

好塩性菌と好塩性タンパク質の産業利用

---有機溶媒耐性と環境浄化への応用

徳永正雄

鹿児島大学 農学部 生物資源化学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

e-mail: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

要旨

好塩性菌と好塩性酵素は、通常生物に見られない特徴を有し、産業利用に最適な生物資源である。好塩性菌から α -amylase を精製し、有機溶媒に対する安定性を調べた。好塩性 α -amylase は、非極性で水と混和しないクロロフォルムなどの有機溶媒に対して極めて高い耐性を示し、さらに、メタノールなどの水と混和する極性の有機溶媒に対しても、終濃度 30%までの添加では影響を受けなかった。50%という高濃度の添加では、10-50%の活性低下が認められたが、50%のメタノールの添加では、90%の活性を保持していた。以上のような有機溶媒に対する高い耐性は、好塩性酵素の構造的特徴である「多量のマイナス荷電含量」で説明できると考えられた。好塩性酵素が熱変性に耐性であるだけでなく、有機溶媒にも耐性であることが判明し、その産業利用がさらに重要になったと考えられる。また我々は、好塩性菌が重金属にも耐性であるという結果を得ており、好塩性菌やその重金属結合タンパク質の性質について検討してきたが、今回、新しい重金属結合タンパク質を見つけ、いくつか的好塩性菌とともにその重金属結合性を調べた。

1. 緒言

古くから人類は、醸造・発酵食品や抗生物質の発見・開発など、多くの微生物を利用して生活を豊かにしてきた。地球環境が悪化の一途を辿っている現在、「環境にやさしいものづくり」としての生物産業、特に多種多様な特殊能力を持つ微生物を新たに発見し、その機能を十分に利用する試みは、ますますその重要性が増大している。現在、我々が利用している微生物は地球上に存在しているものの高々 5～10%程度と言われており、特に通常生物がとても生きて行けない様な極限環境に生育している特殊な微生物は、多彩な極限能力を持っていると考えられ、最も期待されている微生物群の一つである。

本土・島嶼とも海に囲まれた鹿児島県は、豊かな海洋生物資源に恵まれている。海洋などに生息する好塩性菌は高圧の深海や高い塩分濃度に適応している極限環境微生物の一種であり、「いったん変性しても直ちに機能を回復するタフなタンパク質＝好塩性タンパク質」を生産する。酵素を始めとしたタンパク質の工業利用は様々試みられているが、その「不安定性＝不可逆的な変性」が弱点となっている。「好塩性タンパク質」は、高濃度塩（塩による塩析効果）に対してだけでなく、一般に熱や変性剤などの様々な変性作用にも耐性あるいは可逆的な活性回復を示し、その産業利用が期待されている。昨年より、好塩性加水分解酵素—特にアミラーゼやプロテアーゼの産業生産と利用について一研究を進め、好塩性酵素の有機溶媒に対する耐性や塩依存的な活性化という優れた特性を見つけた。

本年度は、好塩性アミラーゼに注目し、メタノール等水と自由に混和しタンパク質にとって強い変性作用を示す極性有機溶媒や、水と混和しない非極性の有機溶媒に対する耐性と塩の効果について検討した。一方、当研究室では、生体に対して強い毒性を示す重金属に対して好塩性菌が強い耐性を示すという結果を得ておらず、昨年実施した予備的研究の結果、好塩性菌菌体が高い「重金属結合能」を持っていることを発見した。今回、好塩性菌への重金属結合量を定量・比較するとともに、好塩性菌のペリプラズムに局在し、高い重金属結合能を持った新たなタンパク質 ZP を同定して、その性質を調べた。このタンパク質は、我々が以前報告した好塩性重金属結合タンパク質 HP の同属体タンパク質と考えられた。

2. 実験

2. 1 菌株と培地および遺伝子分離

好塩性 α -アミラーゼの生産と精製には、 α -アミラーゼ生産菌 *Nesterenkonia halobia* を用いた。培地は、1M NaCl を含む Nutrient Broth もしくは Sehgal and Gibbons (SGC) 培地を用いた⁽¹⁾。高度好塩菌は、4M NaCl を含む SGC 培地で培養した。

金属結合タンパク質 ZP 遺伝子は、海洋性好塩性菌 *Chromohalobacter salexigens* より分離し、pET15b 発現ベクター (Novagen) にクローニングして、大腸菌 BL21(DE3)株で大量発現させた。

2. 2 α -アミラーゼの活性測定

α -アミラーゼの活性測定は、以前報告した方法⁽²⁾に従い、合成基質 Gal-Glu₅-*p*-nitrophenol の分解によって生ずる *p*-nitrophenol の発色を 405 nm の吸光度の増加で測定した。

2. 3 有機溶媒存在下での α -アミラーゼの安定性の測定

水とほとんど混和しない有機溶媒（クロロフォルム、トルエン、キシレン）を α -アミラーゼが分泌された培養上清（1 M NaCl を含む Nutrient Broth）に 20%濃度で添加し、20°C でインキュベーションして、 α -アミラーゼの活性を測定した。また、1 M NaCl, 4 mM CaCl₂, 40 mM Tris-HCl バッファー(pH7.2)に調整した α -アミラーゼの精製サンプルに、20, 30, 50%のクロロフォルムを添加し、20°C で 1 時間インキュベーションした後の α -アミラーゼの活性を測定した。

