

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

の耐圧性と構造に関する研究

Structural basis of the pressure adaptation of
3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely
piezophilic bacterium *Shewanella benthica*.

立教大学大学院

理学研究科

生命理学専攻

濱島裕輝

参考論文

Yuki Hamajima, Takayuki Nagae, Nobuhisa Watanabe, Yasuyuki Kato-Yamada, Takeo Imai, Chiaki Kato
(2014) Pressure effects on the chimeric 3-isopropylmalate dehydrogenases of the deep-sea piezophilic
Shewanella benthica and the atmospheric pressure adapted *Shewanella oneidensis*. *Bioscience,*
Biotechnology, and Biochemistry. **78**, 469-471.

目次

要旨	6
第 1 章 序論.....	9
1.1 極限環境生物	9
1.2 好圧菌.....	11
1.3 高圧下の酵素活性	13
1.4 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)	15
1.5 本研究の目的	17
第 2 章 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キ メラ酵素による耐圧性領域の探索	18
2.1 要旨.....	18
2.2 目的.....	19
2.3 材料.....	23
2.3.1 大腸菌 <i>Escherichia coli</i> HB101 株.....	23
2.3.2 実験に用いた培地	24
2.3.3 <i>leuB</i> 遺伝子を含むプラスミド	25
2.4 方法.....	28
2.4.1 キメラプラスミドの作製	28
2.4.2 培養・酵素精製	29
2.4.3 IPMDH の精製度の確認	30
2.4.4 IPMDH の活性測定	30
2.4.5 高圧下での IPMDH の活性測定.....	31
2.4.6 熱安定性の測定	32
2.4.7 最適温度の測定	32
2.4.8 最適 pH の測定	32
2.5 結果.....	33

2.5.1 キメラタンパク質の精製	33
2.5.3 IPMDH の耐圧性	34
2.5.4 IPMDH の熱安定性	35
2.5.5 最適温度の測定	36
2.5.6 最適 pH の測定	37
2.6 考察.....	38
第 3 章 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は 1 アミノ酸に起因する	39
3.1 要旨.....	39
3.2 目的.....	41
3.3 方法.....	43
3.3.1 アミノ酸置換変異体の作製	43
3.3.2 酵素の発現・精製	45
3.3.3 活性測定	46
3.3.4 $K_M \cdot k_{cat}$ の測定	47
3.3.5 熱安定性の測定	47
3.3.6 X 線結晶構造解析・高圧 X 線結晶構造解析	48
3.4 結果.....	51
3.4.1 His- Tag による高圧下での活性の違い.....	51
3.4.2 1 アミノ酸置換による耐圧性の影響.....	52
3.4.3 活性化体積の計算	54
3.4.4 K_M と k_{cat} の測定	56
3.4.5 熱安定性.....	57
3.4.6 X 線結晶構造解析・高圧 X 線結晶構造解析	58
3.5 考察.....	61

第4章 好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> 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	63
4.1 要旨	63
4.2 目的	64
4.3 材料	65
4.4 方法	66
4.4.1 酵素の発現・精製	66
4.4.2 活性測定・活性化体積の計算	67
4.4.3 結晶化	67
4.4.4 結晶構造解析	68
4.5 結果	69
4.5.1 高圧下の活性	69
4.5.2 精製した酵素の耐圧性	70
4.5.3 活性化体積の計算	71
4.5.4 結晶構造	72
4.6 考察	74
第5章 総合考察	75
参考文献	77
謝辞	85

略語一覧

DAC	ダイヤモンドアンビルセル
DHFR	ジヒドロ葉酸脱水素酵素
IPMDH	イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素
MDH	リンゴ酸脱水素酵素
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide 酸化型 (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide 還元型(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)
<i>leuB</i>	IPMDH をコードする遺伝子名
BBB	<i>Shewanella benthica</i> 由来 IPMDH
BBO	キメラ IPMDH : BBB の C 末端側が <i>Shewanella oneidensis</i> 由来 IPMDH になっている。
BOB	キメラ IPMDH : BBB の中央配列が <i>Shewanella oneidensis</i> 由来 IPMDH になっている。
BOO	キメラ IPMDH : OOO の N 末端側が <i>Shewanella benthica</i> 由来 IPMDH になっている。
OBB	キメラ IPMDH : BBB の N 末端側が <i>Shewanella oneidensis</i> 由来 IPMDH になっている。
OBO	キメラ IPMDH : OOO の中央配列が <i>Shewanella benthica</i> 由来 IPMDH になっている。
OOB	キメラ IPMDH : OOO の C 末端側が <i>Shewanella benthica</i> 由来 IPMDH になっている。
OOO	<i>Shewanella oneidensis</i> 由来 IPMDH
SoIPMDH	<i>Shewanella oneidensis</i> 由来 IPMDH (His-Tag 付き)
SbIPMDH	<i>Shewanella benthica</i> 由来 IPMDH (His-Tag 付き)
TtIPMDH	<i>Thermus thermophilus</i> 由来の IPMDH

要旨

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) は 2-オキシバレリアン酸から始まるロイシン生合成系の 3 番目の反応を行い、 NAD^+ 存在下でイソプロピルリンゴ酸を 2-オキソカプロン酸へ脱水・脱炭酸する反応を触媒する酵素である。これまでの研究で IPMDH の加圧下の活性について、*Shewanella* 属の常圧菌 *S. oneidensis* MR-1 由来の酵素と絶対好圧性細菌 *S. benthica* DB21 MT-2 の由来の酵素で比較した結果によると、常圧菌 *S. oneidensis* の IPMDH では 200 MPa での活性は常圧の 33%と低く、最適生育圧力が 70 MPa の絶対好圧菌 *S. benthica* では 200 MPa での活性が常圧の 66%であった。このように深海に生息する生物の酵素は、高圧力に適応していることが知られている。しかし、その分子レベルでのメカニズムはまったくわかっていない。本研究では、絶対好圧菌 *S. benthica* DB21 MT-2 の IPMDH の耐圧メカニズムを解明することを目的とした。

364 アミノ酸からなる好圧菌 *S. benthica* と常圧菌 *S. oneidensis* の IPMDH の N 末端側(1-65)と C 末端側(328-364)をそれぞれ入れ替えたキメラ酵素の遺伝子を作製した。大腸菌に生産させた酵素を精製して、加圧下で活性を測定した。その結果、中央(66-327)に好圧菌 *S. benthica* の IPMDH の配列をもつものでは 200 MPa での活性が、常圧の活性の 60%以上維持され、中央に常圧菌 *S. oneidensis* の IPMDH の配列をもつものでは 40%以下に低下した。このことから、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。また、酵素の熱安定性と反応至適温度に関しては、野生型を含め好圧菌 *S. benthica* の配列を中央にもつものは、常圧菌 *S. oneidensis* の配列を中央に持つものよりも、熱安定性と反応至適温度のどちらもが低いことが分かった。以上のことから、IPMDH の耐圧性と熱安定性・至適温度には、活性中心を含む中央部分の配列のみが影響していることが示された。

耐圧性の原因をさらに限定するために、常圧菌 *S. oneidensis* 由来の IPMDH (以下、SoIPMDH と略す) 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、野生型 SoIPMDH では 200 MPa での加圧下の活性は 33%であったのに対し、活性中心の基質結合部位の裏側に位置する 266 番目の Ser を好圧菌型の Ala に置換した SoIPMDH-S266A では、200 MPa での加圧下の活性は 61%にまで上昇した。反対に、好圧菌 *S. benthica* 由来の IPMDH (以下、SbIPMDH と略す)

の 266 番目のアミノ酸を Ala から常圧菌型の Ser に置換すると、200 MPa での加圧下の活性は、SbIPMDH では 66%であったのに対して、変異酵素 SbIPMDH-A266S では 42%にまで低下した。飽和基質濃度での酵素反応速度から活性化体積変化 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。

この 1 アミノ酸の違いが立体構造におよぼす影響を調べるため、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。常圧では 2 つの酵素の立体構造に大きな違いは見られなかった。しかし、580 MPa では、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。この水分子は、酵素のクローズド構造から、オープン構造への変化を妨げているものと考えられる。2-オキソカプロン酸・NADH 生成後の解離反応に移行する際、高压条件下では活性中心の裏側の溝に水分子が侵入する。266 番目のアミノ酸が Ser の SoIPMDH では、水分子が親水性の Ser と水素結合を起こすため溝への水分子の滞在時間が長くなるのに対して、疎水性の Ala をもつ SoIPMDH-S266A では高压で水分子の侵入が起こっても水素結合が形成されず、水分子がすぐに溝から放出される。野生型 SoIPMDH では、生成物の解離に必要なクローズド構造からオープン構造への変化が、高压下において、水分子の侵入によって妨げられるものと考えられる。つまり、高压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。

さらに、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（以下、TtIPMDH と略す）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 では、野生型より耐熱性が増すことが知られている。野生型 TtIPMDH と TtIPMDH-L134N の活性を測定したところ、野生型 TtIPMDH の 60°C, 150 MPa での活性は、常圧の 51%であったのに対して、TtIPMDH-L134N では 29%であった。これらの酵素を結晶化し、その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た。おそらく、高圧ではこの溝に水分子が侵入するため耐圧性が低下するものと考えられる。

以上の実験結果により、深海由来絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21MT-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起因しており、アミノ酸の違いによって活性中心の裏側にある溝の部分への高圧での水分子の侵入のしやすさに、影響を及ぼしているものと考えられる。これら由来の異なる 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。

第 1 章 序論

1.1 極限環境生物

地球上には様々な環境が存在し、どこにでも生物が棲んでいる。そのなかには地球の平均的な環境とは大きく異なる場所も存在する。温泉の源泉のような煮えたぎった高温、極地のような低温、死海のような高塩濃度、酸性やアルカリ性などの pH の異なる場所、深海のような高圧、地底内部のような酸素のない環境など、このような特殊な環境を「極限環境」と呼び、極限環境に生息する生物を「極限環境生物」と呼ぶ。極限環境にすむ微生物として、高温環境に生息する「好熱菌」、20℃以下でしか生息ができない「好冷菌」、高塩濃度環境に生息する「好塩菌」、高アルカリ環境に生息する「好アルカリ菌」、常圧下では良好に増殖できない「好圧菌」などが単離・培養されている (1~3)。例えば、好熱菌では高温条件に適応するため、細胞成分、遺伝子、酵素、細胞膜などすべてが熱に強い構造となっている。好熱菌の酵素では、一般的に熱に強い構造として次の 3 つの戦略が報告されている (3, 4)。

1. アミノ酸配列レベルでの適応：全体的なアミノ酸の数が常温適応の菌よりも少なく、アミノ酸間の水素結合や、疎水性結合を多くすることにより熱安定性を獲得している。
2. 翻訳後修飾：酵素の発現後にプロリンを水酸化してオキシプロリンに修飾をすることにより熱安定を上昇させる。
3. 保護因子による保護：タンパク質表面にカルシウムイオンを結合させることにより構造を安定化させて熱安定性を高めている。

このように極限環境微生物の酵素は、それぞれの極限環境に適応するため様々な戦略を駆使しており、またこれらの極限酵素は、そうして獲得された特殊な性質を利用して様々な産業への応用がなされている。有名な例として、ノーベル賞を受賞した生化学者 Kary Mullis 博士により再発見され(5)、その後商業化された DNA 増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) では、好熱菌由来の酵素である DNA ポリメラーゼが利用され、現在では生化学や医学、バイオテクノロジー研究において欠かせないものとなっている。日本でも、微生物学者堀越弘毅博士により分離された

好アルカリ菌由来のアルカリセルラーゼ (6, 7) は、アルカリ条件下で変性もせず高い触媒能力を有している。同様のアルカリセルラーゼを加えた洗剤は「アタック」という商品名で一般にも広く販売されている。このように極限環境生物由来の酵素は、その性質を生かした様々な利用が実用化されており、極限環境生物由来の酵素は「Extremozyme」と呼ばれ、多くの研究者を糾合して新たな産業への展開が期待されている。

1.2 好圧菌

深海に適応する好圧性の微生物の存在は、1950 年頃にアメリカの海洋微生物学者 Zobel 博士より提唱されていた (8)。しかしながら、実際に好圧菌が発見されたのは、その約 30 年後で、アメリカの海洋微生物学者 Yayanos 博士により 1979 年に初めて深海から好圧菌が分離された (9)。その 2 年後の 1981 年には 38 MPa 以下では増殖できず、高圧でしか増殖できない絶対好圧菌が単離された (10)。一方、日本における好圧菌の単離は、1990 年から、横須賀市の海洋科学技術センター (現:海洋研究開発機構)で開始された深海環境プログラム (DEEPSTAR 計画)により実施され、世界最深海域、マリアナ海溝・チャレンジャー海淵からも絶対好圧菌を分離することに成功した (11~13)。

現在、代表的な好圧菌は、 γ -プロテオバクテリアグループに含まれ、*Shewanella* 属、*Photobacterium* 属、*Colwellia* 属、*Moritella* 属、*Psychromonas* 属の 5 属に含まれる。中でも *Shewanella* 属の *Shewanella violacea* DSS12 (14) は、最適生育圧力が 30 MPa の好圧菌でありながら常圧でも培養が可能であるという特徴があり、2004 年に全ゲノム解読が終了し (15)、好圧菌のモデル生物の一つとされている。好圧菌がなぜ高水压下でも生育可能かについては、同様に全ゲノム解析が報告されている *Photobacterium profundum* SS9 (16) とこの *S. violacea* DSS12 との 2 つの菌種で特に研究が進んできている。*P. profundum* SS9 では高圧条件下で膜タンパクである OmpH の発現上昇が確認され (17)、*S. violacea* DSS12 では、圧力応答プロモーターが存在し、膜タンパク質 NtrB が圧力を感知し NtrC をリン酸化する。これが、転写装置のひとつである $\sigma 54$ 因子を活性化し、高圧特異的な遺伝子発現がなされるモデルが提唱されている (18~20)。これらの結果は、ともに膜に関連するタンパク性因子が圧力応答にかかわっているということで共通しており、非常に興味深い。また、*S. violacea* においては、さらに、呼吸鎖に関与しているシトクローム *c* が高圧になると発現が制御されて、代わりにシトクローム *d* が発現することが明らかとなっている (21, 22)。また、高圧培養下での細胞分裂は、大腸菌では高圧になると細胞分裂タンパク質である FtsZ がリング形成をすることができず、細胞分裂ができないため細長く伸びてしまう (23) のに対して、本菌では高圧で FtsZ によるリング形成が可能であり正常に分裂が可能である。これら 2 つの FtsZ

のアミノ酸配列の違いは、リング形成にかかわっていると考えられる C 末端側に多く存在しているため、その違いが分裂を制御しているものと考えられている (24, 25)。このように、好圧菌では通常の細菌と比較して、高圧条件下でのタンパク質の活性発現パターンに違いが起こることが示されてきた。タンパク質以外の圧力適応因子としては、高圧下で膜の流動性を高めるため、膜の脂肪酸組成が不飽和化することが知られている(26,27)。このように好圧菌は高圧下での遺伝子やタンパク質の発現制御により、高圧環境への適応機構を獲得していることがわかりつつある。そのような、好圧菌の酵素の高圧適応についての研究例は、単量体で機能をする RNA 代謝の必須酵素であるジヒドロ葉酸脱水素酵素 (DHFR) で行われてきており、好圧菌 *S. violacea* DSS12 由来の DHFR が加圧条件下で活性が上昇することが明らかになっている (28~30)。しかし、好圧菌のそのほかの酵素において、高圧下での活性維持のメカニズムは、現在まで明らかではない。

