

学 位 論 文 題 名

Analyses of Function, Gene Expression and Structure of the Cold-Adapted Enzymes from Psychrophilic Bacteria

(好冷菌由来の低温適応型酵素の機能、遺伝子発現及び構造に関する解析)

学位論文内容の要旨

温度は生命活動を制約する要因の一つである。特に、低温は細胞に含まれる水の凍結による細胞の物理的な破壊や細胞膜脂質の可塑性の減少に伴う物質輸送能の低下や消失などを引き起こす。一方、恒常的な低温環境下でのみ生育できる細菌である好冷菌の存在が知られており、生物の温度に対する適応機構を解明するためのよい実験材料となりうる。生命活動をつかさどる酵素の反応速度は温度に強く依存し、低温ではその速度が低下する。これらの生物はこれを補うために、常温性酵素に比べて低温でも高い活性を維持している低温適応型酵素を持つことが知られている。これまで、低温適応型酵素の研究はその工業的な応用も考慮してプロテアーゼやリパーゼなどの菌体外酵素を中心に進められてきた。また、これらの酵素遺伝子の発現に及ぼす低温の影響に関してはほとんど明らかにされていなかった。

本研究ではまず最初に、細胞内での主要な代謝経路の1つであるクエン酸回路とその側路であるグリオキシル酸回路の分岐点に位置する鍵酵素のイソクエン酸リアーゼ(ICL)を好冷菌 *Colwellia maris* から単一にまで精製してその性質を調査した。その結果、本酵素が低温適応型酵素であることが明らかとなった。さらにこの遺伝子をクローン化し、その塩基配列を決定した。ノーザンブロットやウエスタンブロット解析や細胞内の酵素活性を測定することによりこの遺伝子の発現に及ぼす温度の影響を調べたところ、この遺伝子は他の生物の同遺伝子と同様に酢酸により発現が誘導されるのに加えて、培養温度の低下によっても誘導されることがわかった。また、プライマー伸長法による mRNA の 5'末端解析の結果、本遺伝子は2箇所の転写開始点とプロモーターを持つことが示唆され、上流のプロモーター配列は大腸菌の ICL 遺伝子のそれと類似していた。一方、下流のプロモーター近傍には大腸菌の低温誘導性遺伝子のプロモーターに共通して見られるシス配列が存在しており、本遺伝子の低温での発現誘導との関連性が予想された。本酵素の予想されるアミノ酸配列を常温性や耐熱性の同酵素と比べると、プロリンやアルギニン含有量の低下、ループ領域の伸長や他の生物の酵素で高い保存性を示す触媒機能や酵素タンパク質の構造維持に重要なアミノ酸残基の置換など低温適応型酵素において既に報告されている特徴を本酵素では多く備えていた。これらの結果や最近明らかにされた細菌や菌類の常温性 ICL の立体構造に基づいて部位特異的の変異体を作製し、その性質を調査した結果、本酵素の低い熱安定性と低温での高い活性に関係するとみられるアミノ酸残基を同定した。一方、好冷菌が持つ酵

素の全てが必ずしも低温適応型ではないことが知られており、近縁な細菌でも同じ酵素が異なる熱安定性を示す場合も見られる。そこで、*C. maris* と近縁な好冷菌である *Colwellia psychrerythraea* から ICL を精製し、その酵素学的性質を調べたところ、本酵素は *C. maris* の ICL と同様に低温適応型酵素の特徴を示し、その遺伝子の発現も低温で誘導されることが示唆された。従って、ICL は細菌の低温適応に重要であり、これは本酵素が代謝上重要な位置を占めていることと関連している可能性が示唆された。