水と混和する有機溶媒（メタノール、エタノール、アセトン、ジメチルスルフォキシド）を、30%および 50%濃度で添加し、27°C で 1 時間インキュベーションしたのち、活性を測定した。さらに、上記有機溶媒のうちメタノールの影響について、時間変化および NaCl の添加効果を検討した。

2. 4 ZP タンパク質や好塩性菌菌体の重金属結合活性の測定

大腸菌で大量発現させた ZP タンパク質を定法どおり Ni-NTA カラムで精製した。重金属結合能の測定は、キレートカラム (GE Healthcare) に Ni, Zn などの重金属をロードし、余分な重金属イオンを洗浄後、精製 ZP タンパク質を流してその結合量を評価した。すなわち、結合した ZP タンパク質をキレートカラムからイミダゾールで溶出する際のイミダゾールの溶出濃度で評価した。菌体への重金属の結合は、グルタルアルデヒドで固定した菌体への Ni イオンの結合量を定量比較した。

3. 結果・考察

3. 1. 好塩性 α -アミラーゼの有機溶媒耐性

3. 1. 1. 好塩性菌を用いた α -アミラーゼの分泌生産と精製

1 M の NaCl と 1%のデンプンを含んだ SGC 培地に植菌後、30°C で 3 日間培養し、培

養上清を集めた。この培養上清を α -アミラーゼの粗酵素として用いた。精製は、培養上清を蒸留水で2倍に希釈し、終濃度5 mMのCaCl₂を添加後、50 mM Tris-HCl buffer (pH7.2)で平衡化したデキストリンカラムにかけた。カラムを平衡化バッファーで洗浄後、0.1 M マルトースでデキストリンカラムに吸着した α -アミラーゼを溶出した。精製した α -アミラーゼの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (SDS-PAGE) を Fig. 1 に示したが、 α -アミラーゼが均一に精製されていることが分った。 α -アミラーゼのタンパク量と酵素活性から、精製された α -アミラーゼの比活性は~160 U/mg タンパク質と計算された。1 unit (U)は、1分間に 1 μ mole の p-nitrophenol を生成する酵素活性と定義した。

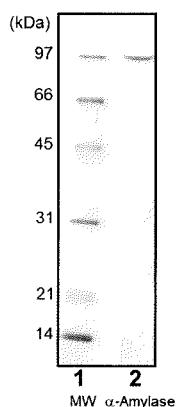


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of purified α -amylase.

Lane 1, molecular weight marker; lane 2, α -amylase purified.

3. 1. 2. 水と混和しない有機溶媒の添加効果

培養上清 (1 M NaCl を含む Nutrient Broth) にクロロフォルム、トルエン、キシレンをそれぞれ 20%濃度で添加し、20 °C で 22 時間インキュベーションして、 α -アミラーゼの活性を測定したところ、すべての条件で、無添加のコントロールサンプルと変わりがなかった (Table 1)。また、精製 α -アミラーゼサンプルにクロロフォルムを 20, 30, 50% 濃度添加し、20 °C で 1 時間インキュベーションして、 α -アミラーゼの活性を測定したところ、同様に無添加のコントロールサンプルと変化が無かった。これらの結果より、本好塩性 α -アミラーゼは、クロロフルアルムを始め、キシレン、トルエンなど水と混和しない非極性の有機溶媒に極めて高い耐性を示すことが明らかになった。

好塩性酵素のアミノ酸組成は、酸性アミノ酸含量が非常に高く、一方、疎水性アミノ酸含量が少ないことが良く知られており、このため好塩性酵素は、多量のマイナス荷電によってタンパク質表面が覆われている⁽³⁾。疎水性が強い非極性の有機溶媒と好塩性酵素との相互作用は、有機溶媒と通常のタンパク質との相互作用に比較して弱いと考えられる。つまり有機溶媒の高い疎水性と好塩性酵素の多量のマイナス荷電による高い親水性

に起因する「疎水性—親水性の反発=高いエネルギー障壁」が生ずると考えられるためである。このためタンパク質を変性させる要因となる有機溶媒のタンパク質の疎水領域への侵入と結合が弱められ、好塩性酵素は比較的安定に保たれている可能性が高いと解釈できた。

Table 1. α -Amylase activity incubated with water-immiscible solvents.

Organic solvents	α -Amylase activity (%)
Control	100
Chloroform	100
Toluene	100
Xylene	98

One ml of organic solvent was added to 4 ml of culture supernatant in 15 ml Falcon tube and the tube was shaken horizontally at 100 rpm at 20 °C for 22 hr.

