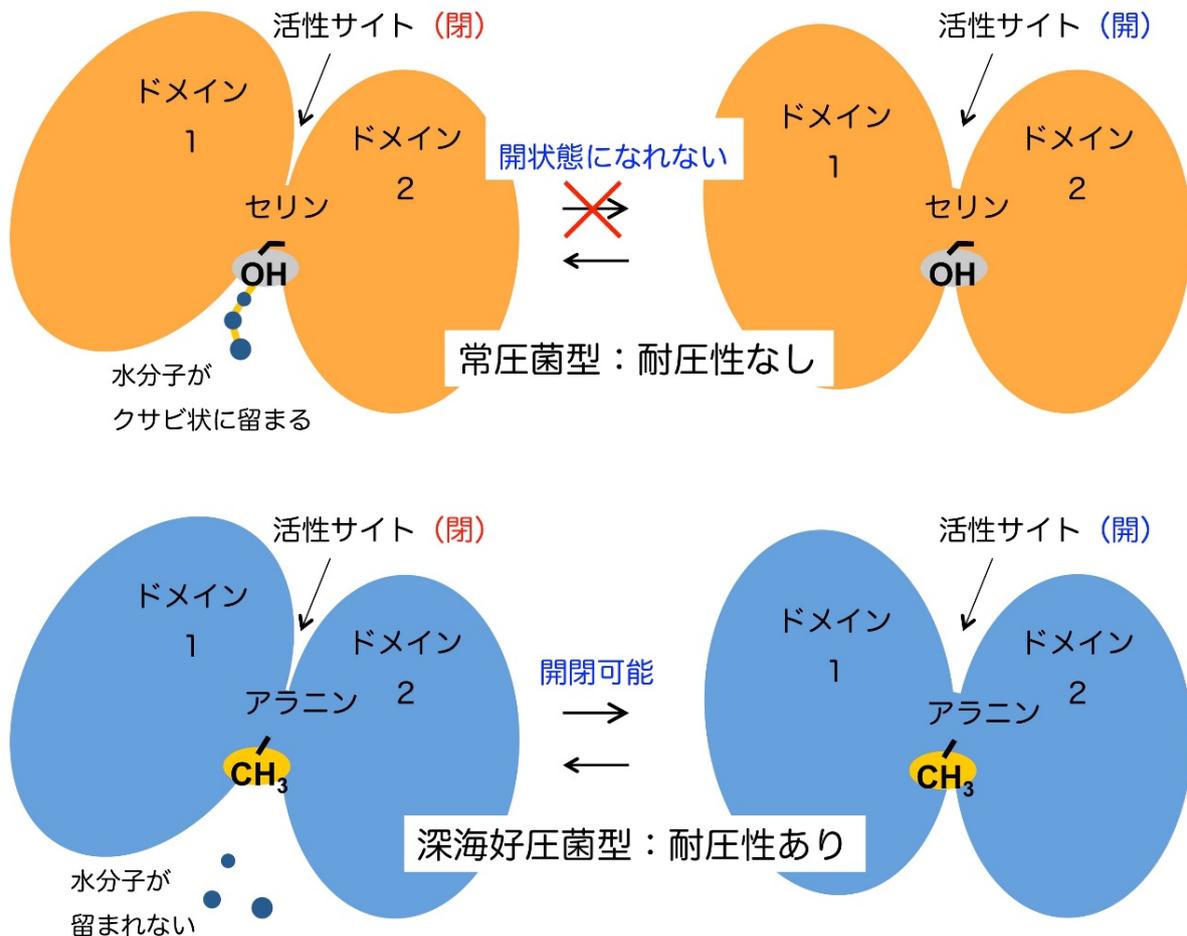


図 6. 陸上型酵素（上）と深海型酵素（下）の加圧下における水分子侵入モデル。

陸上酵素の場合、加圧によりくぼみ部分のセリンに水分子が水素結合して留まってしまうため、IPMDH 分子の運動性が抑制され活性が減少する。深海酵素の場合は、疎水性のアラニンであるため、水分子が水素結合出来ずくぼみ部分に留まらないため、活性中心の開閉はスムーズに行われることで高圧下でも反応が進行する（耐圧性を示す）。

【成果の意義】

今回の結果から、全体で 364 個あるアミノ酸のわずか 1 個の違いで深海酵素が陸上酵素の性質を持ったり、その逆に陸上酵素が深海酵素になったりすることが明らかとなりました。これまで長い間、深海生物の深海高圧下への適応戦略というのは、とても複雑でいくつもの要素が絡み合っていると考えられてきていましたが、タンパク質個々の機能に焦点を当てれば、意外と単純にアミノ酸のレベルで議論ができることがわかりました。今回の成果から、高圧構造解析の結果を利用して、既知のタンパク質に深海生物の耐圧機能を付加するという技術的な可能性を示すことができました。今後は、基礎研究の面からは、タンパク質における高圧適応メカニズムの一般則を導き出すという研究を推進するとともに、応用面としては、圧力を利用するバイオテクノロジー分野において、工業利用酵素にランダムな試行錯誤によらず論理的に耐圧性を付与する技術の開発がさらに進んでいくことが考えられます。さらには、食品科学分野等での加圧によるアレルギー物質の分解や除去、高圧バイオリクターなどへの利用も期待されます。

【用語解説】

- 1 絶対好圧菌：マリアナ海溝などの深海に生息する耐圧性細菌で、常圧環境では生息出来ない。
- 2 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素：ロイシン生合成の対応する酵素であり、本研究対象のシュワネラ族の場合は、残基数 364 の 2 量体。
- 3 ダイヤモンドアンビルセル：一組 2 個のダイヤモンドを互いに向かい合わせ、その間に穴（試料室）のある金属ガスケットを挟んで圧縮することで、高圧を印加する装置。

【掲載雑誌名、論文名、著者】

雑誌名：Extremophiles（極限環境微生物）

論文名：Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution.

著者名：濱島 裕輝^{3,4}、永江 峰幸¹、渡邊 信久^{1,2}、大前 英司⁵、山田 康之³、加藤 千明⁴

所 属：1. 名古屋大学シンクロトロン光研究センター

2. 名古屋大学大学院工学研究科

3. 立教大学大学院理学研究科

4. 海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野

5. 広島大学大学院理学研究科

U R L : <http://link.springer.com/article/10.1007/s00792-016-0811-4/fulltext.html>

※ なお本研究の一部は、JSPS 科研費（25450121, 21657027, 24570186）及び私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1201003）の助成を受けたものです。