今後、好圧菌の深海環境適応の一般的なメカニズムを明らかにするためにも、更なる好圧菌の酵素の高圧への適応について研究をすることが必要である。

1.3 高圧下の酵素活性

酵素の高圧下での活性は、食品加工の分野で研究が進んでいる。物質の状態を変える熱力学的な因子は、熱と圧力の 2 つしかなく、食品加工では、熱エネルギーを加える加熱処理、圧力を加える加圧処理が利用されている。特に加圧処理は、熱による食品の風味に対する変化をあたえることなく、加工することで素材の味を生かした食品づくりにつながるため、食品加工の分野では加圧下での酵素の利用が行われている (31、32)。タンパク質は、一般的に圧力に対して比較的強く、200 MPa 当たりまで変性することはない。さらに高圧では、タンパク質の種類にもよるが多くの場合 200~300 MPa で多量体構造が解離し、400~800 MPa で単量体タンパク質に圧力変性が生じることが分かっている (33~35)。一方で、馬鈴薯澱粉、小麦澱粉などでは 600 MPa での高圧処理を行うと、圧力耐性の高い澱粉内のアミラーゼの消化性が増加して触媒反応が進行し、グルコースの生産量が増加する。さらに、800 MPa まで加圧をすると酵素が失活しグルコースの生産量が減少することが明らかとなっている (36)。小麦粉の代替となる微細米粉製造技術として、浸漬した米にペクチナーゼ処理を 200 MPa で行うことで活性が上昇し、還元糖の生産量が増加するので、微細な米粉の製造に利用されている (37)。一方で、低アレルギー食品などの分野では、アレルギータンパク質オボアルブミンなど加圧処理をおこなうことで、失活させてアレルギー成分の低下に利用されている (31)。このように食品を加圧することで、酵素の活性化を促進したり、さらに加圧することにより失活させるなど、圧力を利用した食品づくりがなされている。

しかしながら、酵素の利用という面での圧力研究はこのように行われてきているが、それらの酵素がどのようなメカニズムで高圧条件に応答するのか、なぜ加圧すると活性が変化するのかといった基本的な部分の研究に関しては、多くの謎が残されており、酵素の高圧下の活性についての基礎的な知見は、現在まで明らかとなっていない。

ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の研究では、好圧菌の圧力適応戦略として同じ属内であれば深度が深いところに生息する種類ほど、同酵素の圧力耐性が高いことが示されている (28~30)。一方、大腸菌由来の DHFR では、活性中心残基の D27E 変異により pH 依存性が変化し、最適 pH が pH 7~8 から pH 5~6 に変化し、各種金属イオン存在下での活性が上昇するなど性質が大きく変わる。

野生型酵素では高圧で活性が低下するが、この変異型では高圧で活性が増加することがわかり、研究が進んでいる (38)。このような高圧下の酵素活性のメカニズムについて明らかにすることは、深海への生物の酵素レベルでの適応といった理学的な知見だけでなく、高圧バイオリアクターや食品加工等への応用分野においても、非常に重要な意味を持つと考えられる。

1.4 イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)

3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (3-isopropylmalate dehydrogenase 以降 IPMDH) は、2-オキシソバレリアン酸から始まる、必須アミノ酸ロイシンの生合成において、第三番目の反応として、補酵素 NAD^+ を用いてイソプロピルリンゴ酸 (IPM) から 2-オキシイソカプロン酸への脱水素、脱炭酸の反応を触媒する酵素である (図 1) (39,40)。IPMDH の酵素番号(EC)は 1.1.1.85 で、*leuB* 遺伝子にコードされている。IPMDH はホモ二量体酵素であり、サブユニットの分子量は *Shewanella* 属では 39.5 KDa である (41,42)。酵素反応には、二価の金属イオン Mn^{2+} もしくは Mg^{2+} を必要とし、その活性は、生成する NADH の 340 nm の吸光度によって測定する方法が用いられている (39)。

本酵素には、活性中心に基質と補酵素が結合していないオープン構造(図 2)と、基質と補酵素が結合したクローズド構造の二つの構造が知られている(図 3) (43,44)。本酵素の反応機構は、好熱菌 *Thermus thermophilus* のものに対して研究されており、現在 2 種類のモデルが提唱されている。1 つ目は、IPM と NAD^+ が IPMDH に順不同に IPMDH に結合してからクローズド構造になり反応が進行するモデル (40,45)、2 つ目は、 NAD^+ が先に結合した後に、IPM が結合してクローズド構造になり反応が進むモデルである (46)。どちらのモデルでも、本酵素反応の律速段階は、クローズド構造からオープン構造へ変化して、プロダクトが酵素複合体から解離する、最終段階であると考えられている。

IPMDH は多くの生物から単離されており (47,48)、ファミリー間での配列相同性や立体構造の共通性が高い。大腸菌 *Escherichia coli* や好熱菌 *Thermus thermophilus* の IPMDH は立体構造解析 (43,49)、キメラ酵素作製を始め、1 アミノ酸置換による熱安定性向上など数多くの研究がなされている (50~61)。この様な本酵素は、高圧環境へのタンパク質の適応戦略を明らかにするうえで非常に良い材料である。

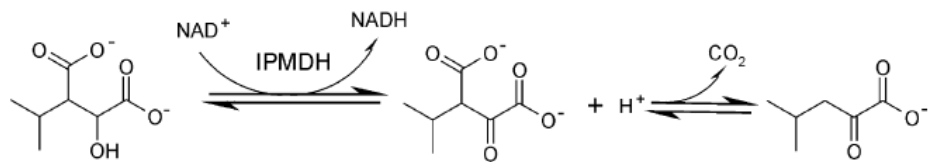


図1 IPMDH の反応機構 (参考文献 40 より引用)

NAD⁺と IPM の両方が結合し脱水・脱炭酸で反応が進む。



図2 ttIPMDH オープン構造 (1XAA)

活性中心が開いている。(矢印)

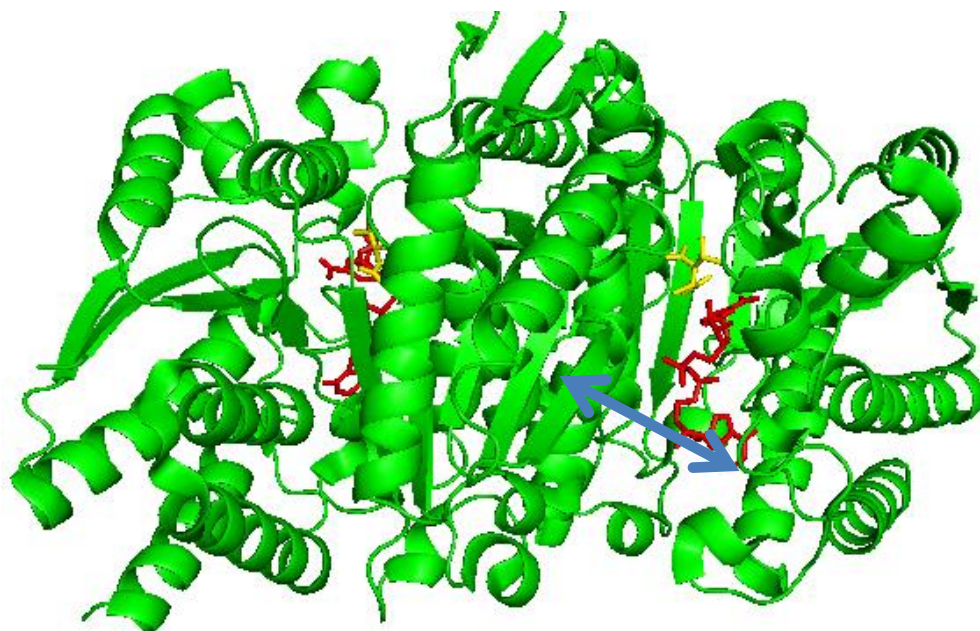


図3 ttIPMDH クローズド構造 (4F7I)

活性中心が閉じている。(矢印) 黄 IPM, 赤 NADH

1.5 本研究の目的

本研究の目的は、好圧菌 *S. benthica* の IPMDH を材料として用い、加圧下の活性や構造について調べ、好圧菌の酵素の高圧下での反応メカニズムの一端を明らかにすることで、好圧菌の酵素レベルでの深海環境への適応メカニズムの一端を明らかにすることである (62～64)。

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

2.1 要旨

深海由来の好冷・絶対好圧菌である *Shewanella benthica* DB21 MT-2 株(以下 *S. benthica*)と大気圧下で生息する *Shewanella oneidensis* MR-1 株(以下 *S. oneidensis*)のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(3-isopropylmalate dehydrogenase, 以下 IPMDH)をコードする *leuB* 遺伝子が挿入されているプラスミドを用い、同組み換え体プラスミドを N 末端側 65 アミノ酸を相同遺伝子断片と交換したキメラ、C 末端側 328 アミノ酸を相同遺伝子断片と交換したキメラ、N 末・C 末を同時に入れ替えたキメラ *leuB* 遺伝子を含む、それぞれの組み換え体キメラプラスミドを作製した。作製されたキメラプラスミドを大腸菌 HB101 株 (*leuB*) に形質転換し、大量発現させたキメラ IPMDH を硫安分画・疎水カラム Phenyl Sepharose・ゲル濾過 TSKgel G3000SWXL で精製を行った。

精製したそれぞれのキメラ IPMDH を材料に活性測定を行い、耐圧性、熱安定性を求めた。その結果、加圧下での活性が高いものは絶対好圧菌 *S. benthica* の配列を中央に持つもので、低いものは常圧菌 *S. oneidensis* 由来の配列を中央に持つものであることがわかった。また、熱安定性においては、逆に、高いのは *S. oneidensis* の配列を中央に持つもので、低いのは *S. benthica* の配列を中央に持つものであることがわかった。これらの結果から、耐圧性・熱安定性ともに酵素の活性中心を含む中央の配列に関与する領域があることが示された。

2.2 目的

Shewanella 属は、グラム陰性細菌に属する γ -プロテオバクテリアであり、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を元にした解析により主に二つのグループに分類されている (62) 。好冷性および好圧性細菌を含むグループが *Shewanella* Group 1、低温や圧力環境に適応していないグループが *Shewanella* Group 2 とされている。陸上や浅海環境から発見されている大多数の *Shewanella* 属は Group 2 に属し、極域や深海底から分離されたものの多くは Group 1 に属している (図 4)。

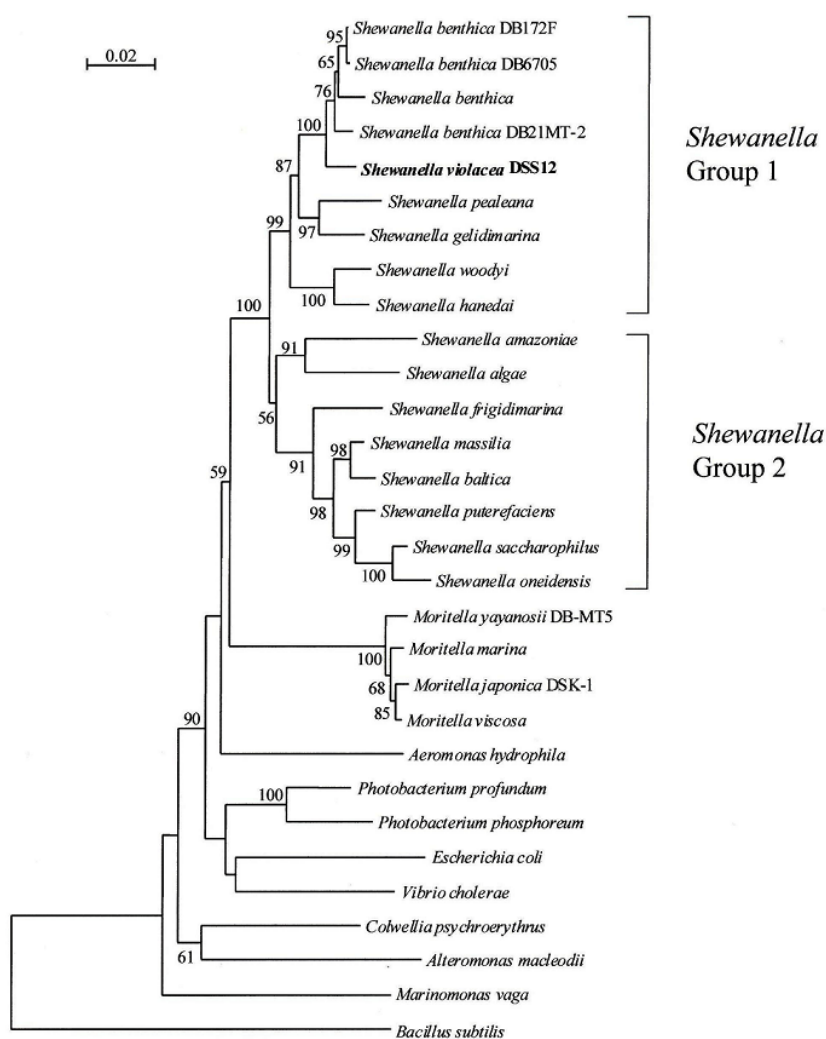


図 4 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を元にした *Shewanella* 属の進化系統樹

(参考文献 62 より引用)

Shewanella benthica DB21 MT-2 は *Shewanella* Group 1 に属し、マリアナ海溝深度 10,898 m の底泥から分離された 50 MPa 以下では生育できない高度の絶対好圧性細菌である。生育至適温度は 10℃、生育至適圧力は 70 MPa である (18)。

Shewanella oneidensis MR-1 は *Shewanella* Group 2 に属し、アメリカ合衆国のオネイダ湖の地泥から発見、分離された常温常圧細菌である。生育至適温度は 30 °C、生育至適圧力は 0.1 MPa であり、全ゲノム解析が終了しよく研究されている菌である (63)。

このような採取深度別の各 *Shewanella* 属と大腸菌由来の IPMDH の加圧下での活性プロファイルがあきらかとなっている (64~65)。実験を始めるに当たり、再測定を行った結果、(図 5) のような活性プロファイルとなった(66)。この結果は、すでに明らかな結果と比べて、50 MPa 以外の活性はほぼ同様なプロファイルとなった。(以前の実験では、ポンプの性能、測定温度の問題があり、今回の実験結果の方が正確であることが判明している。) 本研究は、その中でも耐圧性のもっとも高かった絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 の IPMDH と、常圧菌 *Shewanella oneidensis* の IPMDH の 1 次構造と活性とを比較することで、酵素中のどの部分に耐圧性に関与する領域があるか特定することを目的とした。具体的には、*S. benthica* IPMDH と常圧菌 *S. oneidensis* IPMDH とのキメラ酵素を作製し(図 6・7)、耐圧性を調べることでどの部分に耐圧性に関与している領域があるのか特定した。さらに、熱安定性など各種性質を測定することで耐圧性と相関する性質が存在しないか検討を行った。