3. 1. 3. 水と混和する有機溶媒の添加効果

好塩性 α -アミラーゼに対する水と混和する極性有機溶媒の添加効果を調べた。終濃度 0.5 M NaCl と 5 mM CaCl₂ を含む α -アミラーゼ溶液に、終濃度 30% もしくは 50% のメタノール、エタノール、アセトン、ジメチルスルフォキシドをそれぞれ添加し、27 °C で 1 時間インキュベーションした。1 時間後の α -アミラーゼの残存活性を測定した結果を Table 2 に示した。30% の有機溶媒を添加しても、酵素活性には大きな影響はなく、メタノール、ジメチルスルフォキシドでは、やや活性を促進した。この理由は不明であるが、再現性のある結果であった。一方、有機溶媒濃度を 50% に上げた場合には、全ての溶媒で多かれ少なかれ活性低下効果が見られた。アセトンでは 55% 程度、ジメチルスルフォキシドで 40% 程度の活性の低下がみられ、エタノールでも 25% 程度の活性低下が観察された。メタノールには最も耐性で、7% 程度の活性低下にとどまっていた。このように本好塩性 α -アミラーゼは、非極性の有機溶媒に対してだけでなく極性の有機溶媒の添加に対しても 30% まで高い耐性を示した。メタノールの場合には、50% の添加においても 90% 以上の活性を保持していた。

一般に水溶性タンパク質は、その表面に水分子(水和水)を結合して水和殻(Hydration shell)を形成し、水溶液中での安定性を保っている。アルコールなどの極性溶媒は、この水和水をタンパク質表面から剥ぎ取ってタンパク質を不安定化すると言われている。好塩性酵素は、前述のようにタンパク質表面に大量のマイナス荷電を持っているので、通常タンパク質に比べて、多くの水分子を結合していることが分っている⁽³⁾。多くの水和水を保持していることで、好塩性酵素は、アルコールなどの極性有機溶媒にも比較的高い安定性を示すものと考えられる。

Table 2. Stability of α -amylase in the presence of water-miscible solvents.

Organic solvent (Solvent concentration)	α -Amylase activity (%)	
	30%	50%
Control	100	100
Methanol	113	93
Ethanol	103	76
Acetone	99	46
Dimethyl sulfoxide	107	63

Several water-miscible organic solvents at concentrations of 30 and 50% were added to NhAmy in 25 mM Tris-HCl buffer, pH7.2, 0.5 M NaCl and 5 mM CaCl₂. After incubation at 27 °C for 1hr, residual activity was measured.

3. 1. 4. メタノール添加時における好塩性 α -アミラーゼの安定性に対する NaCl の効果と残存活性の時間変化

終濃度 10, 30, 50%のメタノール添加時における好塩性 α -アミラーゼ残存活性の時間変化を Fig. 2 に示した。好塩性酵素は、通常酵素に比べて高い塩濃度下で機能するだけでなく、塩の添加により安定化されるという性質を持っている。 α -アミラーゼの安定性に対する NaCl の効果を検討するため、0.5 M NaCl の共存・非共存の両条件でメタノールを添加した。0.5 M NaCl を添加した場合には、メタノール 10%と 30%添加では、10-15%程度の活性の促進が見られた。50%メタノール添加では、30 分後に約 30%の活性低下が、また 1 時間後には約 45%の活性低下が認められた。一方、NaCl 無添加の場合には、1 時間後に 10%メタノール添加で約 20%、30%添加で約 50%、また 50%添加では約 90%の活性低下が見られた。30%、50%のメタノール添加時には、0.5 時間ですでに活性低下が見られ、NaCl 非共存下では、添加後短い時間でメタノールの影響を受けて構造変化が起こり活性低下につながるものと考えられた。なおメタノール無添加のコントロール実験では、 α -アミラーゼ活性に変化はなかった。以上のように、メタノール添加時においても本好塩性酵素に対する NaCl の安定化効果が認められた。なお Table 2 の結果と Fig. 2 の結果を比較すると、50%のメタノールを添加した場合、その残存活性に約 40%の違い(93% vs 55%)が認められたことになる。Table 2 の場合は 5 mM の Ca⁺⁺イオンを添加しているのに対し、Fig. 2 の場合には、NaCl の安定化効果を明快に見るために、Ca⁺⁺イオンを添加していないことがその原因と考えられる。一般的に α -アミラーゼが Ca⁺⁺イオンによって安定化されることは良く知られており、好塩性 α -アミラーゼは、Ca⁺⁺イオンと NaCl の両者によって安定化されることが分った。

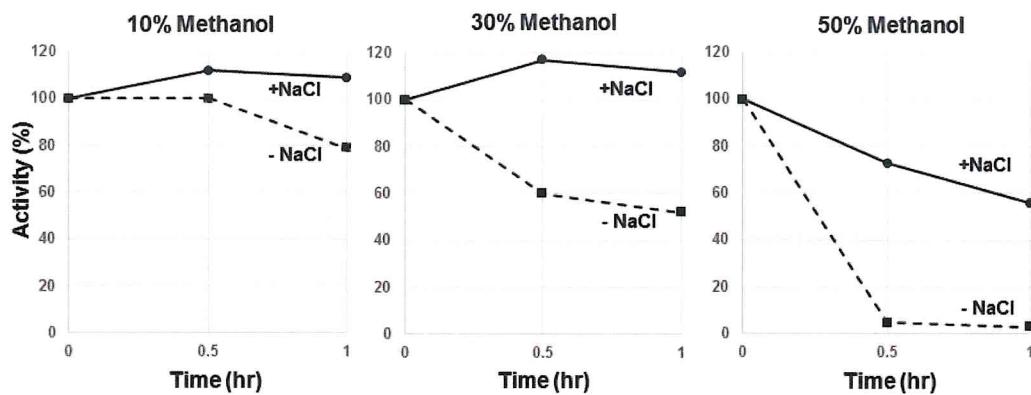


Fig. 2. Time course of α -amylase stability in the addition of methanol.

