

Streptomyces hygroscopicus 由来ハイグロマイシンリン酸化酵素の耐熱化と酵素学的解析
**Directed evolution for thermostabilization of hygromycin B phosphotransferase from
Streptomyces hygroscopicus and its enzymatic analysis**

杉本直久、高倉康彰、星野貴行、中村顕

Naohisa Sugimoto, Yasuaki Takakura, Takayuki Hoshino, Akira Nakamura

(筑波大学生命環境科学研究科)

(Grad. School of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

e-mail: a-nak@agbi.tsukuba.ac.jp

我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株の宿主・ベクター系の改良を行っているが、*T. thermophilus* では利用可能な選択マーカー遺伝子が少ないことが大きな障害となっている。通常選択マーカーとして用いられる抗生物質耐性遺伝子は常温菌由来であるので、コードする酵素は耐熱性が低く、*T. thermophilus* では利用できない。我々はこの問題を解決するため、*in vivo* directed evolution の手法を用いて、大腸菌由来ハイグロマイシンリン酸化酵素(HPH)の耐熱化変異体の取得を行い、5 アミノ酸置換変異の導入により *T. thermophilus* で 65°C まで選択マーカーとして利用可能な変異遺伝子(*hph5*)の取得に成功し¹⁾、その酵素学的解析を行った²⁾。同時に、HPH とはほとんど相同性を示さない *S. hygroscopicus* 由来ハイグロマイシンリン酸化酵素(HYG)についても、4 アミノ酸の導入により、*T. thermophilus* で利用可能な選択温度が 68°C まで(HYG では 60°C まで)上昇した HYG4 の取得に成功した。さらに *T. thermophilus* の至適温度付近(70°C)でも機能する選択マーカー遺伝子を開発するために、HYG4 を元に *in vivo* directed evolution による更なる耐熱化を試みた結果、新たに取得したいくつかの耐熱化酸変異を組み合わせることにより、最終的に 7 箇所のアミノ酸置換変異と N 末端側の 3 アミノ酸の重複変異を有する耐熱変異型遺伝子の取得に成功した(HYG10)。この遺伝子は、*T. thermophilus* で 74°C まで機能することが可能である。

大腸菌を宿主として生産したリコンビナント酵素を用いた酵素学的解析の結果、反応至適温度及び熱安定性(T_{half})は、HYG の 45°C、35°C から、HYG10 では 57°C、48°C と、それぞれ 12°C、13°C 上昇していることが観察された。また円二色計を用いて熱変性過程の解析を行ったところ、変性温度(T_m)は HYG の 44.4°C から、HYG10 では 55.2°C に、10.8°C 上昇しており、熱変性時のエンタルピー変化も HYG10 で上昇していた。以上から HYG10 では、タンパク質構造レベルで耐熱性を獲得していることが明らかになった。また、両酵素の基質(ATP、Hygromycin B)に対する kinetic parameter を測定したところ、HYG10 の基質に対する K_m 値は HYG に比べ高いものの、 k_{cat} 値が非常に大きいため k_{cat}/K_m 値は HYG10 の方が大きくなることが示された。すなわち、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 共に大きな値を持つことから、HYG10 は HYG に比べ反応性が上昇していると予想された。そこで、反応速度定数 k_{cat} の温度依存性を測定し、Arrhenius plot を用いて活性化エネルギーを比較したところ、HYG10 は HYG と比較して約 5 kJ/mol 減少していることが明らかになった。

以上のことから HYG10 では、野生型酵素と比較して、耐熱化と同時に、活性化エネルギーの減少に伴う反応性の上昇が起こっていることが明らかとなった。

1) A. Nakamura *et al.*, *J. Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 158-163, 2005.

2) A. Nakamura *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.