

学位論文題名

Studies on Structure and Function
of the Bacterial Monomeric Isocitrate Dehydrogenase
and Regulatory Mechanisms of the Gene Expression(細菌由来の単量体型イソクエン酸脱水素酵素の構造と
機能及び遺伝子発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) は、生物の代謝において重要な役割を果たすクエン酸回路を構成する酵素群の一つであり、イソクエン酸から α -ケトグルタル酸への反応を触媒する。この酵素は、細菌界において二量体型と単量体型の二種類に分類できる。好冷菌 *Colwellia maris* (従来 *Vibrio* sp. strain ABE-1 として記載) には、二量体、単量体型 IDH アイソザイムが存在し、単量体型 IDH (IDH-II) は低温適応型酵素としての特徴を示し、細菌の低温適応に重要な役割を果たしていることが示唆されている。さらに、IDH-II をコードする遺伝子 *icdII* の発現は低温で誘導されることが以前に示された。本研究では、第一章に *icdII* の低温誘導発現にかかわる調節因子と IDH-II の生理的役割についての研究を、第二章に単量体型 IDH の高次構造の解明を目的とした研究結果を記述した。

icdII の非翻訳上流領域のデリーション実験によって、転写開始点から -560~526 に存在する塩基配列を除くと、低温 (15°C) での遺伝子発現量は約 20 倍に増加した。また、-38 の位置に存在する CCAAT 配列を除くと、*icdII* 遺伝子の低温誘導性は完全に消失した。しかし、中温 (37°C) での *icdII* 発現量はこのようなデリーションの影響を全く受けず、常に低レベルに保たれていた。以上の結果により、*icdII* の発現は、低温誘導性プロモーターに支配され、この二つの異なるシス因子が関与していると結論した。この結論は、*icdII* プロモーターと本来低温誘導性ではない二量体型 IDH (IDH-I) 遺伝子 *icdI* ORF との融合遺伝子を用いた実験によって裏づけされた。IDH-II の生理的機能を調べるため、*icdII* あるいは *icdI* を含む様々な遺伝子を大腸菌に導入し、低温での生育速度を比較した結果、IDH-II の発現レベルに比例して生育速度が促進された。好冷菌由来の単一酵素遺伝子の導入によって、低温域での生育速度を促進させた例は、本研究が初めてである。

IDH の高次構造は、大腸菌由来の二量体型 IDH において構造が決定され、触媒反応に関与するアミノ酸残基に至るまで詳細に明らかにされている。しかしながら、IDH-II が属する単量体型 IDH の高次構造は現在のところ全く分かっておらず、また、両アイソザイムのアミノ酸配列には相同性が無いことから、両タイプの酵素の構造と機能及び分子進化を考える上で、単量体型 IDH の高次構造の解明は重要な課題である。そのため、構造解析の最初のステップとして、IDH-II と比べて比較的熱安定性の高い *Azotobacter vinelandii* 由来の酵素を材料に用い、本酵素の精製、遺伝子のクローニング、及び塩基配列の決定を行った。

A. vinelandii IDH 精製標品は、他の単量体型 IDH 同様、分子量約 80 kDa であり、典型的な中温性酵素の熱安定性を示した。また、本酵素遺伝子は、2223 bp のオープンリーディングフレームを持ち、741 アミノ酸残基をコードしていた。得られたアミノ酸配列の N-末端配列は、精製酵素標品より決定されたものと一致しており、本遺伝子が、*A. vinelandii* IDH 遺伝子 (*icd*)