Fifty μ l of α -amylase in 50 mM Tris-HCl, pH7.2, with or without 1 M NaCl was mixed with 50 μ l of 20, 60 and 100% methanol and incubated for 1 hr at 27 °C.

3. 1. 5. 各種界面活性剤の添加効果

有機溶媒と同様に水溶性タンパク質の変性剤として働く界面活性剤の添加効果を 1 M NaCl 存在下で検討した。Table 3 に示した各種界面活性剤を 2 % および 4.5 % の終濃度になるように加え、37 °C で 1 時間インキュベーションしたのち、残存活性を測定した。Sodium dodecyl sulfate と *N*-Lauroyl sarcosinate は、陰イオン性界面活性剤、Cetyltrimethylammonium bromide は、陽イオン性界面活性剤、Triton X-100 と *n*-Dodecyl β -D-maltoside は、非イオン性の界面活性剤である。Table 3 に示したようにいずれの界面活性剤の添加もほとんど α -アミラーゼ活性に影響せず、本 α -アミラーゼは、各種界面活性剤に高い耐性を示した。特に、最も強いタンパク質変性剤の一つである Sodium dodecyl sulfate に対しても完全な耐性を示したことは大変興味深い。

Table 3. α -Amylase activity in the presence of several detergents.

Detergent (Concentration)	Residual activity (%)	
	2 %	4.5 %
Control	100	100
Sodium dodecyl sulfate	98	102
<i>N</i> -Lauroyl sarcosinate	99	98
Cetyltrimethylammonium bromide	103	100
Triton X-100	102	102
<i>n</i> -Dodecyl β -D-maltoside	104	104

3. 2. 好塩性タンパク質・好塩性菌の環境浄化への応用

当研究室では、以前から好塩性菌の重金属耐性に関する研究の歴史があり、最近、好塩性菌ペリプラズムに局在する「重金属結合タンパク質 (*Histidine-rich metal binding protein* (略して HP))」を見つけこれを集中的に研究してきた⁽⁴⁾。具体的には、大量発現させた HP 精製タンパク質を用いて、Ni, Zn, Cu などの重金属がこのタンパク質に高い効率で結合することを明らかにしてきた。さらに、例えばタンパク質固定化カラムを作成して、自然界に放出された重金属を回収して環境浄化に資するとともに、鉱物資源に乏しい我が国において、回収した重金属を有用資源として有効活用することをめざして研究している。

3. 2. 1. 好塩性菌の重金属結合能

我々は、好塩性菌が高濃度の NaCl や KCl などの塩イオンに対してだけでなく重金属イオンに対しても耐性を示すという結果を観察してきた。そこで中度好塩性細菌や高度好塩性古細菌 (Archaea) を用いて、重金属結合量を定量比較することを試みた。中度好塩性細菌（グラム陰性菌と陽性菌の 2 種）、高度好塩性古細菌、および通常細菌の菌体をグルタルアルデヒドで固定し、Ni を添加して、その結合量を定量した。

Chromohalobacter はグラム陰性の中度好塩性細菌、*Nesterenkonia* はグラム陽性の中度好塩性細菌、*Halobacterium* は高度好塩性古細菌、そして *Escherichia coli* は通常細菌であり、660 nm の濁度が 6.8 になるように調製した各菌体懸濁液 1 ml を用いた。

Table 4 に示したように、通常細菌が約 30 µg の Ni イオンを結合したのに比べ、グラム陰性の中度好塩性細菌はその約 2.6 倍、グラム陽性の中度好塩性細菌はその 3 倍の Ni イオンを結合した。また、最も好塩性が高い高度好塩性古細菌では、通常細菌の約 2 倍の Ni を結合した。ここでは高度好塩性古細菌が中度好塩性細菌に比べて結合量が低い結果となっているが、これは高度好塩性古細菌の菌体構造が特殊なため実験操作中に菌体が壊れている可能性が高く、今後さらに処理条件を検討する必要がある。いずれにしても好塩性菌は大腸菌に比べてはるかに高い Ni 結合力を示した。

Table 4. Metal binding to halophilic microbial cells.

Strain	Bacteria (Gram stain)/Archaea	Ni (µg) bound to cells
<i>Chromohalobacter</i> sp.	Moderate halophile (Gram -)	84
<i>Nesterenkonia</i> sp.	Moderate halophile (Gram +)	96
<i>Halobacterium</i> sp.	Extreme halophile (Archaea)	60
<i>Escherichia coli</i>	Non-halophile (Gram -)	32

Cells were fixed with 1% glutaraldehyde, and washed with and suspended in distilled water.