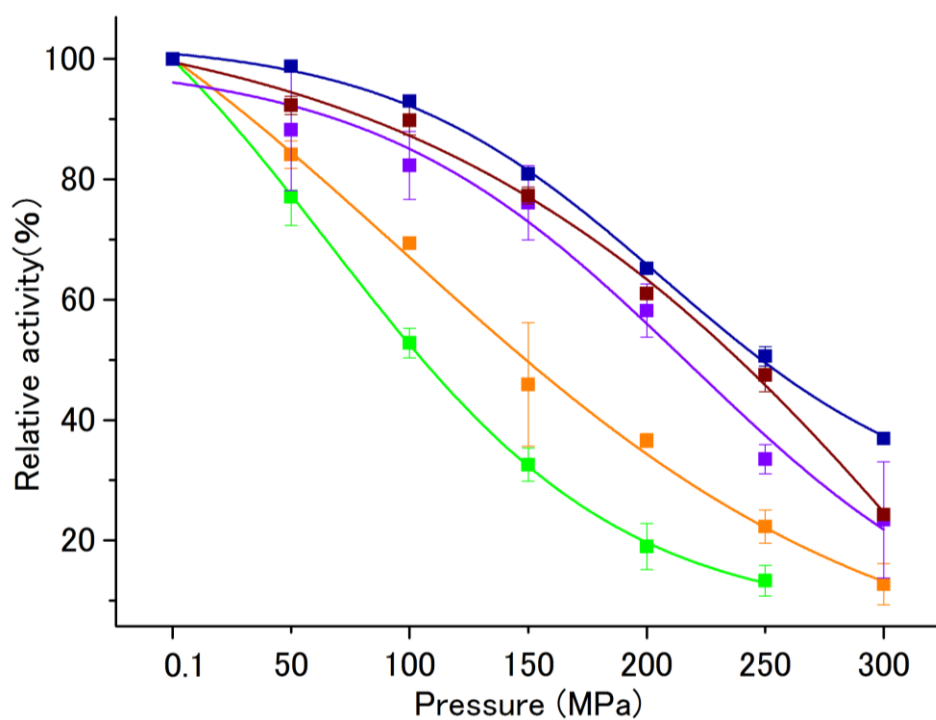


図 5 *Shewanella* 属 4 種と大腸菌の IPMDH の耐圧性

■ *E. coli*, ■ *S. oneidensis* MR-1, ■ *S. violacea* DSS12

■ *S. benthica* DB6705, ■ *S. benthica* DB21 MT-2

Genes	Chimeric structure	Proteins' ID
SoMR1_ <i>leuB</i>		OOO
SbMT2_ <i>leuB</i>		BBB
Sobb_ <i>leuB</i>		OBB
Sboo_ <i>leuB</i>		BOO
Soob_ <i>leuB</i>		OOB
Sbbo_ <i>leuB</i>		BBO
Sobo_ <i>leuB</i>		OBO
Sbob_ <i>leuB</i>		BOB

図 6 キメラプラスミドの構成

2.3 材料

2.3.1 大腸菌 *Escherichia coli* HB101 株

Escherichia coli は、グラム陰性の桿菌で通性嫌気性菌に属する。*E. coli* HB101 は遺伝子型 (*supE44*, Δ (*mcrC-mrr*), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *leuB6*, *thi-1*) は、組換え DNA 技術の開発当初より宿主として汎用され、遺伝的形質も安定した使用しやすい菌株である。ロイシンとプロリン合成に関する遺伝子がないため、最小培地では生育することができない。*leuB* 遺伝子を含み発現するプラスミドを形質転換することで、最小培地にプロリン (Pro) を加えた M9+Pro の培地にて、導入された *leuB* 遺伝子が発現すれば、その培地上にコロニーが形成されるので、この方法を用いて IPMDH の発現確認を行った。また、この株を用いて IPMDH を生産・精製すると、大腸菌由来の IPMDH 活性の混入を避けることができる。

2.3.2 実験に用いた培地

・ LB 培地

ペプトン 10 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g を 1 L の蒸留水に溶かしてオートクレーブした培地。

IPTG（終濃度 1 mM）、アンピシリン（終濃度 50 µg/ml）を必要に応じて加えて使用した。寒天培地には 2% Agar を加えた。

・ M9 培地 （表 1）

最少培地として M9 培地を用いた。組換え大腸菌のプレート培養には、2% Agar とプロリン（終濃度 50 µg/ml）を加えた M9+Pro プレートを用いた。

表 1 M9 培地組成

	試薬	1 L 中
1	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	17.6 g
2	KH ₂ PO ₄	3.0 g
3	NaCl	5.0 g
4	NH ₄ Cl	1.0 g
5	Glucose	4.0 g
6	CaCl ₂ (0.1 M)	1 ml
7	MgSO ₄ (1 M)	1 ml
8	Thiamine-HCl (5 mg/ml)	2.4 ml

2.3.3 *leuB* 遺伝子を含むプラスミド

本研究では、海洋研究開発機構 加藤千明博士より、*S. benthica* DB21MT-2 と *S. oneidensis* の *leuB* 遺伝子を *lac* プロモーター下流に導入した pUC19 ベクターの提供を受けた。

それぞれの *leuB* 遺伝子から作られる IPMDH の推定アミノ酸配列 (1 次構造) は図 7 の通りである。本研究では、N 末端から 65 アミノ酸を交換した N 末端交換キメラ、C 末端側の 328 アミノ酸より後の部分を交換した C 末端交換キメラ、両側を交換したダブルキメラと元の配列を含め、全部で 8 種類の *leuB* 遺伝子を含むキメラプラスミドを作製し、実験に使用した (図 8)。

```
SoMR1_LeuB 1 ATGAGTTATCAAATTGCAGTATTAGCGGGTGATGGTATTGGGCCTGAAGTGATGGCCGAG 60
              ***** ** ***** ** ***** *****
SbMT2_LeuB 1 ATGAGTTATCAAATAGCGGTATTAGCCGAGATGGAATTGGACCCGAAGTGATGGCCGAG 60

61 GCGCGTAAGGTGTTAAAGGCGGTTGAGGCGCGTTTTGGCCTTAATATTGAATACACTGAA 120
    ** ** ***** ***** ** ***** * ** ** ***** * *****
61 GCACGCAAGGTGTTGGCTGCGGTCGAGAAGCGTTTCGATCTCTCAATCGAATATAGTGAA 120

121 TATGATGTCGGCGGTATCGCTATCGACAATCATGGTTGTCCATTACCCGAGGCAACGCTT 180
    ***** ** ** ** ***** ***** ***** * ** ***** ** **
121 TATGATGTTGGGGCGCGGCCATCGATAATCATGGTTGTCTCTGCCTGAGGCTACTCTA 180

      Eco52I (194bp)
181 AAAGGTTGTGAGGCGGCCGACGCCATTTTATTTGGTTCAGTCGGTGGTCCCAAATGGGAA 240
    ** ** ***** ***** *** * * ***** ** ** ***** ** *****
181 AAGGGGTGTGAGGCGGCCGATGCCGTGCTGTTTGGTTCTGTTGGCGGTCTAAGTGGGAG 240

241 AACTGCCGCCCAATGAGCAGCCTGAGCGCGGTGCACTGCTGCCTCTACGGGGTCACTTC 300
    * ** ***** ** ** ** ***** ** ** ** ***** *****
241 CACCTTCCGCCAAACGATCAACCTGAGCGTGCGCGCTACTGCCTCTACGCGGACACTTC 300

301 GAGCTGTTTTGTAACCTACGTCCCGCTAAATTGCATGATGGATTAGAGCATATGTCGCCG 360
    ***** ** ***** * ***** ***** *** ** * ** *****
301 GAGCTTTTCTGTAATATGCGTCCGGCTAAATTACATCCGGGCCTCGAACATATGTCGCCA 360
```

361 CTACGCAGTGATATTTCTGCTCGGGGTTTCGATGTCTTGTGTGTGCGTGAGTTAACCGGC 420
 ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** * * ***** *****
 361 CTGCGAAGCGACATATCAGAGAAAGGCTTCGATATTCTCTGTGTGCGTGAACCTAACCGGC 420

 421 GGGATTTACTTTGGAAAAGCCTAAAGGCCCAAGGTGAAGGTGAGAGCGAAGAAGCCTTC 480
 ** ***** ** ** ***** ** ** ** ***** ***** **
 421 GGTATTTATTTTCGGTAAGCCTAAGGGTCGTCAGGGAGAAGGTGAGAATGAAGAAGCATTC 480

 481 GATACCATGCGTTATAGCCGCGTGAATTAGCCGTATCGCCGCATCGCCTTTGAAGCC 540
 ***** * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *
 481 GATACCATGAGATATAGCCGCAAGAGATCAGGCGCATAGCTAAGATTGCATTGAATCT 540

 541 GCCCGTGGTCGGCGTAAAAAGTCACTTCGGTCGACAAGGCAAACGCTTTGGCTTGCTCG 600
 ***** ***** ** ***** ***** ***** **
 541 GCCCAAGGTCGTCGTAAGAAGGTCCTTCGGTCGATAAGGCTAACGCTTTGGCCTGTAGC 600

 601 GTATTGTGGCGTCAAGTGGTCGAAGAAGTGGCGGTGGATTTCGCCGACGTTGAACTGGAG 660
 *** * ***** ** ***** ** ** ***** ** ** ***** **
 601 GTACTCTGGCGTGAAGTTGTCTGAAGAGGTCGCTAAGGATTACCCGGATGTCGAACTCGAA 660

 661 CACATCTATATCGACAACGCGACCATGCAGTTGCTGCGTCGCCCCGATGAGTTTGACGTC 720
 ***** ***** ***** ***** ** * ***** ** ***** *****
 661 CACATTTATATCGATAACGCTACCATGCAGCTGTTACGTCGTCCAAATGAATTTGATGTC 720

 721 ATGCTGTGTTCTAACTTGTTTGGCGACATTCTATCGGACGAAATCGCCATGCTGACTGGT 780
 ***** ** ***** ** ** ** ***** ** ** ***** *****
 721 ATGCTCTGCTCTAACTTGTTTCGGTGATATCGTCTCGGATGAGATTGCCATGTTGACCGGC 780

 781 TCTATGGGCTTACTGTCTTCGGCGAGCATGAATAGCACTGGCTTTGGTTTGTGTTGAACCC 840
 ***** ** ** * **** ***** **** ** ** ** ** ** **
 781 TCTATGGGCTTATTGGCATCGATTAGCATGAACAGCCAAGGTTTCGGCATGTACGAGCCT 840

 841 GCTGGTGGCAGTGCACCGGATATCGCCGAAAGGTATTGCTAACCCGATTGCACAAATT 900
 ** ***** ***** ***** **** ** ***** ** * *****
 841 GCCGGTGGCAGTGCGCCGACATCGCCGGTCAGGGAATCGCTAATCCGGTGGCACAAATT 900

```

901  TTGTCTGCCGCATTGATGCTACGCCACAGCTTAAAGCAAGAAGAAGCGGCGAGTGCGATT  960
      **** ** ** ** ** **** ** ** ** * ** * **** ** ** ****
901  CTGTCAGCGCCTTGCTGCTGCGTCATAGCCTGAAACTTGAAGATGCTGCCCTGGCGATA  960
      HaeII (978bp)
961  GAGCGCGCTGTAACAAAGCGCTGAATTCTGGCTACTTAACCGGTGAGCTATTAAGTAGT  1020
      **   *** ** * **** *   ** ***** ***** **
961  GAAGCCGCCGTGAGCAAGCGCTGAGTGACGGTTACTTAACCTGTGAGTTATT-GCCAGC  1019

1021  GATC-AAAGACACAAAGCAAAAACAACCGTGCAAATGGGCGACTTTATCGCCGATGCAGT  1079
      * * * *   * * ** * * **   ** ***** ** * ***** * ** *
1020  AAGCGAGCGTAGCCAGGCTAAGTCTACCAGTCAGATGGGTGATTATATCGCTCAAGCCAT  1079

1080  CAAGGCAGGTGTGTGA  1095
      * *** ** * *

1080  TGCCGAAGGGGTTTAA  1095

```

図 8 SoMR1_LeuB と SbMT2_LeuB の塩基配列の比較と制限酵素サイト

両者の塩基配列の相同性は、73%

配列の交換に使用した制限酵素サイトを枠で囲んだ。

2.4 方法

2.4.1 キメラプラスミドの作製

キメラ IPMDH の作製は、それぞれの *leuB* 遺伝子 (図 7・8) の制限酵素サイトにもとづき *S. benthica* DB21MT-2 と *S. oneidensis* の *leuB* 遺伝子を含む pUC19 ベクターを制限酵素で切断し配列の交換を行った。

N 末端側のキメラ IPMDH は、*leuB* 遺伝子を含む pUC19 ベクターを制限酵素 *Hind* IIIにて *leuB* 遺伝子の上流のマルチクローニングサイトと *Eco* 52 Iにて 65 アミノ酸部分を、37°Cオーバーナイトで切断し、アガロース電気泳動 (3% アガロース S) を行い、240 bp の N 末端配列と外側の配列を切り出し、Wizard SV Gel and PCR clean-up system にて DNA の精製を行った。精製した DNA を配列が変わるように 3 : 1 の濃度で混合し、Ligation を行いN末端側のキメラプラスミドを作製した。

C 末端側のキメラ IPMDH は、*leuB* 遺伝子を含む pUC19 ベクターを制限酵素 *Hind* IIIにて *leuB* 遺伝子の上流のマルチクローニングサイト、*Sac* Iにて 328 アミノ酸部分を、*Hae* IIにて *leuB* 遺伝子の下流のマルチクローニングサイトを 37°C、オーバーナイトで切断し、アガロースゲル電気泳動(3 % アガロース S)を行った。電気泳動後、*S. benthica* 由来の配列は、1030 bp、250 bp のバンドを、*S. oneidensis* 由来の配列は、1040 bp、180 bp のバンドを切り出し Wizard SV Gel and PCR clean-up system にて DNA の精製を行った。新しい pUC19 ベクターと精製した DNA を配列が入れ替わるように 1:2:3 の割合で混合し、Ligation を行い C 末端側のキメラプラスミドを作製した。

両端を交換したキメラ IPMDH は、C 末端側のキメラプラスミドをベースに、N 末端側のキメラプラスミド作製と同様の操作を行い、ダブルキメラプラスミドを作製した。

作製したキメラプラスミドは、*E. coli* HB101 株に形質転換し、QIAprep spin Miniprep Kit を用いてプラスミドを精製後、3130xl ジェネティックアナライザシーケンシングシステムを用いてシーケンスを行い配列の確認をした。これ以降、キメラ IPMDH は *S. benthica* 由来の配列は B、*S. oneidensis* 由来の配列は O と表記する。

シーケンス確認に用いたプライマーは以下の 4 つで、M13 は pUC19 のベクター側から、*Shewanella* は内側から配列を読むことで、全塩基配列の確認を行った。

M13 Primer M4 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

M13 Primer RV 5' - CAGGA AACAGCTATGAC - 3'

Shewanella Fwd 5'- GGTGGCAGTGCGACCGGA - 3'

Shewanella Rev 5' - GGCAGTCGGCCGCCTCACA- 3'

