

新規低温活性抗菌タンパク質の応用利用に向けた基礎研究

相沢 智康 [北海道大学大学院理学研究科/助手]

背景・目的

最近、我々のグループは昆虫由来リゾチームとして世界で初めてカイコ由来リゾチームの立体構造解析に成功し、哺乳動物由来のものには見られない低温活性などの特徴があることを明らかにした。興味深い事に、昆虫由来のリゾチームは、従来知られている脊椎動物由来のリゾチームよりも広い抗菌活性スペクトラムを有することも報告されている。そこでカイコ由来リゾチームに関してその構造や機能に関する研究を進め、すでに広く医薬、食品添加物として利用されているニワトリ卵白リゾチームとの差異や、応用利用への可能性を探るほか、他の低温活性酵素探索の基盤作りを目指す。

内容・方法

カイコ由来リゾチームの立体構造や機能に関する研究を展開する上で最も重要な課題である、遺伝子組換えによる試料調整法の改良を中心に、得られた試料を用いて活性や安定性に関する研究を展開した。

まず、遺伝子組換えリゾチームの試料調整法として、宿主として大腸菌を用い、菌体内部にインクルージョンボディ（不溶性顆粒・封入体）として発現した試料のリフォールディングによる調整法と、メタノール資化酵母を用いて、菌体外に活性を有した状態での分泌型で発現する方法の二種類について、詳細に条件検討を行い、発現効率の向上を目指した。また、得られた試料について、CD法、NMR法による解析、及び、X線結晶構造解析を進め、立体構造や熱力学的安定性と活性について解析を進めた。特に、遺伝子組換え試料を用いることで、アミノ酸に変異を導入し、その安定性、立体構造の変化、及びその変化が発現効率に与える影響についても研究を展開した。

結果・成果

大腸菌を宿主として利用し、ペリプラズム空間へ分泌を行う形での発現系は、リゾチームの持つ溶菌活性が大腸菌に対して致命的であり、分泌シグナルを付加した形での発現は不可能であった。よって、菌体内に不活性なインクルージョンボディとして蓄積したリゾチーム分子を変性剤により変性し、その後、巻き戻し法について検討を進めた。その結果、野生型には存在しないN末端へのメチオニンの付加が、N状態での安定性を低下させ、リフォールディングの効率を悪くする可能性が示唆された。特に、野生型ですでに熱安定性が低いカイコ由来リゾ

チームにおいては、この安定性の低下が収率を悪くする。この結果は、N状態での安定性を高める条件においてリフォールディングの効率が高くなることから支持された。また、大腸菌を用いた発現系で、最少培地を用いた培養を行うことで、運動性の解析などに有用な、安定同位体ラベル試料を調整する事に成功した。

酵母を宿主として利用した発現系では、分泌過程において天然型の立体構造の形成が進み、ジスルフィド結合を有する活性型で分泌されることが利点であるが、発現量が比較的低いという問題点があった。この問題点に対する改良を進め、分泌シグナルの改良と、分泌過程で誤って糖鎖が付加される配列への変異導入で、生産効率が高まることを見出した。構造解析の結果、糖鎖付加サイトに変異を導入した変異体においても、ほぼ天然型と同等の立体構造を有することを明らかにした。よって、この発現量の改善に成功した変異型リゾチームを利用することで、解析に大量な試料を必要とする実験をより効率的に進めることが期待できるようになった。

各種発現法の改良の結果得られた試料を用い、活性や熱安定性に関する他種のリゾチームとの詳細な比較を進めた。その結果、ニワトリ卵白リゾチームと比較して、強い溶菌活性を有すること、逆に単純基質に対する分解の活性は弱いことが明らかになった。溶菌活性の強さは、カイコ由来リゾチームの電荷の分布が、また基質分解の活性の弱さは、立体構造解析の結果から、基質結合部位に対する糖鎖結合様式がニワトリ卵白リゾチームと異なっていることに起因すると推定される。また、活性の温度依存性がカイコ由来リゾチームでは大きく低温側にシフトしていることと関連し、揺らぎを大きくし、活性化エネルギーを低下させていると考えられる立体構造上のいくつかの特徴が見られた。また、タンパク質の機能発現やフォールディング研究の重要なターゲットとなっている平衡論的安定中間体は、従来、カルシウム結合リゾチームにのみ検出されていたが、カイコ由来リゾチームでも酸性条件下での化学変性で3状態モデルに従った変性挙動を示すことが明らかになった。

今後の展望

カイコ由来リゾチームの大腸菌及び酵母を利用した大量発現法の改良に成功し、発現効率を上げることが可能になったことで、カイコ由来リゾチームの低温活性発現機構について、大量の試料を必要とする様々な物理化学的解析の展開に大きく寄与することが期待できる。特に、立体構造解析の結果を元に、機能について検証することが可能な点から研究の進展が期待できる。変異導入などにより、立体構造と低温活性発現機構の相関を検証することで、産業利用などが期待されながらも、未知の点が多く残された低温酵素に関する研究の前進に大きく貢献すると期待できる。