3. 2. 2. 中度好塩菌由来の新規重金属結合タンパク質 ZP の構造

中度好塩菌 *Chromohalobacter salexigens* のゲノム情報を用いて、すでに報告した同菌株由来の重金属結合タンパク質 HP⁽⁴⁾と相同性の高いタンパク質を検索したところ、アミノ酸配列の 27.6%が一致し、また全体のアミノ酸配列が高い相同性 (75.7%) を示す 334 アミノ酸残基 (分泌シグナルが切断された成熟体は 309 アミノ酸残基) からなる ZP タンパク質を見つけることができた。このタンパク質は他の金属結合性タンパク質との相同性から考えて Zn 結合性タンパク質 (*Zn binding protein*) と考えられた。HP タンパク質と ZP タンパク質のアミノ酸配列のアライメントを Fig. 3 に示した。

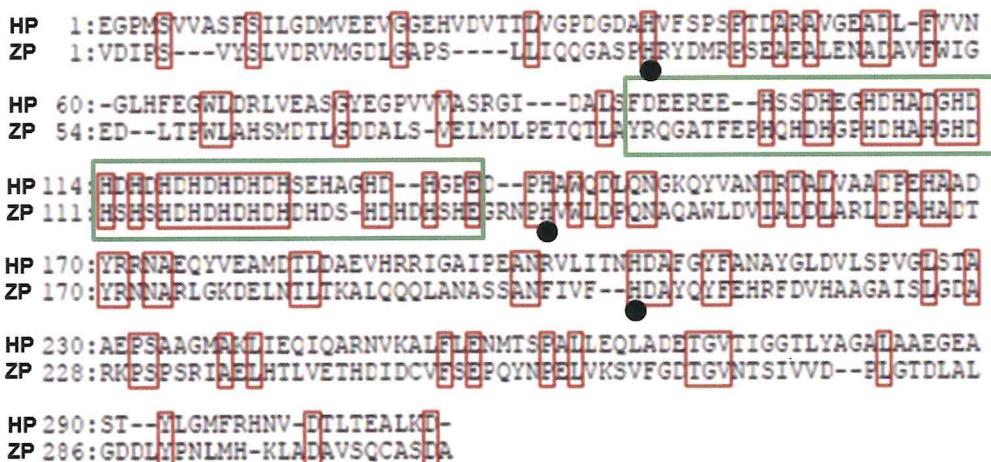


Fig. 3. Amino acid sequence alignment of HP and ZP proteins.

Same amino acid sequence was boxed with red color. Putative metal binding pocket was shown with dot. His-rich insertion sequence was boxed with green color.

この ZP タンパク質は、上述のように *Treponema pallidum* 由来の TroA タンパク質⁽⁵⁾ や大腸菌由来の亜鉛輸送系タンパク質 ZnuA タンパク質⁽⁶⁾と高い相同性を示すことが判明した。TroA タンパク質に比べてより ZP タンパク質に対して相同性が高い大腸菌由来 ZnuA タンパク質と ZP タンパク質の配列を比較した (Fig. 4)。アミノ酸配列の 26.6%が一致し、また全体のアミノ酸配列が 67.9%という高い相同性を示した。

この ZnuA 亜鉛輸送系タンパク質は、X線結晶解析による構造が報告されている⁽⁶⁾ので、これを元に ZP タンパク質の構造モデリングを試み、Fig. 5 に示したような結果を得た。モデリングで得られた ZP の全体構造 (Fig. 5 右) は、一部分を除いて極めて良く ZnuA の全体構造 (Fig. 5 左) に似ていた。全体構造の中で明快に異なる部分は、ZP タンパク質からループ状に飛び出した β -シート構造部分である (右図 HX 繰り返し

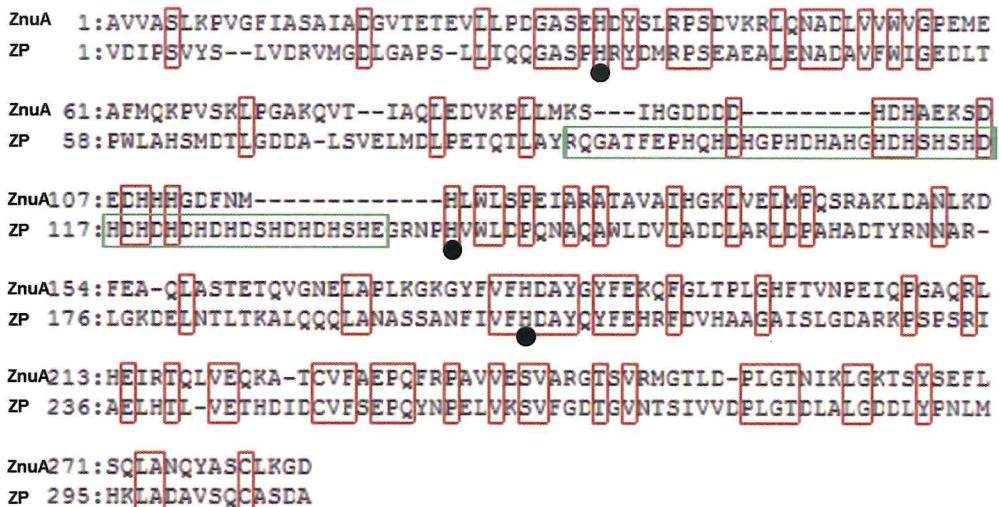


Fig. 4. Amino acid sequence alignment of ZnuA and ZP proteins.