2.4.2 培養・酵素精製

キメラ*leuB*遺伝子を含む*E. coli* HB101株を3 mlのLB + Amp培地にて6時間培養後、2 LのLB + Amp + IPTG培地に3本植菌し18時間、30℃、210 rpmで培養を行った。回収した菌体を、Wash buffer (50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl) で洗浄、凍結した。凍結した菌体を、TE (1 g/5 ml) に懸濁後、リゾチーム (10 mg/ml) を1/10 vol加え、-80℃凍結、10℃融解を三回繰り返し、氷上でソニケーションを行い破碎した。遠心分離機で4℃、32,000×g、30分遠心し、上清を回収した。上清に硫酸アンモニウムを40%、50%、55%、60%、65%、70%飽和となるよう加えて硫酸分画を行い、遠心後の沈殿の活性の高い画分を50 mM Tris-HCl (pH 8)に懸濁した。懸濁したサンプルに硫酸アンモニウムを25%飽和となるよう加えて、50 mM Tris-HCl (pH 8) 25%飽和硫酸アンモニウムBufferで平衡化した Phenyl Sepharose 6 Fast Flow column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) カラムにかけ、50 mM Tris-HCl (pH 8) 25%硫酸アンモニウムBufferでWash後、50 mM Tris-HCl (pH 8) 硫酸アンモニウム25%~0%飽和の濃度勾配で溶出し、活性の高い画分をアミコンウルトラ30 KDaで脱塩濃縮し、50 mM Tris-HCl (pH 8) Bufferで平衡化したTsk-gel G3000SW_{XL} HPLCカラム (Tosoh Co.,Tokyo, Japan) にかけ、50 mM Tris-HCl (pH 8) Bufferでさらに精製を行った。溶出した画分はアミコンウルトラ30 KDaでBufferの置換と濃縮を行い、-80℃で凍結保存をした。

2.4.3 IPMDH の精製度の確認

精製した IPMDH の精製度は、ブラッドフォード法を用いてタンパク質定量を行い、2 μg の精製タンパク質を SDS-PAGE (分離ゲル 12.5%、濃縮ゲル 2.5%) にて泳動を行い、泳動結果を Image J(67)にて、バンドの濃さと面積を算出し、精製タンパク/総タンパク量の計算からおよその純度を求めた。

2.4.4 IPMDH の活性測定

IPMDH の活性測定には、高圧分光光度計で測定の際に、圧力で pH の変動が少ない Tris-HCl Buffer を用いた。IPMDH 活性測定液は、50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、KCl 300 mM、 MnCl_2 0.2 mM の Buffer に補酵素 NAD^+ 0.8 mM、基質 Isopropylmalate (IPM) 0.4 mM を用いて 25°C で、NADH の生成による 340 nm の波長の吸光度変化を分光光度計で測定した。活性測定に関しては、特に記載がない部分は、この方法に準じて測定を行った。

2.4.5 高圧下での IPMDH の活性測定

高圧下での活性測定は、海洋研究開発機構の高圧分光光度計（図 9）を用いて測定を行った。高圧分光光度計は、分光光度計 UV-1600(島津製作所)にインナーセル型高圧光学測定セル PCI400（シン・コーポレーション）と小型ハンドポンプ TP-500（シン・コーポレーション）が装着されたもので、活性測定液に圧力をかけ、加圧前と加圧中の活性を継続して測定できる。高圧セルの温度は、インキュベーターにより 25℃に保った。実際の活性測定は、25℃に保温した活性測定液 2 ml を 5 ml チューブに入れ、IPMDH を 6 分間初速度活性が維持できる濃度（吸光度変化 0.03～0.05 Abs/min）に希釈したものを 10 μ l 加え、ボルテックスで攪拌し、高圧セルにて活性測定を行った。

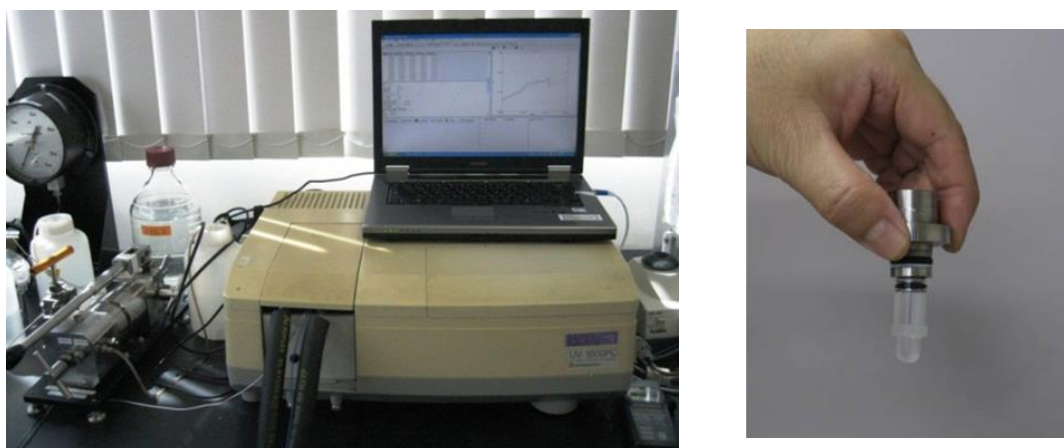


図 9 高圧分光光度計(左) と 高圧セル(右)

加圧前に 90 秒間測定を行い、直線性の高い加圧前の 30 秒間の傾きを、100%の活性とした。次に、30 秒で加圧して目的の圧力にした。加圧により温度が上昇するので、もとの 25℃に戻るのを待ってそこから 90 秒間活性測定を行い、この加圧中の 30 秒間の傾きを元の傾きと比較した。

測定圧力は、50、100、150、200、250、300 MPa の各圧力条件で 3 回測定を行い、平均値をその圧力での残存活性とした。

2.4.6 熱安定性の測定

熱安定性の測定は、精製した酵素を 1 ml の酵素反応液に 10 μ l 加えた際の吸光度変化が約 0.3 Abs/min になるように 50 mM Tris-HCl buffer にて希釈し、10°C、20°C、25°C、30°C、40°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C の各温度で 30 分間インキュベーションし、氷上で 5 分間冷却後。遠心し変性した酵素を除去し、その上清の 25°C での活性を求めた。酵素の残存活性が 50% になる半減温度から熱安定性を求めた。

2.4.7 最適温度の測定

最適温度の測定は、精製した酵素を 4°C、10°C、20°C、30°C、40°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C、70°C、75°C の各温度で活性測定を行い、最適温度を求めた。(Tris-HCl Buffer は、温度で pH が変化するので、各温度で pH 7.6 に調整したものを用いた。)

2.4.8 最適 pH の測定

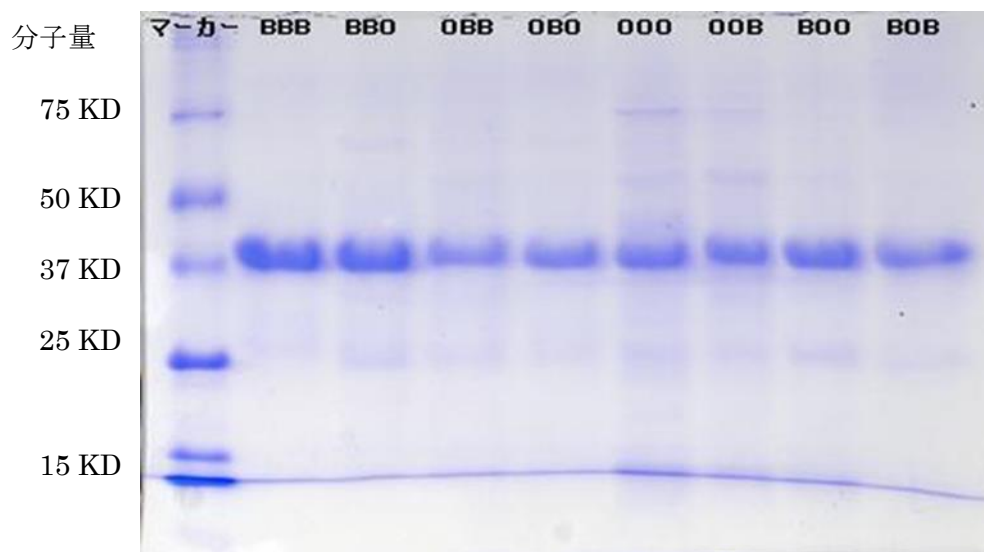
最適 pH の測定は、2.4.4 の活性測定条件をもとに Tris-HCl Buffer の Tris-HCl の pH を 7.2 ～ 9.2 の範囲で pH を 0.2 ずつ変化させ 25°C で活性測定を行い、最適 pH を求めた。

2.5 結果

2.5.1 キメラタンパク質の精製

タンパク質の精製の結果を図 10 に、精製した各酵素の純度を表 2 に示す。どの酵素も、約 85% 以上の純度で得ることができた。

表 2 キメラ IPMDH 純度



	純度 (%)
BBB	97.1
BBO	91.6
OBB	90.4
OBO	90.9
OOO	84.6
OOB	87.7
BOO	87.8
BOB	90.9

図 10 キメラ IPMDH の SDS-PAGE 結果

2.5.3 IPMDH の耐圧性

精製した各 IPMDH の加圧下での活性プロファイルは、図 11 のようになった。

耐圧性が高いのは、共通して中央に好圧菌 *S. benthica* の配列を持つものであり（図中点線で表記）、耐圧性が低いのは、中央に常圧菌 *S. oneidensis* の配列を持つものである（図中実線で表記）。この結果、IPMDH の中央の部分が耐圧性に大きく関与しており、好圧菌 *S. benthica* 由来の配列をもつものがより好圧であることが示された。

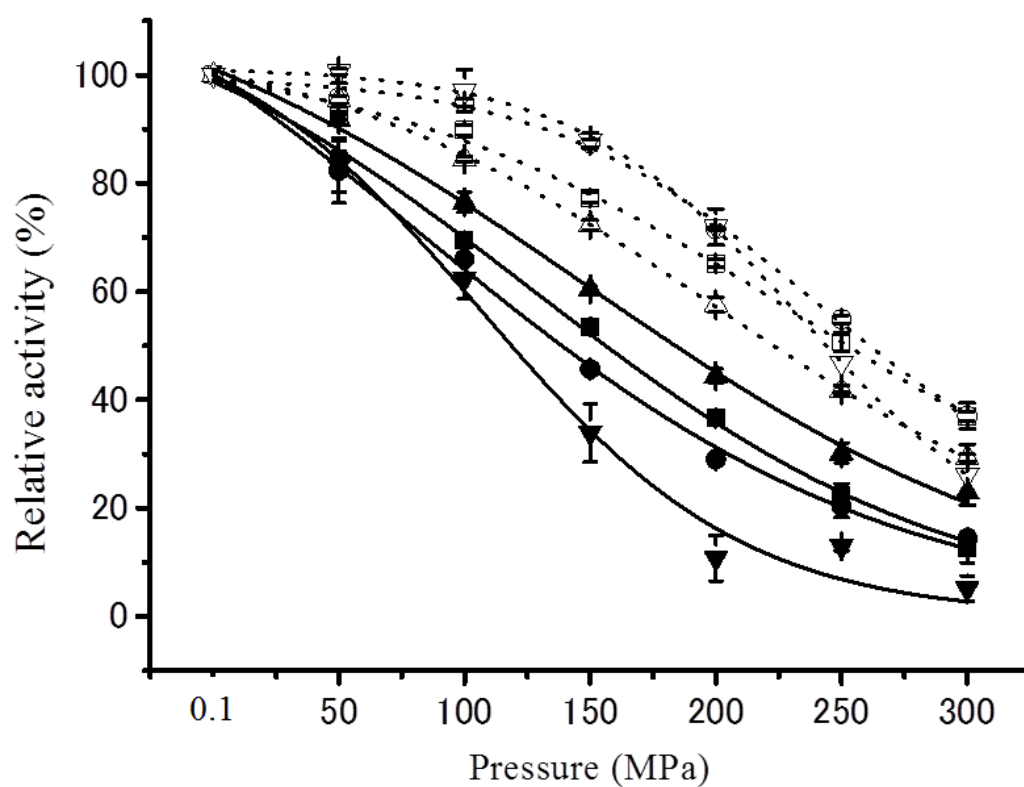


図 11 キメラ IPMDH の耐圧性

□: BBB, ○: BBO, △: OBB, ▽: OBO, ■: OOO, ●: OOB, ▲: BOO, ▼: BOB.

点線: 中央の配列が *Sb* IPMDH, 実線: 中央の配列が *So* IPMDH.

2.5.4 IPMDH の熱安定性

精製した各 IPMDH を各温度で 30 分間インキュベーションした後の残存活性は、図 12 の結果になった。図 12 を見ると、熱安定性が高いのは、中央に常圧菌 *S. oneidensis* の配列を持つものであり、熱安定性が低いのは、中央に好圧菌 *S. benthica* の配列を持つものである。この結果、熱安定性についても、中央の配列に関与している領域があり、常圧菌 *S. oneidensis* の配列を持つものがより熱安定性が高いことが示された。

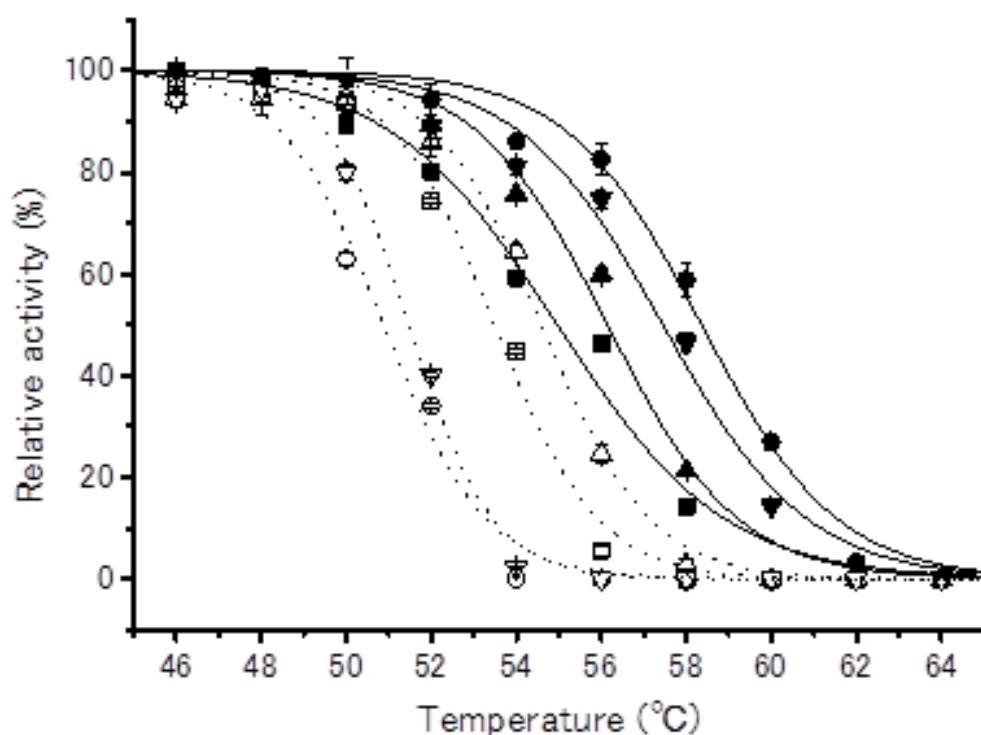


図 12 キメラ IPMDH の熱安定性

□: BBB, ○: BBO, △: OBB, ▽: OBO, ■: OOO, ●: OOB, ▲: BOO, ▼: BOB.

点線: 中央の配列が *Sb* IPMDH, 実線: 中央の配列が *So* IPMDH.