であることを強く示唆する結果となった。さらに、IDH 欠損株である大腸菌 DEK2004 株に本遺伝子を導入したところ、IDH 欠損株が表現型として示すグルタミン酸要求性を消失させることができ、IDH 活性も検出できたことから、本遺伝子が大腸菌内で発現し、かつ生理的な機能を持つことが明らかになった。同時に、本遺伝子の発現機構を解明するため、mRNA 及び蛋白質レベルでの解析を行った。*A. vinelandii* の total RNA を用いたプライマーエクステンション分析において、二種類の大きさの異なる転写産物に相当するシグナルが検出された。一つは、翻訳開始点から 244 bp 上流に位置しており (TS-1)、本転写産物に対するプロモーターがその上流に存在していた。もう一つは、翻訳開始点から 101 bp 上流に位置していたが (TS-2)、この転写産物に対するプロモーターは確認できなかった。さらに、大腸菌 DEK2004 株を宿主として、本遺伝子の 5' 非翻訳領域のデリベーション分析を行ったところ、両転写産物は TS-1 に対するプロモーターによって発現していることが明らかになった。この 5' 非翻訳領域に対してデータベース検索を行ったところ、TS-2 転写産物の 5' 末端が RNase E の認識及び切断部位に相当することが明らかになった。これらのことから、本遺伝子の転写開始点は、TS-1 であり、TS-2 転写産物は RNase E によって部位特異的な切断を受けたものであることが示唆された。さらに興味深いことに、両転写産物の量比は形質転換体大腸菌株を生育させる培地によって変化した。このことから、本遺伝子の発現は、RNase E による mRNA 転写後の修飾によって、主に制御されていることが考えられた。

本遺伝子の塩基配列の決定によって得られたアミノ酸配列を、低温適応型酵素である IDH-II と比較したところ、その温度安定性などの温度特性が大きく異なるにも拘らず、約 66% の高い同一性を示し、さらに相同性は両酵素のアミノ酸配列全域にわたって存在していた。これら両 IDH の温度特性が蛋白質のどの領域に支配されているのか特定するため、両酵素遺伝子を部分的に融合させた遺伝子を構築し、発現させたキメラ酵素を用いて、それぞれの温度特性を詳細に調べた。その結果、C-末端から 185 アミノ酸残基を含む領域が主に両 IDH の熱安定性に大きく関与している結果が得られた。低温適応型酵素と中温性酵素の一部のアミノ酸配列を置換することで熱安定性を変化した例は現在のところ本研究が最初であり、酵素蛋白質の低温適応を考える上で興味深い結果が得られた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 永 典 之
副 査 教 授 落 合 廣
副 査 教 授 米 田 好 文

学 位 論 文 題 名

Studies on Structure and Function of the Bacterial Monomeric Isocitrate Dehydrogenase and Regulatory Mechanisms of the Gene Expression

(細菌由来の単量体型イソクエン酸脱水素酵素の構造と
機能及び遺伝子発現に関する研究)

極地，高山帯，海洋など低温域には多種多様な生物が生息し，低温環境への生物の適応現象がよく知られている．とりわけ外気温の影響を直接受ける植物や微生物においては，低温下で機能しやすい生体物質を構築することが必須と考えられている．しかし，その分子生物学的研究は近年開始されたばかりでほとんど未解明なまま残されている．

本研究は，体制の簡単な細菌をモデル生物に用い，生物の低温適応機構を遺伝子レベル，タンパク質レベルで明らかにすることを目的として行われたものである．申請者は，この目的のため既に低温誘導性遺伝子であることが明らかにされている好冷菌コルウェルリアのイソクエン酸脱水素酵素遺伝子 *icdII* プロモーターの非転写上流部を連続的に欠失させた変異遺伝子を作製し，それぞれの遺伝子からの発現量を比較することで低温誘導性を調べた結果，転写開始点から 526 塩基上流に存在する 35 塩基対の配列と，転写開始点から 38 塩基上流に存在する 5 塩基対の配列が低温誘導性を制御する因子として作用していることを明らかにした．さらに，温度特性の異なる二種類の相同酵素（単量体イソクエン酸脱水素酵素）遺伝子を部分的に入れ替えたキメラ遺伝子を作製し，大腸菌内で発現させたキメラ酵素を得て，それらの温度特性を詳細に調査し，酵素タンパク質の触媒活性，熱安定性などの温度特性がタンパク質のカルボキシル末端領域に大きく依存していることを始めて証明した．

これを要するに，著者は，細菌の低温適応について分子レベルで新知見を得たものであり，生物の温度適応の分子論的解明に貢献するところ大なるものが

ある。よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。