

要約

本研究は、絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の耐圧メカニズムを解明することを目的とした。好圧菌 *S. benthica* と常圧菌 *Shewanella oneidensis* の IPMDH の N 末端側と C 末端側をそれぞれ入れ替えたキメラ酵素を作製し、加圧下で活性を測定した。その結果、酵素の活性中心を含む中央部分の配列が圧力耐性に関与していることが示された。さらに、耐圧性の原因を限定するため、常圧菌 *S. oneidensis* 由来の IPMDH (SoIPMDH) に、1 アミノ酸置換変異を導入し、加圧下の活性を調べた。その結果、266 番目の Ser を好圧菌型の Ala に置換した SoIPMDH(S266A) では、加圧下の活性が上昇した。反対に、好圧菌 *S. benthica* 由来の IPMDH (SbIPMDH) の 266 番目のアミノ酸を Ala から常圧菌型の Ser に置換した変異酵素 SbIPMDH(A266S) では、加圧下の活性が低下した。活性化体積変化 ΔV^* を求めると、非耐圧である SoIPMDH と SbIPMDH(A266S) では、それぞれ、7.2 ml/mol、9.5 ml/mol であるのに比べて、耐圧である SbIPMDH と SoIPMDH(S266A) では、それぞれ、2.3 ml/mol、0.9 ml/mol と小さかった。

SoIPMDH と SoIPMDH(S266A) の結晶を作製し、加圧下で X 線結晶解析を行い、立体構造を比較した。580 MPa の高圧下で、非耐圧の SoIPMDH では、活性中心の裏側の溝に位置する 266 番目の Ser 残基付近に水分子 3 つの侵入が見られるのに対して、耐圧変異酵素 SoIPMDH(S266A) ではこの水分子の侵入は見られなかった。高圧下での活性中心の裏側の溝への水分子の侵入を阻むことが、IPMDH の耐圧性に重要であることが示唆された。

構造と耐熱性との相関がよく研究されている、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の IPMDH (TtIPMDH) の耐圧性を解析した。活性中心近傍にある 134 番目の Leu を Asn に置換にした変異酵素 TtIPMDH(L134N) と野生型 TtIPMDH の活性を測定したところ、野生型 TtIPMDH の加圧下の活性は 51%、TtIPMDH(L134N) では 29% であった。これらの酵素を結晶化し、結晶構造を比較したところ、TtIPMDH(L134N) の活性中心残基の裏側の溝が、TtIPMDH よりも若干広がっていることが明らかとなった。

本研究により、深海由来絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 由来の IPMDH の耐圧性は、266 番目のアミノ酸残基が Ala であることに起因し、高圧での活性中心の裏側への水分子の侵入のしやすさの違いが耐圧性に影響を与えていることが明らかとなった。*Thermus thermophilus* 由来の IPMDH の耐圧性の測定結果も、同様に活性中心近傍のアミノ酸の違いによる、活性中心の裏側への水分子の侵入のしやすさの違いによるものと考えられる。由来の異なる IPMDH の加圧下における活性測定と構造解析の結果から、活性中心近傍のアミノ酸残基の性質の違いが活性中心の裏側への水分子の侵入のしやすさに影響を与え、酵素の耐圧性に影響しているものと結論づけられた。