2.5.5 最適温度の測定

活性測定液の温度を変化させ活性を測定した結果、図 13 の結果になった。最適温度は、熱安定性とはほぼ同じパターンを示し、常圧菌 *S. oneidensis* の配列を中央に持つものが最適温度も高い傾向にあることが明らかとなった。また、低温域 10℃での活性を見ると、特に BBB と OOO の酵素の比較で、好冷菌でもある *S. benthica* 由来の酵素である BBB に好冷菌酵素の特徴であった、低温での高い触媒活性能力はないことが示唆された。しかしながら、中央部に *S. benthica* 由来の配列を含むキメラ IPMDH である、BBO、OBB は低温 10℃での活性の上昇がみられた。

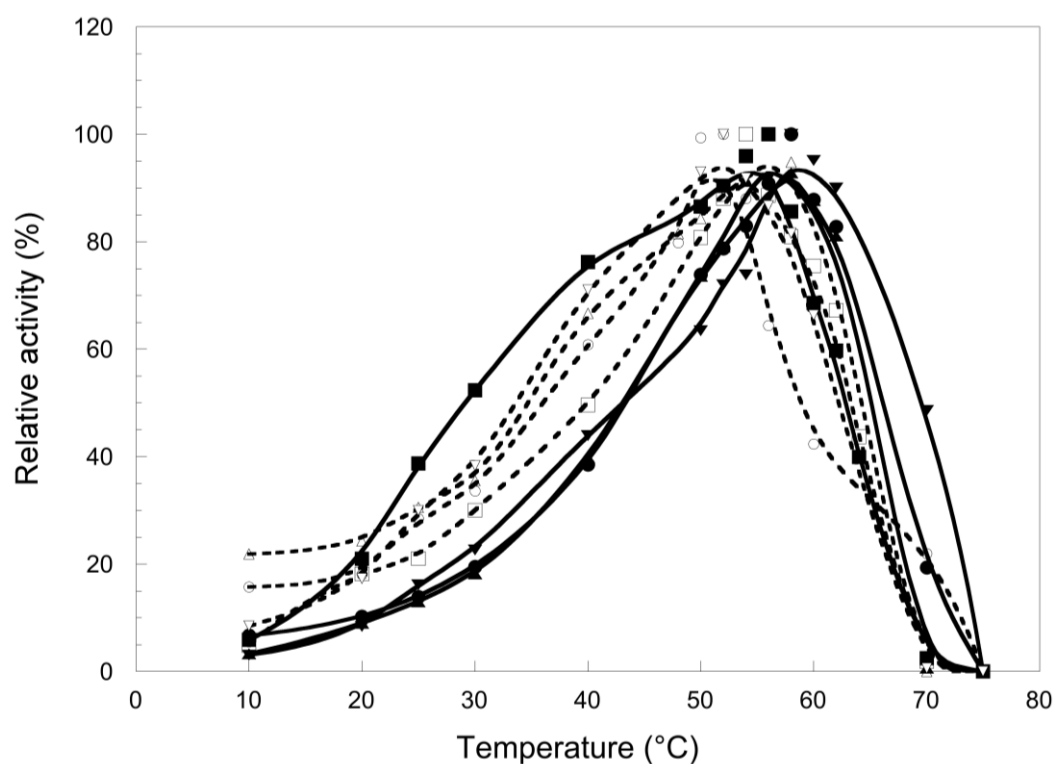


図 13 キメラ IPMDH 活性の温度依存性

□: BBB, ○: BBO, Δ: OBB, ▽: OBO, ■: OOO, ●: OOB, ▲: BOO, ▼: BOB.

点線: 中央の配列が *Sb* IPMDH, 実線: 中央の配列が *So* IPMDH.

2.5.6 最適 pH の測定

キメラ IPMDH の活性を、Tris-HCl Buffer の pH を変化させ測定した(図 14)。どのキメラ IPMDH も、pH による顕著な差はなく、これらの酵素の最適 pH は、pH 8.2~9.2 に存在することが示された。

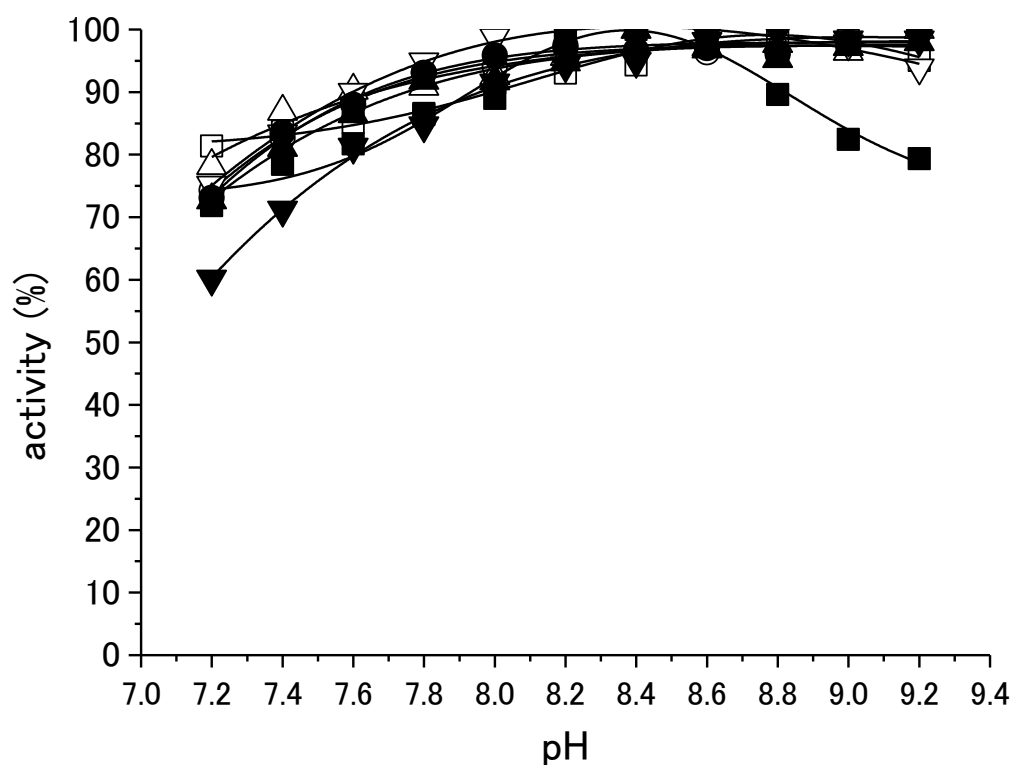


図 14 キメラ IPMDH の最適 pH

□: BBB, ○: BBO, △: OBB, ▽: OBO, ■: OOO, ●: OOB, ▲: BOO, ▼: BOB.

点線: 中央の配列が *Sb* IPMDH, 実線: 中央の配列が *So* IPMDH.

2.6 考察

IPMDH の耐圧性・熱安定性に関しては、中央のアミノ酸配列にどちらも大きく関与する領域があることが示された。耐圧性が高いものは熱安定性が低く、耐圧性が低いものは熱安定性が高いので、耐圧性と熱安定性に正の相関関係がないことが示唆された。この結果は、これまで一般則と思われてきた、熱安定性と耐圧性には正の相関関係があるとした考え(68~70)を覆すものとなった。本結果から、高温での活性の減少と高压での活性の減少とでは、次のような違いがあると考えられた。高温での活性の減少は、温度が上がることで、分子運動が激しくなり酵素の水素結合などが切れ、疎水性の部分が露出し立体構造が不可逆的に壊れるのが原因である。そのため、分子中の水素結合や疎水性効果を増やすことで熱安定性を上昇させ、高温での活性を維持することが可能となる。一方、高压での活性低下の原因は、酵素の変性もしくは酵素反応速度の低下が考えられる。今回の実験に関しては、除圧後すぐに活性が元通りに回復することと加圧中の活性の継続的な低下がみられないことから酵素の変性が原因とは考えられない。そのため、本研究で見ている高压での活性低下の原因は酵素反応速度の低下が原因と考えられる。IPMDH の場合は、活性化状態は、非活性化状態よりも体積が大きいことになる。この活性化に伴う体積変化と熱変性の間には、直接的な関係がないため、両者の相関関係がないのだと考えられる。

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

3.1 要旨

深海由来の好冷・絶対好圧菌である *Shewanella benthica* DB21 MT-2 株(以下、SbIPMDH)のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素と *Shewanella oneidensis* MR-1 のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(以下、SoIPMDH)のアミノ酸配列比較から耐圧性のキーとなるアミノ酸残基を特定した。SoIPMDHを鋳型として、SbIPMDH型のアミノ酸に置換した SoIPMDH-L106M、SoIPMDH-S266A、SoIPMDH-A268I を構築し、反対に SbIPMDH を鋳型として、SoIPMDH 型のアミノ酸に置換した SbIPMDH-M106L、SbIPMDH-A266S、SbIPMDH-I268A を構築した。構築された各変異導入 IPMDH を大腸菌で発現させ、精製し。精製した各酵素の耐圧性、 $K_M \cdot k_{cat}$ 、熱安定性の測定を行った。

その結果、野生型 SoIPMDH では 200 MPa での加圧下の活性は 33%であったのに対し、活性中心の基質結合部位の裏側に位置する 266 番目の Ser を好圧菌型の Ala に置換した SoIPMDH-S266A では、200 MPa での加圧下の活性は 61%にまで上昇した。反対に、好圧菌 *S. benthica* 由来の IPMDH での加圧下の活性は、SbIPMDH では 66%であったのに対して、変異酵素 SbIPMDH-A266S では 42%にまで低下した。その結果、266 番目のアミノ酸残基を置換した酵素の耐圧性が大きく変化した。これらの酵素の熱安定性を比較した結果、熱安定性は常圧菌酵素 SoIPMDH 60.7℃、SoIPMDH-S266A 変異酵素 61.4℃、好圧菌酵素 SbIPMDH 56.5℃、SbIPMDH-A266S 変異酵素 54.1℃となり、耐圧性と熱安定性の変化に相関関係は見られなかった。常圧での K_M および k_{cat} の測定結果はこれらの酵素では大きな違いは見られず、1 アミノ酸の違いの影響は、耐圧性のみに影響を与えていることが明らかとなった。

耐圧性の変化の原因を調べるため、常圧菌由来 SoIPMDH と耐圧性が上昇した SoIPMDH-S266A 変異酵素との結晶構造解析と高圧結晶構造解析を行い、両者の立体構造を比較した。常圧では、立体構造上の大きな違いは見られなかったが、高圧 X 線結晶構造解析の結果、常圧菌由来 SoIPMDH では、加圧条件下において、活性中心の裏側の溝に 3 つの水分子の侵入が見られるのに対して、SoIPMDH-S266A 変異酵素ではこの水分子の侵入が起こらないことが観察された。この 1 アミノ酸の違いによる、高圧下での活性中心の裏側の溝への水分子の侵入の有無が、酵素の耐圧性に影響を与えていることが示唆された。以上の結果から、好圧菌 IPMDH の耐圧性は活性中心の裏側の溝部分にある 266 番目のアミノ酸 (Ala²⁶⁶) の性質が関与しており、この部分の水分子の侵入のしやすさが酵素の耐圧性に関わっていることがわかった。

3.2 目的

S. benthica DB21MT-2 と *S. oneidensis* MR1 由来の IPMDH のキメラ酵素を作製し、その耐圧性を比較した結果、耐圧性に関与している領域が酵素の中央部分にあることが明らかとなった。SoIPMDH・SbIPMDH の立体構造は、共同研究者である名古屋大学の永江峰幸博士により明らかとされているので(41,42)。キメラ酵素の結果から 66~328 アミノ酸配列部分に耐圧性に関与するアミノ酸残基があると考え、立体構造に基づき、活性中心残基近傍に着目をして、両酵素のアミノ酸配列の比較を行った結果、活性中心近傍に存在する、106、266、268 の 3 つがあることが分かった (図 15)。その活性中心残基近傍に変異を導入し、耐圧性及び構造を比較し、*S. benthica* DB21MT-2 の IPMDH のアミノ酸レベルでの耐圧性の特定を行うことで、絶対好圧菌由来の IPMDH における高圧環境への適応機構を明らかにすることを目的とした。

```

SoIPMDH  1  MSYQI AVLAGDGI GPEVMAEARKV LKAVEARFGLNIEYTEYDVGGI AIDNHGCPLPEATL  60
          *****
SbIPMDH   1  MSYQI AVLAGDGI GPEVMAEARKV LAAVEKRFDLSIEYSEYDVGGAAIDNHGCPLPEATL  60
          *****

61  KGCEAADAILFGSVGGPKWEKLPPNEQPERGALLPLRGHFELFCMLRPAKLHDGLEHMSP  120
          *****
61  KGCEAADAVLFGSVGGPKWEHLPPNDQPERGALLPLRGHFELFCMLRPAKLHPGLEHMSP  120
          *****

121  LRSDI SARGFDM LCVRELTGGI YFGKPKGRQEGEGEEAFDTMRYSRREI SRIARI AFEA  180
          *****
121  LRSDI SEKGFDI LCVRELTGGI YFGKPKGRQEGEGENEEAFDTMRYSRKEI RRIAKI AFES  180
          *****

181  ARGRKKVTSVDKANVLACSVLRQVVEEVAVDFPDVELEHI YIDNATMQLLRPDEFDV  240
          *****
181  AQGRKKVTSVDKANVLACSVLRQVVEEVAKDYDPVELEHI YIDNATMQLLRPNEFDV  240
          *****

241  MLCNLFGDI LSDEI AMLTGSMGLLSASMSNSTGFGLFEPAGGSAPDI AGKGI ANPI AQI  300
          *****
241  MLCNLFGDI VSDEI AMLTGSMGLLSASMSNSQGFMYEPAGGSAPDI AGQGI ANPV AQI  300
          *****

301  LSAALMLRHSLKQEEAASAI ERAVTKALNSGYLTGELLSSDQRHKAKTTVQMGDFI ADAV  360
          *****
301  LSAALLRHSLKLEDAALAI EAAVSKALSDGYLTCELLPASERSQAKSTSQMGDYI AQAI  360
          *****

361  KAGV  364
          _**
361  AEGV  364

```

図 15 SoIPMDH と SbIPMDH のアミノ酸配列の比較

活性中心残基 R (Arg)、90, 97, 136 を○で示す。立体構造上活性中心残基近傍における、両者において相違するアミノ酸を四角で囲った。

3.3 方法

3.3.1 アミノ酸置換変異体の作製

材料

海洋研究開発機構 加藤千明博士より、T5 プロモーターに lac オペレーターのついた pQE80L ベクター (Qiagen, Hilden, Germany) に *S. benthica* DB21MT-2 と *S. oneidensis* の *leuB* 遺伝子の N 末側に His-tag 配列をつなげたプラスミドの提供を受けた。

S. benthica DB21MT-2 と *S. oneidensis* の *leuB* 遺伝子を含む pQE80L ベクター (Qiagen, Hilden, Germany) を材料に、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Toyobo Co., Osaka, Japan) を用いて 1 アミノ酸置換変異の導入を行った。変異の導入個所は、耐圧性に関与していると思われる活性中心残基近傍に位置する相違したアミノ酸をターゲットとした。SoIPMDH を鋳型として、SbIPMDH 型の L106M、S266A、A268I に変異を、反対に SbIPMDH を鋳型として、SoIPMDH 型である M106L、A266S、I268A の変異導入をおこなった。変異の導入に使用したプライマーは、以下のとおりである。