Same amino acid sequence was boxed with red color. Putative metal binding pocket was shown with dot. His-rich insertion sequence of ZP was boxed with green color.

配列により形成された HX ループ構造)。この部分は、Fig. 3 に示した HP と ZP のアランメントにおいて、緑色の BOX で囲った部分であり、ZP タンパク質においては 49 残基のアミノ酸から成る配列である (Fig. 3, green box)。49 残基のうちその 39%が His 残基であり、また 27%が酸性アミノ酸残基からなる極めて特殊な配列であり、この特徴的な配列は TroA タンパク質や ZnuA タンパク質などの進化的に良く保存してきた金属結合タンパク質の骨格配列に入り込んだ挿入配列と考えられた。

すでに報告した HP タンパク質や上記の ZP タンパク質の構造的特徴から考えて、ZP タンパク質は、HP タンパク質同様に 3 個の His 残基による金属結合ポケットと His 残基に富んだ挿入配列の両者で金属イオンを結合するものと予測できた。

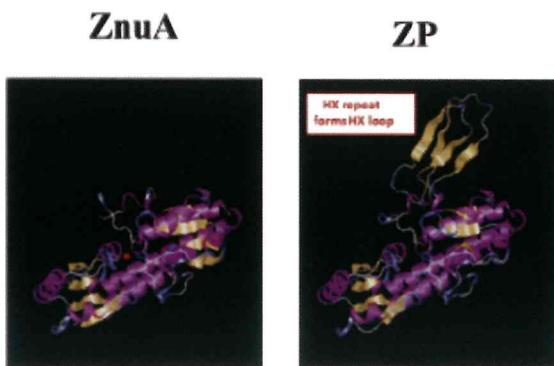


Fig. 5. Modeling of ZP based on the ZnuA crystallographic structure (2PRS).

3. 2. 3. 中度好塩性細菌由来の新規重金属結合タンパク質 ZP の発現

そこで、菌体 DNA から PCR で ZP 遺伝子を增幅し、大腸菌発現ベクター pET15b プラスミドにクローニングし、BL21(DE3)株を用いて定法どおり大量発現させ、その結果を Fig. 6 に示した。

大腸菌の可溶性画分に His-ZP タンパク質が大量に発現された (Fig. 6, lane 1 and 2, dot)。また、→で示したように少し短い His-ZP タンパク質の分解物も少量検出された (Fig. 6, lane 1 and 2, arrow)。

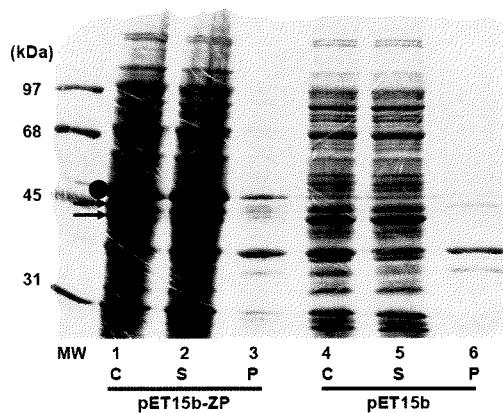


Fig. 6. Expression of His-tag-ZP

SDS-PAGE of crude homogenate (C), soluble (S) and pellet (P) fractions of *E. coli* harboring pET15b-ZP and pET15b. His-tag-ZP and truncated forms expressed were shown with dot and arrows.

3. 2. 4. 重金属結合タンパク質 ZP の精製と金属結合能

粗抽出液 (Fig. 6, lane 1) を Ni-NTA アフィニティカラムに掛け His-ZP タンパク質を精製した。精製 His-ZP タンパク質の SDS-PAGE を Fig. 7, lane 1 に示した。His-ZP タンパク質バンドと少量の分解物バンドが検出された。精製に成功したので、これら 3 本のバンドに相当するタンパク質の分子量を質量分析計を用いて測定した。それぞれ大きいほうから、36286 Da, 33759 Da, 31476 Da と計測され、正しく発現されたもの (dot) と、それぞれ 25 アミノ酸残基、48 アミノ酸残基が切り離された部分分解物 (arrows) であることが分った。

ZP タンパク質の金属結合活性を評価するために、スロンビン消化により His-tag を切断除去した ZP タンパク質を調製した (Fig. 7, lane 2, dot)。この図に示したように、SDS-PAGE 上の移動度が大きくなつたことから、His-tag が除去されたことが示された。

また、→で示したように、依然として分子量の小さい分解物も混在していた。

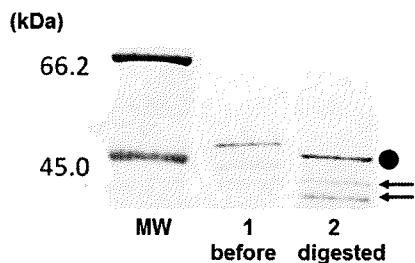


Fig. 7. Thrombin-digestion of His-tag-ZP to prepare ZP.