低温適応型酵素は低温で高い活性を示すがその熱安定性は一般的に低い。低温下では分子の拡散速度が減少しエネルギーが不足する状態となるが、それを補うために酵素は効率よく基質と結合して触媒作用をおこなわなければならない。それには酵素タンパク質の速やかな構造変化が必要であり、低い熱安定性はそれを実現するための代償であると考えられてきた。一方、低温で高い活性を維持したまま熱安定性が増加した酵素変異体が遺伝子工学的手法で得られたことが最近報告され、酵素の活性と熱安定性は必ずしも連動していないことが示唆された。低温適応型酵素の低温での活性発現や熱安定性の機構に関する研究には、材料として用いる酵素タンパク質の構造についての情報は必須である。上記の *C. maris* が持つ低温適応型イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) は単量体型で、生物界に広く見られる二量体型 IDH とは分子量、免疫学的交差反応性や一次構造がまったく異なっている。従って、両 IDH の構造比較は酵素タンパク質の進化の面からも興味深い。単量体型 IDH の立体構造はいままで明らかにされていなかったが、本菌の IDH とアミノ酸配列の相同性がタンパク質全体にわたって高い (約 66% の同一性) ことが示されていた窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* の常温性の単量体型 IDH の構造が最近明らかになった。その構造を解析した結果、単量体型と二量体型の IDH の立体構造とリガンドとの結合様式は互いによく類似していた。二量体型 IDH は類似した触媒作用を示すイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素等と共に β -脱炭酸脱水素酵素ファミリーに属することが報告されていた。今回、単量体型 IDH の立体構造や触媒機能に関係するアミノ酸残基の保存性等を検討した結果、単量体型 IDH もこのファミリーに属し、その中で新たなサブファミリーを形成していることを明らかにした。*A. vinelandii* と *C. maris* の単量体型 IDH の活性部位は完全に保存されていたので、両者の異なる熱安定性はタンパク質分子内の構造維持にかかわる相互作用の違いに起因していると思われる。そこで *A. vinelandii* の IDH の立体構造に基づき本酵素をドメインに対応した 3 つの領域に分け、互いの遺伝子の断片を様々に組み合わせて再構成したキメラ IDH 遺伝子を作製し、それを大腸菌内で発現させキメラ酵素を得た。これらの酵素の活性の至適温度、熱処理による失活や酵素タンパク質の構造安定性を調べた結果、*C. maris* の IDH が有する高い可塑性に深く関与する領域は C 末端の部分であることがわかった。この領域では、低温適応型酵素に特徴的なプロリン残基の欠失が他の領域に比べて多く見られた。また *C. maris* IDH では、*A. vinelandii* IDH のこの領域に存在する α -ヘリックスに相当する部分に *A. vinelandii* IDH を含む他の単量体 IDH とは異なったアミノ酸残基が集中して存在しており、そのためこの部分はヘリックス構造をとらないことが予想された。これらの結果は低温適応型酵素タンパク質の可塑性が分子全体に均等に分布しているというよりはむしろ触媒反応の構造変化に必要な領域を中心に局在化しているという考えを支持する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 口 淳 二

副 査 教 授 加 藤 敦 之

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 助 教 授 高 田 泰 弘

学 位 論 文 題 名

Analyses of Function, Gene Expression and Structure of the Cold-Adapted Enzymes from Psychrophilic Bacteria

(好冷菌由来の低温適応型酵素の機能、遺伝子発現及び構造に関する解析)

生命活動をつかさどる酵素の反応速度は温度に強く依存し、低温では低下する。一方、恒常的な低温環境下でのみ生育できる細菌である好冷菌はこれを補うために、常温性酵素に比べて低温でも高い活性を維持する低温適応型酵素を持っている。これまで、低温適応型酵素の研究は工業的な応用も考慮してプロテアーゼやリパーゼなどの菌体外酵素を中心に進められてきた。また、低温適応型酵素の遺伝子発現に及ぼす低温の影響はほとんど明らかにされていなかった。本研究は、好冷菌由来の細胞内の主要代謝経路の1つであるクエン酸回路とその側路であるグリオキシル酸回路でそれぞれ働くイソクエン酸脱水素酵素(IDH)とイソクエン酸リアーゼ(ICL)について、その低温適応型酵素としての性質や酵素遺伝子の発現における低温誘導性とまだ研究がほとんど進んでいない低温適応型酵素の低温での活性発現と酵素タンパク質の構造上の特徴との関連性を明らかにすることを目的とした。