SoIPMDH 変異導入プライマー

SoIPMDH-L106M-F, 5'-ATGCGTCCCGCTAAATTGCATGAT-3'

SoIPMDH-L106M-R, 5'- GTTACAAAACAGCTCGAAGTGACCC-3'

SoIPMDH-S266A-F, 5'-GCATCGGCGAGCATGAATAGCACT-3'

SoIPMDH-S266A-R, 5'-CAGTAAGCCCATAGAACCCAGTCAGTCAG-3'

SoIPMDH-A268I-F, 5'-ATCAGCATGAATAGCACTGGCTTTGGTTTGG-3'

SoIPMDH-A268I-R, 5'- CGAAGACAGTAAGCCCATAGAACCCAG-3'

SbIPMDH 変異導入プライマー

SbIPMDH-M106L-F, 5'-CTACGTCCGGCTAAATTACATCC-3'

SbIPMDH-M106L-R, 5'-ATTACAGAAAAGCTCGAAGTGTCC-3'

SbIPMDH-A266S-F, 5'-TCTTCGATTAGCATGAACAGCCAA-3'

SbIPMDH-A266S-R, 5'-CAATAGACCCATAGAGCCGGTCAA-3'

SbIPMDH-I268A-F, 5'-GCGAGCATGAACAGCCAAGGTTT-3'

SbIPMDH-I268A-R, 5'-CGATGCCAATAGACCCATAGAGCC-3'

変異を導入したプラスミドは、*E. coli* HB101 株に形質転換し、QIAprep spin Miniprep Kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いて精製後、シーケンスを行い塩基配列の確認をした。

3.3.2 酵素の発現・精製

変異型 *leuB* 遺伝子を含む *E. coli* HB101 株を 3 ml の LB + Amp (50 µg/ml) 培地にて 6 時間培養後、2L の LB + Amp (50 µg/ml) + IPTG (0.5 mM) 培地に 3 本植菌し 18 時間、30°C、210 rpm で培養を行い、回収した菌体を、Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl) で洗浄、凍結した。凍結した菌体は 1 g あたり 5 ml の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 1 mM β-mercaptoethanol) で懸濁し、リゾチーム (10 mg/ml) を 1/10 vol 加え、氷上で 30 分間反応、ソニケーションで菌体を破砕した。遠心分離機で 4°C、32,000 × g、30 分遠心し、上清を回収し、Lysis buffer にて平衡化した Ni Sepharose™ 6 Fast Flow カラム (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) にアプライした。Lysis buffer にて Wash 後、Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 1 mM β-mercaptoethanol) にて Wash を行った。eluted buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole) で、IPMDH を溶出後、Amicon Ultra 30K device (Millipore Co., Billerica, MA, USA) で濃縮し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) にて Buffer を置換し 50 mM Tris-HCl Buffer に置換 50 mg/ml の濃度に濃縮し、20 µl ずつ分注して液体窒素で凍結し、-80°C に凍結保存を行った。 $K_M \cdot k_{cat}$ の測定は、精製直後に行った。酵素の純度は SDS-PAGE 12.5 % ゲルにて単一に精製されているか確認を行った。

3.3.3 活性測定

IPMDH の活性測定は、「2.4.5. 高圧下での IPMDH の活性測定」と同様の方法を用いて行った。

以下の通り、酵素の反応速度の依存性から活性化体積(ΔV^*)が求められる。

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (\text{アイリングの式)より}$$

$$\Delta G^* = -RT \ln\left(\frac{kh}{k_B T}\right)$$

$$\left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_T = v \quad \text{なので}$$

$$\begin{aligned} \Delta V^* &= \frac{\partial \Delta G^*}{\partial P} \\ &= \frac{\partial}{\partial P} \left(-RT \ln\left(\frac{kh}{k_B T}\right) \right) \\ &= \frac{\partial}{\partial P} (-RT \ln k) \end{aligned}$$

飽和基質濃度では定常状態反応速度 $v = k[E]_0$ なので

$$\frac{\partial}{\partial P} (\ln v) = \frac{\partial}{\partial P} (\ln k)$$

したがって

$$\Delta V^* = -RT \frac{\partial}{\partial P} (\ln v)$$

(R : 気体定数、T : 温度、P : 圧力)

実験データの解析は、OriginPro 9.0J (OriginLab Co., Northampton, MA, USA)を用いて行った。

3.3.4 $K_M \cdot k_{cat}$ の測定

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) , 300 mM KCl, 0.2 mM $MnCl_2$ に基質 IPM と補酵素 NAD^+ の濃度をそれぞれ変化させ 25°C で活性測定を行い、OriginPro 9.0J (OriginLab Co., Northampton, MA, USA) を用いて IPMDH の K_M と k_{cat} を求めた。 NAD^+ 濃度を 0.8 mM に固定して、IPM 濃度を 0.01, 0.015, 0.02, 0.035, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM で変化させ、各 3 回測定を行いその平均値を用いて IPM に対する K_M と k_{cat} を求めた。同様に、IPM 濃度を 0.4 mM に固定して、0.01, 0.015, 0.02, 0.035, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM で NAD^+ 濃度を変化させ、各 3 回測定を行いその平均値を用いて NAD^+ に対する K_M と k_{cat} は求めた。測定は、NADH 生成による 340 nm における吸光度変化を分光光度計を用いておこなった。

3.3.5 熱安定性の測定

SoIPMDH-S266A と SbIPMDH-A266S とオリジナルの SoIPMDH、SbIPMDH について熱安定性の測定を「2.4.6 IPMDH の熱安定性の測定」と同じ方法で行った。

3.3.6 X 線結晶構造解析・高圧 X 線結晶構造解析

名古屋大学大学院工学研究科渡邊研究室に SoIPMDH と SoIPMDH-S266A を提供し、同研究室によって、酵素の結晶化、X 線結晶構造解析、および高圧 X 線結晶構造解析が行われた。結晶化は Nagae et al, (41,42)により、25% (w/v) PEG 3350 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 、100 mM Na-HEPES (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂、10 mM IPM の条件下でハンギングドロップ法で結晶化した酵素が解析に用いられた。常圧構造は、キャピラリーに固定した結晶に FR-E CuK α X-ray source (Rigaku, Tokyo, Japan) を X 線源として用い、R-AXIS V-II detector (Rigaku, Tokyo, Japan) を使用して測定を行った。高圧下での回折は、図 16 のようなダイヤモンドアンビルセル (DAC) 内に、ハンギングドロップ法で結晶化した酵素と結晶化母液を入れて、フィルターにて結晶を動かないように固定し、加圧してから 30 分おいて、Photon Factory の NW12A のビームラインを使って 0.750 オングストロームの波長で行った。本実験では 580 MPa 下にて測定した。データの解析には、HKK-2000 で回折データの指数付け、積分、スケーリングを行い、SoIPMDH-IPM-Mg の初期構造は Protein Data Bank の 3VKZ をサーチモデルとして用いて得て、さらに精密化している。SoIPMDH の常圧での結晶構造は、Protein Data Bank に 3WZV として、高圧下の構造は 3WZW、SoIPMDH-S266A の常圧での結晶構造は 3WZX、高圧下の構造は 3WZY として、それぞれ登録を行った。立体構造の比較は、PyMOL を使用して行った。580 MPa より低圧力では体積が小さくなる以外に構造に大きな違いは見られず、これより高圧にすると結晶が溶け出した。そのため、580MPa にて解析を行った。結晶学的データは表 3 の通りであった。

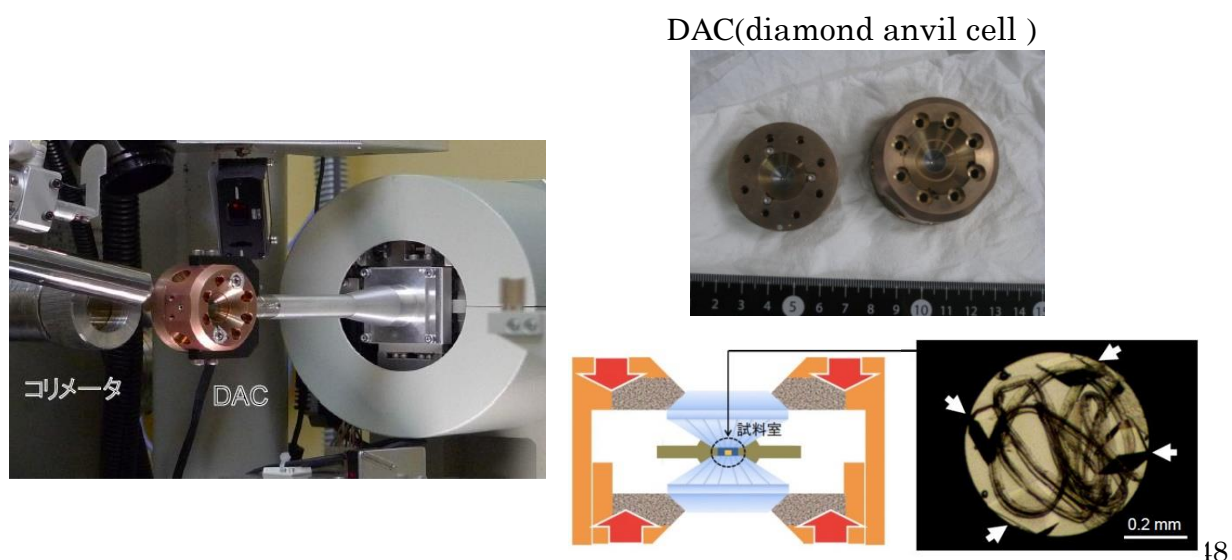


図 16 高圧 X 線結晶構造解析

表3 SoIPMDH と SoIPMDH-S266A の結晶学データ

	SoIPMDH		SoIPMDH-S266A	
	0.1 MPa	580 MPa	0.1 MPa	580 MPa
<i>Data collection</i>				
Beamline	FR-E	PF-AR NW12A	FR-E	PF-AR NW12A
(X-ray generator)	SuperBright		SuperBright	
Temperature	Room temperature			
Wavelength (Å)	1.5418	0.750	1.5418	0.750
Oscillation angle	1			
per frame (°)				
Exposure time	30	1	30	1
per frame (s)				
Crystal-to-detector distance (mm)	100	200	100	200
No. of crystals used	5	3	3	2
Space group	C2			
Unit cell parameters				
<i>a</i> (Å)	104.63	102.69	104.30	102.31
<i>b</i> (Å)	58.87	57.67	58.83	57.42
<i>c</i> (Å)	76.88	75.47	76.66	75.36
β (°)	118.92	118.66	118.96	118.81
Resolution range (Å)	22.07-1.90	36.23-1.80	22.00-1.90	36.18-1.55
	(1.93-1.90)	(1.83-1.80)	(1.93-1.90)	(1.58-1.55)
No. of reflections	33126	34612	32277	54381
R _{merge} (%)	6.6 (33.4)	7.6 (49.0)	4.8 (29.3)	6.3 (53.5)
Completeness (%)	99.4 (99.4)	92.1 (94.0)	94.0 (94.4)	90.6 (92.5)

$I/\sigma(I)$	31.7 (4.9)	29.2 (5.6)	22.6 (3.9)	22.6 (2.1)
Redundancy	3.9 (3.8)	3.7 (3.8)	2.2 (2.2)	2.7 (2.2)
<i>Refinements</i>				
R_{work} (%)	16.9	20.3	16.6	20.8
R_{free} (%)	19.9	24.6	20.0	23.5
No. atoms	2965	3025	2984	3107
Protein	2767	2767	2766	2766
Ligand/Ion	13	13	13	13
Water	185	245	205	328
B factor (\AA^2)	28.2	23.3	27.5	21.4
Protein	27.9	22.7	26.8	20.2
Ligand/Ion	17.5	15.7	17.1	13.9
Water	36.6	30.4	36.7	31.2
rmsd. from ideality				
Bond length (\AA)	0.020	0.021	0.020	0.023
Bond angle ($^\circ$)	1.95	2.04	1.95	2.20

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

$R_{\text{merge}} = \sum |I_{\text{hkl}} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum I_{\text{hkl}}$, where I_{hkl} is an intensity measurement for reflection with indices hkl and $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ is the mean intensity for multiple recorded reflections.

R_{free} was calculated using 5% of the total reflections chosen randomly and omitted from refinement.

3.4 結果

3.4.1 His- Tag による高圧下での活性の違い

SoIPMDH と SbIPMDH の 2 つの酵素間で His-Tag ありとなしでの、加圧下での活性の違いがあるか確認するため測定を行った。SoIPMDH と SbIPMDH どちらの酵素でも、His-Tag 有無での高圧下での活性プロファイルに差は見られなかった。(図 17)

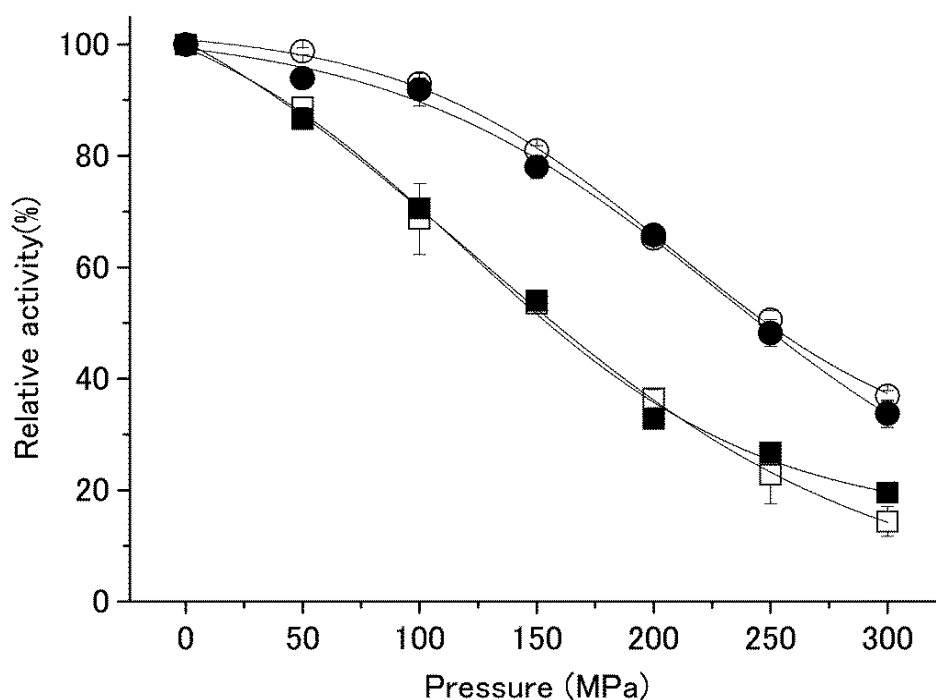


図 17 SoIPMDH と SbIPMDH の His-Tag ありとなしの酵素の耐圧性

○IPMDH of *Shewanella benthica* DB21MT-2 ●His-tagged IPMDH of *S. benthica*

□IPMDH of *Shewanella oneidensis* MR-1 ■His-tagged IPMDH of *S. oneidensis*

3.4.2 1 アミノ酸置換による耐圧性の影響

SoIPMDH、SbIPMDH に 1 アミノ酸置換変異を導入した各 IPMDH の耐圧性は、図 18、19 のようになった。SoIPMDH とその変異体の耐圧性を示す(図 18)。SoIPMDH-L106M、SoIPMDH-A268I に変異を導入したものでは、野生型に比べて耐圧性に大きな影響はなく、常圧に対する 200 MPa の活性を比較すると SoIPMDH $32.8 \pm 0.2\%$ 、SoIPMDH-L106M $35.8 \pm 0.8\%$ 、SoIPMDH-A268I $42.8 \pm 0.8\%$ と耐圧性に大きな違いは見られなかった。これに対して SoIPMDH-S266A は、常圧に対する 200 MPa の活性は $60.7 \pm 1.0\%$ を維持しており耐圧性が上昇した。

