

氏 名	濱島 裕輝
学 位 の 種 類	博士 (理学)
報 告 番 号	甲第396号
学位授与年月日	2015年3月31日
学位授与の要件	学位規則(昭和28年4月1日文部省令第9号) 第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	深海由来絶対好圧性細菌 <i>Shewanella benthica</i> のイソプロ ピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と構造に関する研究
審 査 委 員	(主査) 花井 亮 末次 正幸 山田 康之

I. 論文の内容の要旨

(1) 論文の構成

第1章 序論

第2章 深海由来絶対好圧性細菌 *Shewanella benthica* のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素のキメラ酵素による耐圧性領域の探索

第3章 深海由来絶対好圧性細菌 *Shewanella benthica* のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性は1アミノ酸に起因する

第4章 好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の熱安定性と耐圧性

第5章 総合考察

(2) 論文の内容要旨

好圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の耐圧性のメカニズムを解明するため、主として、絶対好圧菌 *Shewanella benthica* 由来の IPMDH と同属で常圧菌である *S. oneidensis* 由来の IPMDH (365 アミノ酸) を材料とした研究を行った。

N末端から 65 アミノ酸の領域、およびC末端から 38 アミノ酸の領域で、*S. benthica* と *S. oneidensis* の IPMDH のアミノ酸配列を入れ替えたキメラ酵素を作製し、高圧下で酵素反応速度を測定した。その結果、耐圧性は、おおむね、中央部分によって規定されている事が判明した。

S. benthica と *S. oneidensis* の IPMDH の中央部分のアミノ酸配列を比較したところ、活性中心の近傍では、第 106、第 266、第 268 アミノ酸に違いが見られた。これらのアミノ酸の置換を行ったところ、活性中心の裏側の溝にある第 266 アミノ酸が耐圧性に大きく寄与することが見出された。すなわち、この部位がアラニンであれば耐圧であり、セリンであれば非耐圧であった。

耐圧性の構造要因を調べるため、名古屋大学の渡邊信久教授との共同研究によって、*S. oneidensis* IPMDH の野生型と、第 266 番目のアミノ酸であるセリンをアラニンにした IPMDH-S266A の高圧下での構造が X線結晶解析によって決定された。その結果、非耐圧である野生型 IPMDH では、活性中心の裏側にある溝が広がり、水分子の電子密度が見出されたのに対し、耐圧の IPMDH-S266A ではそのような変化は見られなかった。この酵素は、反応中のクローズド構造と反応前後のオープン構造の2つをとることが知られており、また、律速段階は反応生成物の解離であると考えられている。本研究で決定された立体構造はクローズド構造であった。野生型 IPMDH の高圧下での構造変化は、ク

ローズド構造を安定化しており、そのため、オープン構造への変化が起こりにくくなり、酵素反応速度が低下すると考えた。

従来、タンパク質の耐熱性と耐圧性には正の相関があるという説があった。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の野生型 IPMDH と、耐熱性が向上することが知られている第 134 アミノ酸ロイシンをアスパラギンに置換した変異体 IPMDH-L134N の耐圧性と構造を解析した。その結果、IPMDH-L134N は、むしろ耐圧性が低下していた。また、常圧での結晶構造では、活性中心の裏側の溝が野生型 IPMDH よりも広がっており、この部分の耐圧性への関与が再び示唆された。

II. 論文審査の結果の要旨

(1) 論文の特徴

本論文は、好圧性細菌に由来するイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性が、どのような立体構造の特徴に由来するかを解明するために、実験研究を行った結果を報告したものである。

(2) 論文の評価

本研究では、近縁関係にある絶対好圧菌と常圧菌の 2 種のバクテリアに由来する、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) のアミノ酸配列の比較をもとに、変異体の作製と精製した酵素の活性測定から、耐圧性の原因を探った。その結果、たった 1 アミノ酸の違いによって常圧菌由来の IPMDH が耐圧化することが示された。しかも、このアミノ酸は酵素の反応中心ではなく、アミノ酸の置換は常圧での酵素の反応速度に影響を及ぼさない。このような例は以前には知られておらず、驚くべき結果であると言える。

本研究では、さらに、共同研究によって決定された立体構造に、耐圧性の違いの原因を求めた。その結果、アミノ酸の違いによって、タンパク質と水和水の構造の圧力への応答が異なり、この差異が酵素の反応速度の違い、すなわち、耐圧性の違いを齎していると考えた。水和水は自由水よりも偏比容が小さいことが知られており、そのため、加圧によって水和水は増加する傾向にある。それゆえ、本研究の対象である IPMDH では、当該位置のアミノ酸が水和水と水素結合できるものであるかどうかで耐圧性を規定しているとの考えは、物理化学的に納得できる。ただし、この違いが酵素反応速度の差の真の原因であるかについては、今後、高圧下での当該部分の運動性や遷移状態の解析など、現在

では技術的に難しい検証が必要である。

酵素タンパク質の耐圧性の分子レベルでの研究はほとんど行われておらず、本研究は、耐圧性という漠然としたマクロな性質を、1アミノ酸の構造というミクロなレベルに還元し、検証可能なモデルを提出するに至ったという点で、高く評価できる。また、この段階にまで研究を進めた申請者の力量には並々ならぬものがある。

以上の評価により、審査委員会は、本論文が博士学位論文として十分な学術的価値を有するものと結論した。

2015年1月10日午後3時より4時まで本論文に関する公聴会を開き、論文内容の説明と質疑を行った。申請者は論文について明快に説明し、質疑に対する応答も満足すべきものであった。