好冷菌 *Colwellia maris* が持つ ICL を単一にまで精製してその性質を調査し、本酵素が低温適応型酵素であることを明らかにした。さらにこの遺伝子をクローン化し、その塩基配列を決定した。さらに、ノーザンブロットやウエスタンブロット解析などにより、本酵素遺伝子の発現が低温により誘導されることを実験的に証明した。その予想されるアミノ酸配列から、本酵素は常温性や耐熱性の同酵素と比べてプロリンやアルギニン残基の含量が低下しており、さらにループ領域の伸長や酵素タンパク質の構造維持に重要なアミノ酸残基の置換などの他の低温適応型酵素に見られる既知の特徴を持つことを明らかにした。これらの結果や他の生物の常温性 ICL で最近解明された立体構造に基づいて部位特異的変異体を作製し、その性質を調査した結果、本酵素の低い熱安定性と低温での高い活性に関係するとみられるアミノ酸残基を同定した。また、*C. maris* と近縁な好冷菌 *Colwellia psychrerythraea* の精製した ICL も *C. maris* の ICL と同様に低温適応型酵素の特徴を示すことを明らかにし、その遺伝子発現も低温で誘導されることを確かめた。以上の結果から、

これらの好冷菌の低温適応において ICL が重要であることを明らかにした。

低温適応型酵素が低温で高い活性を示すためには、酵素タンパク質の速やかな構造変化が必要である。これらの酵素が持つもう一つの特徴である低い熱安定性はその実現のための代償であると考えられてきた。好冷菌 *C. maris* の低温適応型 IDH(CmIDH)は単量体型で、多くの生物が持つ二量体型 IDH とは分子量、免疫学的交差反応性や一次構造が異なる。この単量体型 IDH の立体構造はまったく不明であったが、CmIDH とタンパク質分子全体にわたってアミノ酸配列の相同性が高い窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* の常温性の単量体型 IDH(AvIDH)の構造が最近解明された。その構造を解析した結果、全体的な立体構造とリガンドとの結合様式が単量体型と二量体型 IDH で類似していることがわかった。CmIDH と AvIDH の活性部位は互いに完全に保存されていたことから、両者の異なる熱安定性はタンパク質分子内の構造維持に関わる相互作用の違いによると予想された。そこで、AvIDH の立体構造に基づき両 IDH 遺伝子を各ドメイン構造に対応する 3 つの断片に切断し、互いの遺伝子断片を様々に組み合わせて再構成したキメラ IDH 遺伝子を作製し、大腸菌内で発現させてキメラ酵素を得た。これらの酵素の活性の至適温度、熱処理による失活や酵素タンパク質の構造安定性を調べ、酵素タンパク質の中間領域と C 末端部分が CmIDH と AvIDH のそれぞれの性質に深く関わることを明らかにした。さらに、野生型およびキメラ酵素の熱安定性とこれらのプロテアーゼに対する感受性との間にはよい相関が見られ、プロテアーゼに高い感受性を示す部分が C 末端のさらに限定された領域であることを示した。これらの結果は低温適応型酵素タンパク質の可塑性が分子全体に均等に見られるわけではなく、むしろ触媒作用における構造変化に必須な領域を中心として局在化しているという考えを支持した。キメラ酵素は、低温での活性が CmIDH に比べて上昇するグループと減少するグループに分類できた。安定性上昇と低温での活性阻害が必ずしもリンクしない事実は、両者が部分的に独立して生じうるという最近の考えを実証するものである。

これらの研究は好冷菌の低温適応型 ICL の諸性質とそれらをコードする遺伝子の低温誘導性発現に関する新知見だけではなく、低温適応型 IDH の低温での活性発現や熱安定性と酵素タンパク質の構造との関連性についても貴重な知見を得ており、生物の低温適応機能を解明する上でも大きく貢献するものである。

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があるものと認める。