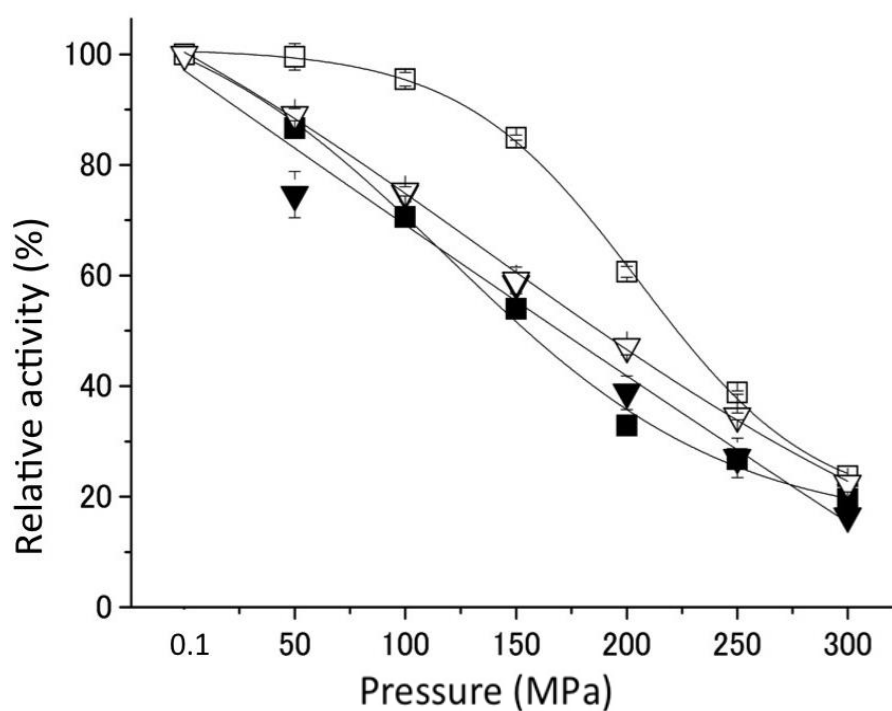


図 18 SoIPMDH とその 1 アミノ酸変異体の耐圧性

■: SoIPMDH, ▼: SoIPMDH-L106M, □: SoIPMDH-S266A, △: SoIPMDH-A268I.

SbIPMDH とその変異体の耐圧性のグラフ図 19 を見ると、SbIPMDH-M106L、SbIPMDH-A266S、

SbIPMDH に変異を導入したものすべてで耐圧性の減少がみられた。200 MPa の活性は、SbIPMDH 65.8 \pm 0.8%、SbIPMDH-M106L 58.5 \pm 0.7%、SbIPMDH-A266S 42.1 \pm 0.2%、SbIPMDH-I268A 48.8 \pm 1.0%となった。SbIPMDH-A266S 42.1 \pm 0.2%はもっとも耐圧性が低下し、耐圧性の顕著な低下がみられた。

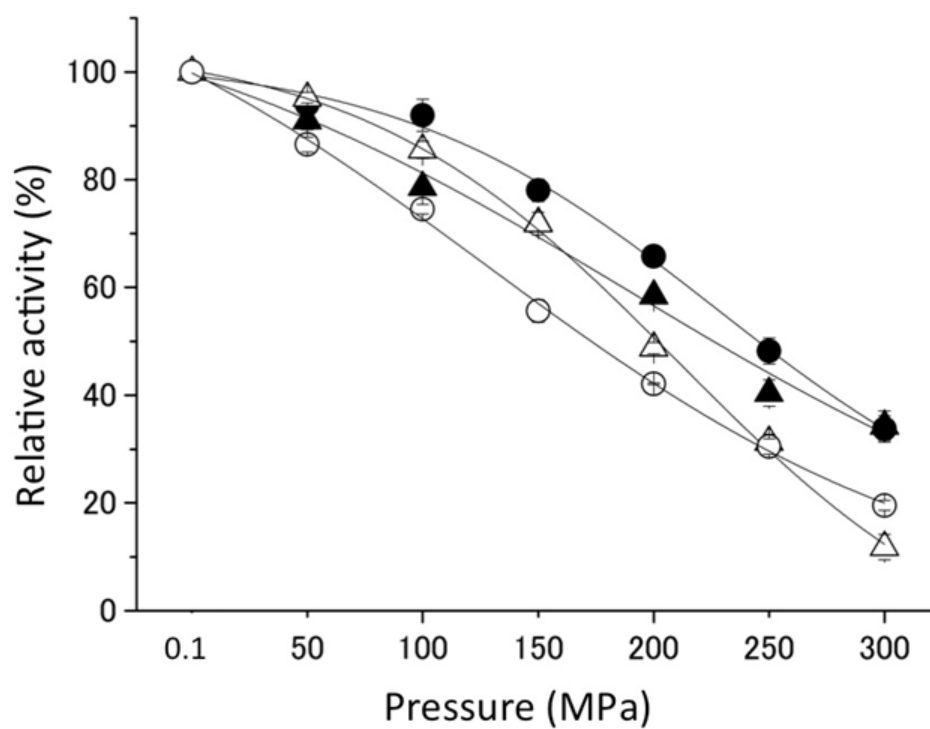


図 19 SbIPMDH とその変異体の耐圧性

●: SbIPMDH, ▲: SbIPMDH-M106L, ○: SbIPMDH-A266S, △: SbIPMDH-I268A.

3.4.3 活性化体積の計算

SoIPMDH と SbIPMDH の変異型酵素すべてで、飽和基質濃度における各圧力で反応速度 v から $(-RT\ln(v))$ の値を縦軸としてプロットし (図 20・21)、その傾きから活性化体積を求めた(表 4)。その結果、150 MPa を境としてどの酵素でも活性化体積が増加をした。

SoIPMDH に、L106M、A268I に変異を導入したものでは活性化体積には元の酵素と比較して大きな変化は見られなかった。SoIPMDH-S266A を見ると 0.1 MPa ~ 150 MPa の活性化体積が SoIPMDH の $7.2 \pm 0.5 \text{ ml mol}^{-1}$ から $0.9 \pm 1.4 \text{ ml mol}^{-1}$ に大きく減少した。一方、SbIPMDH の変異酵素では、すべての変異で元の酵素と比較して活性化体積の増加がみられた、中でも SbIPMDH-A266S 変異では、0.1 MPa ~ 150 MPa の活性が活性化体積の変化が大きく、SbIPMDH の $2.3 \pm 1.2 \text{ ml mol}^{-1}$ から $9.5 \pm 1.7 \text{ ml mol}^{-1}$ に大きく増加した。

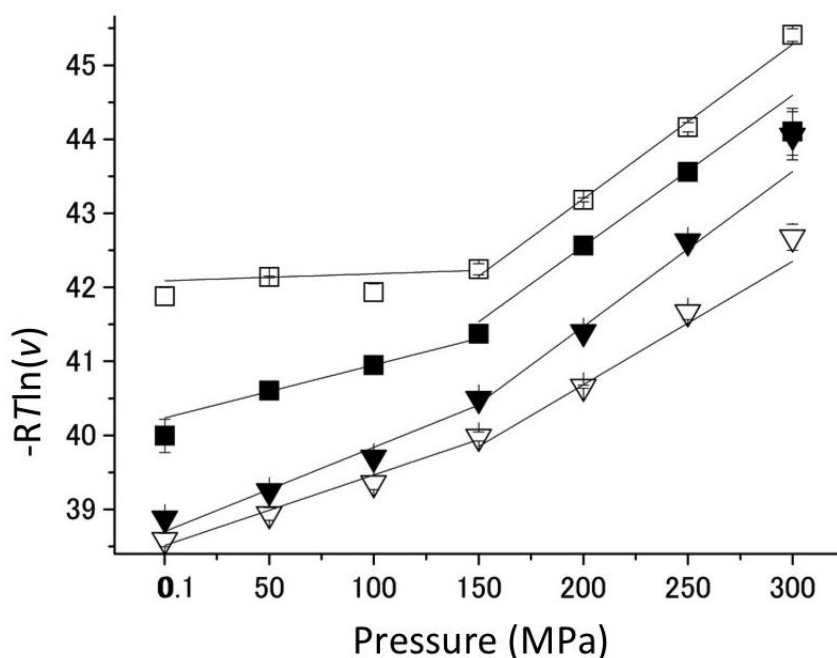


図 20 SoIPMDH と SoIPMDH 変異型酵素の活性化エネルギーと圧力

■: SoIPMDH, ▼: SoIPMDH-L106M, □: SoIPMDH-S266A, △: SoIPMDH-A268I.

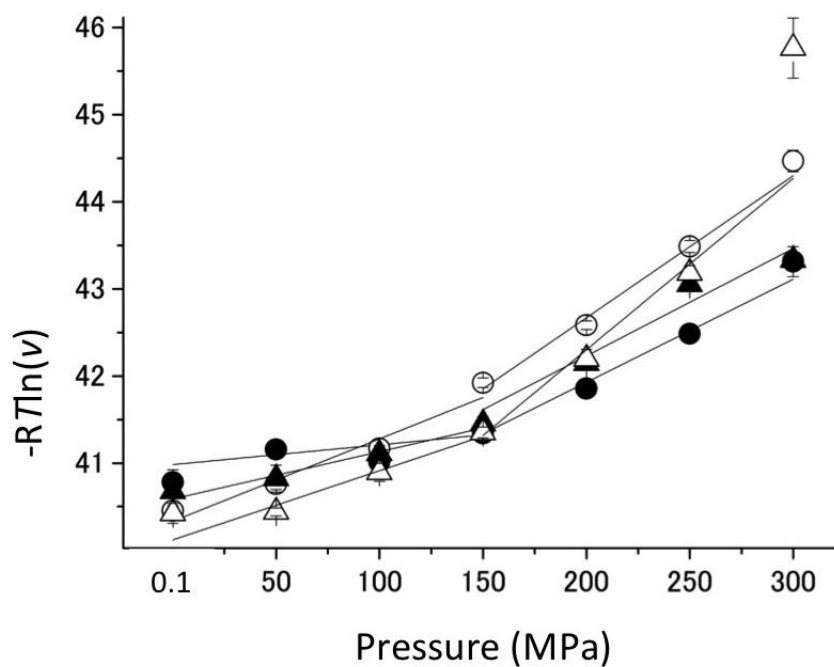


図 21 SbIPMDH と SbIPMDH 変異型酵素の活性化エネルギーと圧力

●: SbIPMDH, ▼: SbIPMDH-M106L, ○: SbIPMDH-A266S, △: SbIPMDH-I268A.

(△の 300 MPa データは、フィッティングから除外した。)

表 4 各 IPMDH における活性化体積 ΔV^*

IPMDHs	$\Delta V^*(\text{ml mol}^{-1})$	
	0.1~150 MPa	150 ~300 MPa
SoIPMDH	7.2 ± 0.5	20.4 ± 2.3
SoIPMDH-L106M	11.3 ± 1.3	20.9 ± 1.9
SoIPMDH-S266A	0.9 ± 1.4	20.9 ± 1.1
SoIPMDH-A268I	9.5 ± 0.8	16.7 ± 2.2
SbIPMDH	2.3 ± 1.2	11.8 ± 0.7
SbIPMDH-M106L	5.4 ± 0.7	12.3 ± 2.3
SbIPMDH-A266S	9.5 ± 1.7	16.3 ± 1.3
SbIPMDH-I268A	8.0 ± 1.5	19.7 ± 3.1

3.4.4 K_M と k_{cat} の測定

SoIPMDH と SbIPMDH、すべての変異酵素について K_M と k_{cat} を求めた (表 5)。IPM と NAD^+ の K_M を比較すると、IPM の K_M は、12.2 ~ 34.5 μM の間で、 NAD^+ の K_M は 70.8 ~ 278.5 μM の間と、IPM と NAD^+ では IPM の K_M の値が小さいことが示された。また、それぞれの変異酵素間の K_M を比較してみるとそれほど大きな差は見られなかった。 k_{cat} についても、酵素間で大きな差はみられなかった。

表 5 各 IPMDH における $K_M \cdot k_{cat}$

IPMDHs	IPM			NAD^+		
	$K_M (\mu M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	k_{cat}/K_M	$K_M (\mu M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	k_{cat}/K_M
SoIPMDH	14.1 ± 2.4	17.4 ± 0.5	1.23	81.4 ± 9.9	17.1 ± 0.6	0.21
SoIPMDH-L106M	12.2 ± 1.2	48.1 ± 0.8	3.92	70.8 ± 4.3	50.5 ± 0.8	0.71
SoIPMDH-S266A	22.6 ± 6.7	16.7 ± 1.2	0.74	75.6 ± 1.8	15.6 ± 0.1	0.21
SoIPMDH-A268I	34.5 ± 6.2	16.1 ± 0.8	0.47	278.5 ± 36.5	17.4 ± 0.8	0.06
SbIPMDH	12.2 ± 0.7	16.4 ± 0.2	1.35	105.8 ± 7.2	18.7 ± 0.4	0.18
SbIPMDH-M106L	23.9 ± 6.0	14.8 ± 0.9	0.62	79.0 ± 5.4	15.2 ± 0.3	0.19
SbIPMDH-A266S	34.4 ± 10.7	20.4 ± 1.6	0.59	237.9 ± 17.6	23.7 ± 0.5	0.10
SbIPMDH-I268A	35.6 ± 11.2	9.6 ± 0.8	0.27	170.7 ± 10.2	10.3 ± 0.2	0.06

3.4.5 熱安定性

熱安定の測定の結果（図 22、表 6）、各 IPMDH の熱安定性の半減温度は、SoIPMDH で 60.7℃、SoIPMDH-S266A で 61.4℃、SbIPMDH で 56.5℃、SbIPMDH-A266S で 54.1℃となった。SoIPMDH の熱安定性が、SbIPMDH よりも約 4℃高い結果となったほかは、変異酵素と元酵素間で有意差はみられなかった。