次に、ZP タンパク質が Ni 結合能を持っているかを検討するために、ZP タンパク質を Ni-NTA カラムに掛け、カラムを洗浄後イミダゾールで溶出した。Fig. 8 にその結果を示した。ZP タンパク質は、非吸着画分や洗浄画分には認められず、主に 50-100 mM のイミダゾールで溶出された (Fig. 8, lane 3-4, dot)。ZP タンパク質の分解物も同様に Ni カラムに吸着した。そこでキレートカラムを用いて、Cu, Zn, Mn, Co そして Ni に対する結合力を測定したところいずれも結合力を示し、100 mM 程度のイミダゾールで溶出された。以前に報告した重金属結合タンパク質 HP は、Mn に結合能を示さず、この Mn への結合力は ZP の方が高いことが分った。

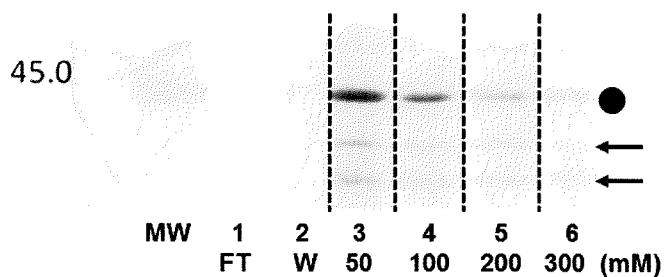


Fig. 8. SDS-PAGE profile of ZP eluted from Ni-NTA column.

Purified ZP (dot) and its small derivatives (arrows) bound to Ni column was eluted with 50-100 mM imidazole.

3. 2. 5. 重金属結合タンパク質 ZP の挿入配列が持つ His-X 繰り返し配列に富んだ領域の重金属結合能

既報の重金属結合タンパク質 TroA は、3 個のヒスチジン残基を含む金属結合ポケットに 1 個の重金属イオンを結合する。これに対して、今回の ZP タンパク質は、この金属結合ポケットに加えて、49 アミノ酸残基からなる特徴的な挿入配列を持っている

(Figs. 3, 4 and 5)。この配列は、多量のヒスチジン残基を含み、その構造から見て、この領域に重金属が結合することが予測された(Fig. 3, 4 and 9)。Fig. 9-1 にこの 49 アミノ酸残基からなる挿入配列のうち His-X の繰り返し配列に富んだ 40 アミノ酸残基からなる領域を示した。この領域の 95%が His-X の繰り返し配列からなるという極めて特徴的な配列である。この領域の重金属結合能を調べる目的で、前半の 20 残基の領域（アンダーラインで示した）と後半の残り 20 残基の領域をそれぞれオリゴペプチドの化学合成を行い、PepA21 (Fig. 9-2) と PepB20 (Fig. 9-3)とした。PepB20 については、少しその配列を修飾した。すなわち、その安定性を考慮して、N-末端に Gly-Ser-Ser の 3 残基を付加し、それに続けて 8 個の His-Asp 配列を配置した。いずれのペプチドにもその C-末端に 1 個のトリプトファン残基を付加し、280nm の吸収によるこれらペプチドの検出を可能にした。

1: His-rich region (40 out of 48 amino acid residues) of ZP insertion sequence

HQHDHGPHDH AHGHDHSHSH
DHDHDHDHDH DSHDHDHSHE

2: Synthetic HX peptide, PepA21

HQHDHGPHDHAHGHDHSHSHW

3: Synthetic HX peptide, PepB20

GSSHHDHDHDHDHDHDHDHDHW

Fig. 9. His-rich region of ZP insertion sequence and chemically synthesized oligo-peptides.

これらのペプチドを金属イオンを結合させたキレートカラムに掛け、金属イオンへの結合能を評価した。あらかじめ Zn を結合させたキレートカラムに、PepA21 ペプチドの 50 mM リン酸バッファー(pH7.4)溶液を流し、イミダゾールの濃度を段階的に高めて溶出してその結合能を評価した。その結果、280nm の吸光度と Tricine-SDS-PAGE の結果より、PepA21 ペプチドは Zn カラムに結合し、50 mM のイミダゾールで溶出され、Zn への明らかな結合力を示した。同様の実験で、本ペプチドは、Ni や Co にも結合力を示したが、一方、Mn には結合能を示さなかった。次に、PepB20 を Ni-NTA カラムに掛け、イミダゾールによる段階的溶出を試み、重金属結合能を評価した。PepB20 ペプチドは、Ni-NTA カラムに結合し 100 mM のイミダゾール濃度でカラムから溶出され、Ni への明らかな結合能を示した。また金属を結合させたキレートカラムを用いて、Co, Zn にも結合能を持つことが明らかになった。PepB20 ペプチドについても PepA21 ペプチドと同様、Mn には結合能を示さなかった。これらの結果から、ZP タンパク質が持つ Mn 結合力は、挿入配列ではなく、金属結合ポケットの結合能によるものであることが示唆

された。PepB20 ペプチドについての金属結合能をさらに詳しく検討する目的で、Ni もしくは Zn 存在下での円二色性測定を行い二次構造に関する情報を得ようとした。金属イオン濃度に依存した測定値の変化傾向が認められたが、一義的な考察を導き出せるような詳しい解析は時間的な関係で行えず、今後さらに時間を掛けて検討する予定にしている。最後に、前述の固定化菌体やこれらペプチドをカラムクロマト用の樹脂に架橋結合・固定化することやカラム支持体を用いる方法など効率の良い重金属回収法の確立をめざした予備的実験も実施した。現状では、樹脂への架橋結合・固定化については、未だその効率が低く今後改善が必要であるが、支持体を用いたカラムは効率よく機能するという結果を得ている。

4. 結論と今後の課題

本研究において、好塩性 α -アミラーゼが、様々な極性・非極性の有機溶媒に強い耐性を示すことが明らかになり、その産業利用が期待される。さらに、環境浄化と回収重金属の資源化への好塩性菌と好塩性タンパク質の利用が有望であることを明らかにすることができた。

なお、当初の研究計画では、好塩性 α -アミラーゼに加えて、好塩性の β -ラクタマーゼについても有機溶媒に対する安定性を検討する予定であったが、時間の関係で多くの結果を出すには至らなかった。予備的な実験は実施したが、塩存在下における有機溶媒など変性剤に対する安定性の検討は今後の課題であり、引き続き時間をかけて検討する予定である。また、好塩菌由来の重金属結合タンパク質に関しては、すでに報告した HP のみならず、ZP タンパク質においても、通常生物の同属体タンパク質がもつ金属結合ポケットに加えて、ヒスチジン残基を大量に含んだ特殊な挿入配列が広範な重金属に結合能をもつことが明らかになった。これらの挿入配列は好塩性菌に見られる特徴であり、重金属の回収による環境浄化と、回収した重金属の資源としての再利用に向け、さらに実用化研究を継続して推進する予定である。

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、公益財団法人サンケイ科学振興財団より研究助成をいただきました。本研究を実施できましたのは、この貴重なご援助の賜物であり心から感謝申し上げます。また、本研究内容の一部を日本海水学会誌に発表できました⁽⁷⁾。合わせてお礼申し上げます。

6. 引用文献

- (1) H. Onishi and K. Sonoda, “Purification and Some Properties of an Extracellular Amylase from a Moderate Halophile, *Micrococcus halobius*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 616-620 (1979)
- (2) R. Yamaguchi, H. Tokunaga, M. Ishibashi, T. Arakawa and M. Tokunaga, “Salt-dependent thermo-reversible α -amylase: cloning and characterization of α -amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 673-684 (2011)
- (3) M. Mevarech, F. Frolov, and L.M. Gloss, “Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt”, *Biophys. Chem.*, **86**, 155-164 (2000)
- (4) R. Yamaguchi, T. Arakawa, H. Tokunaga, M. Ishibashi and M. Tokunaga, “Halophilic properties of metal binding protein characterized by high histidine content from *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043”, *Protein J.*, **31**, 175-183 (2012)
- (5) Y. Lee, R. Deka, M. Norgard, J. Radolf and C. Hasemann, “*Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone”, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 628-633 (1999)
- (6) L.A. Yatsunyk, J.A. Easton, L.R. Kim, S.A. Sugarbaker, B. Bennett, R.M. Breece, I.I. Vorontsov , D.L. Tierney, M.W. Crowder, and A.C. Rosenzweig, “Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 271-288 (2008)
- (7) M. Tokunaga, H. Tokunaga, M. Ishibashi and T. Arakawa, “Detergent-tolerant halophilic α -amylase isolated from a moderate halophile *Nesterenkonia halobia*”, *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, (2017) in press

Industrial applications of halophiles and halophilic proteins: distinct tolerance to organic solvents and development of bioremediation

Masao Tokunaga

Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

e-Mail: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

Halophiles and halophilic enzymes exhibit distinct advantageous characteristics for industrial applications. We purified halophilic α -amylase from a halophilic bacterium *Nesterenkonia halobia* and studied its tolerance to organic solvents. Halophilic α -amylase showed high tolerance to not only water immiscible organic solvents, such as chloroform at 50 % addition, but also water-miscible solvents up to 30 % concentration. The addition of water miscible solvents at a final concentration of 50 % inactivated α -amylase activity by 10-50 %. It is conceivable that the remarkable organic solvent-resistant characteristics of halophilic enzymes must be related to the highly charged protein surface and less hydrophobicity of halophilic enzymes. We further found a metal-binding protein ZP from moderate halophile *Chromohalobacter salexigens*, expressed it in *Escherichia coli*, and purified. ZP was found to bind several metal ions, such as Ni, Zn and Co, and to be hopeful for application.