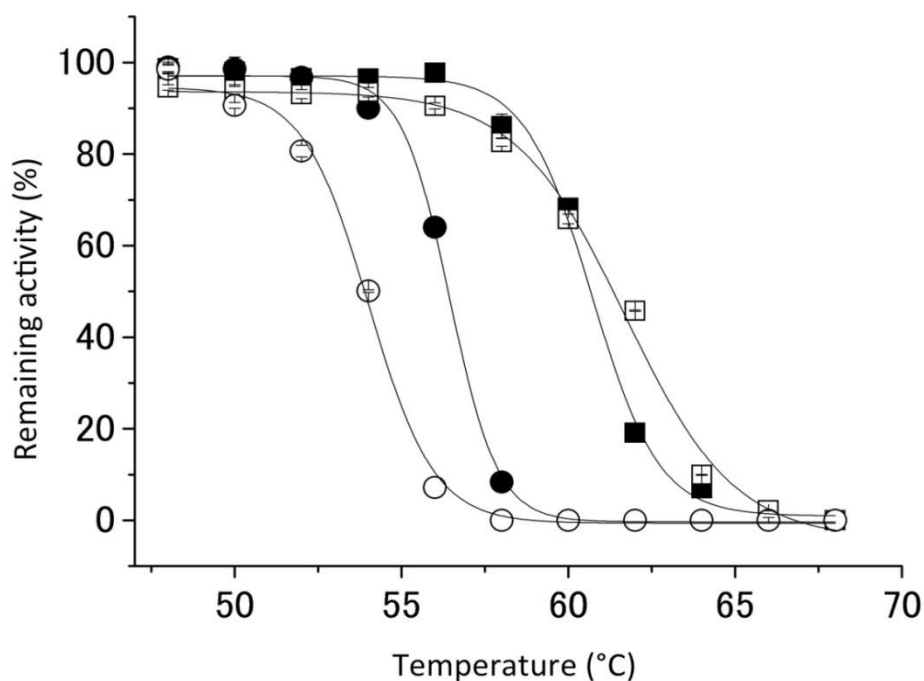


図 22 各 IPMDH の熱安定性

■ SoIPMDH, □ SoIPMDH-S266A, ● SbIPMDH, ○ SbIPMDH-A266S,

表 6 各 IPMDH の熱安定性の半減温度

IPMDHs	T _{1/2} (°C)
SoIPMDH	60.7
SoIPMDH-S266A	61.4
SbIPMDH	56.5
SbIPMDH-A266S	54.1

3.4.6 X 線結晶構造解析・高圧 X 線結晶構造解析

SoIPMDH と SoIPMDH-S266A の常圧と 580 MPa での立体構造が、共同研究者である名古屋大学大学院工学研究科渡邊研究室の永江峰幸特任助教によって決定された。SoIPMDH と SoIPMDH-S266A との常圧下の立体構造を比較すると、1 アミノ酸置換で変異を導入した 266 番目の Ser と Ala の違い以外、構造的な違いは見られなかった (図 24a と c)。SoIPMDH の常圧と高圧の構造を比較すると、高圧構造の体積が 97 % ぐらいに収縮していたが、大きな構造の違いは見られなかった (図 23)。違いが見られたのは SoIPMDH では、580 MPa で活性中心の裏側の溝に存在する Leu106、Pro108 と Leu305、His309 の間に 3 つの水分子が局在しているのが確認された (図 24b)。

(現状では、分解能が不足しており局在比は計算できない。) 水分子は、Ser266 の側鎖の OH と Wat739、Wat739 と Wat738、Wat738 と Wat740 と水素結合をしている。それに対して、SoIPMDH-S266A の 580 MPa での構造では活性中心の裏側の Leu106、Pro108 と Leu305、His309 の間には水分子が見えないことが明らかとなった (図 24d)。266 番目のアミノ酸付近の活性中心では構造の違いは見られなかった。(図 25)

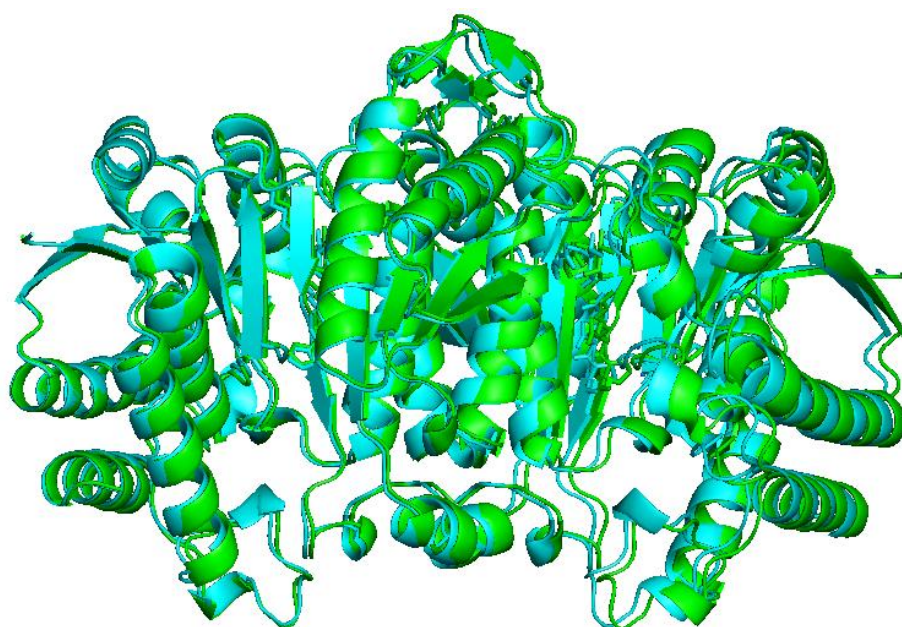


図 23 SoIPMDH の立体構造 (green 0.1 MPa, cyan 580 MPa)

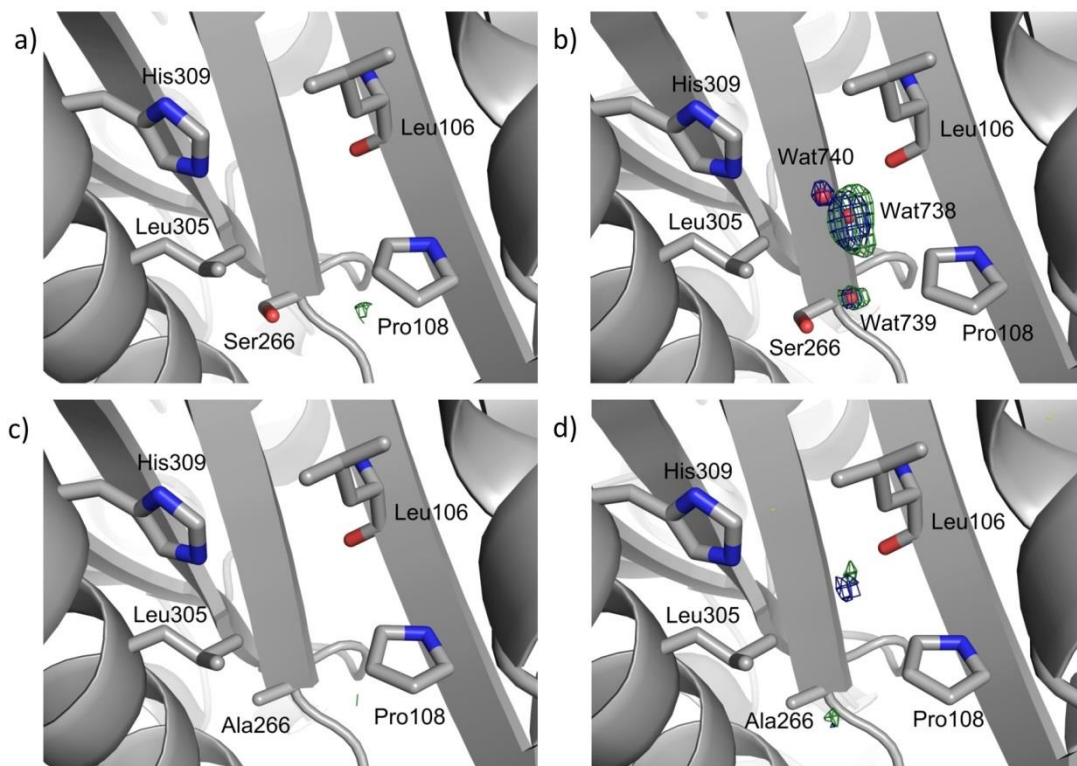


図 24 活性中心の裏側の溝付近の立体構造

SoIPMDH (a, 0.1 MPa; b, 580 MPa) and SoIPMDH-S266A (c, 0.1 MPa; d, 580 MPa).

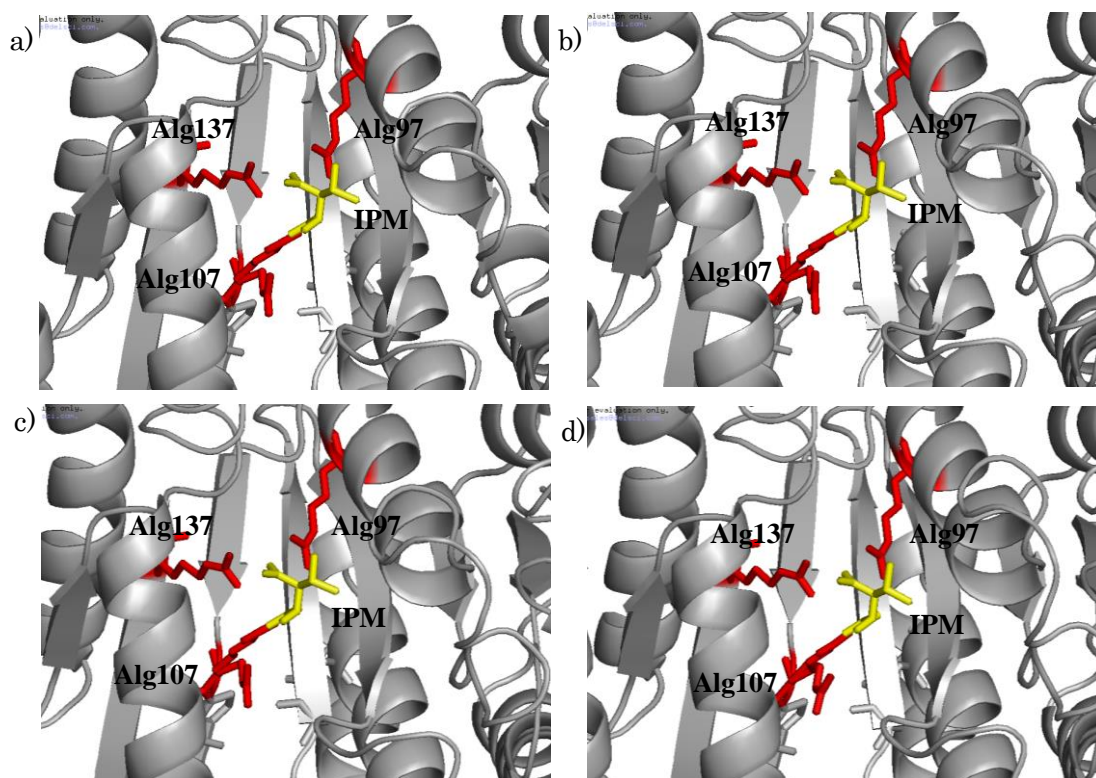


図 25 活性中心の表側の活性中心付近の立体構造

SoIPMDH (a, 0.1 MPa; b, 580 MPa) and SoIPMDH-S266A (c, 0.1 MPa; d, 580 MPa).

3.5 考察

深海由来絶対好圧菌 *S. benthica* DB21MT-2 の IPMDH の耐压性が高い理由を明らかにするため、1 アミノ酸置換で変異を導入しその耐压性を測定した。その結果、常圧型酵素 SoIPMDH の Ser²⁶⁶ を深海型酵素 SbIPMDH の Ala²⁶⁶ に 1 アミノ酸置換することで、その耐压性が著しく上昇し、SbIPMDH とほぼ同等の耐压性を示すことが明らかとなった。反対に SbIPMDH の Ala²⁶⁶ を SoIPMDH 型の Ser²⁶⁶ に 1 アミノ酸置換をすると、加圧下での活性が減少し、常圧型酵素 SoIPMDH とほぼ同等の耐压性を示した。これらの結果から、*Shewanella* IPMDH における高圧環境への適応は、活性中心の裏側の溝に存在する 266 番目のアミノ酸残基に起因していることが明らかとなった。この 266 番目のアミノ酸残基により、圧力条件のほかに酵素化学的な性質の変化が起こらないか、これらの酵素 (SoIPMDH、SoIPMDH-S266A、SbIPMDH、SbIPMDH-A266S) に関して調べると、常圧条件では、カインティックパラメーター (K_M と k_{cat}) や熱安定性などに、変異前の酵素と比較して大きな違いは見られなかった。0.1~150 MPa までの高圧条件での活性化体積変化 ΔV^* を比較すると、深海型酵素 SbIPMDH と SoIPMDH-S266A の値は、2.3, 0.9 ml/mol と小さく、常圧型酵素 SoIPMDH、SbIPMDH-A266S の値は 7.2, 9.5 ml/mol と大きく、顕著な差がみられた。これら 4 種の酵素すべてで、150 MPa 以上では、活性化体積変化 ΔV^* の増加がみられた。150 MPa を境としたこの変化は、反応経路上の複数の活性化状態で活性化体積が異なり、圧力上昇によって律速段階が交換することを表している。

SoIPMDH と SoIPMDH-S266A の X 線結晶構造解析の結果を比較すると、変異が導入されている活性中心の裏側の溝に存在する Leu106、Pro108 と Leu305、His309 の間に常圧では構造的な違いは見られない。しかしながら、580 MPa の高圧下での構造では、Ser266 を持つ SoIPMDH では Leu106、Pro108 と Leu305、His309 との間に 3 つの水分子の電子密度が観察される。SoIPMDH の Ser266 においては、側鎖の OH と水分子が水素結合を起こすために活性中心裏側の溝の隙間に水分子が滞在しやすいためと考えられる。反対に、この部位が Ala266 の SoIPMDH-S266A では Leu106、Pro108 と Leu305、His309 の間には、水分子は観察されない。疎水性の Ala 残基では、水分子との水素結合が起こらないため、水分子が安定的に滞在しないものと考えられる。高圧結晶構造解析

では、酵素のクローズド構造を観察していることから、SoIPMDH におけるこれら水和水の安定化は、酵素のクローズド構造を安定化していると考えられる。IPMDH の律速段階は、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の酵素の研究結果から、次のようなモデルが考えられている (46)。酵素反応前のオープン構造から、TiIPMDH に基質 IPM および補酵素 NAD⁺がランダムに結合して酵素反応を行うクローズド構造に変化、その後、IPM を脱水・脱炭酸し、構造がオープン構造に戻り、2-オキソカプロン酸と NADH が解離する。このクローズド構造からオープン構造への変化が律速段階であると考えられている。高圧下でのクローズド構造の安定化が、クローズド構造からオープン構造への転換の速度を低下させるため、酵素の反応速度が遅くなるのだと考えられる。

活性測定 (100~200 MPa) と高圧 X 線結晶構造解析 (580 MPa) では圧力に差がある。圧力で変化を観察する場合、溶液中のタンパク質よりもタンパク質の結晶においては、より高い圧力で同様な現象が起こることが報告されている (72)。この違いは、測定に使用している Buffer と結晶化条件の Buffer では条件が違い、また、結晶中でのタンパク質分子間の相互作用により常圧での構造が安定化されていることが原因だと考えられる。

本章のまとめとして、深海由来絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21MT-2 由来の IPMDH の高圧での高い残存活性は、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の溝への水分子の侵入のしやすさの違いが、酵素の耐压性に影響を与えていることが明らかとなった。

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

4.1 要旨

好熱菌の酵素は、熱安定性が高く耐圧性も高いと高压の生物分野の研究者の間で考えられている。しかし、実際に好熱菌の酵素の加圧下の活性を測定した例は存在しない。好熱菌酵素の耐圧性と熱安定性の関係をより明らかにするため、耐熱性の研究がもっともすすんでいる高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の IPMDH(以下 TtIPMDH と略す)を材料とし、アミノ酸置換により耐熱化した5種の変異酵素を用いてその耐圧性を調べた。野生型 TtIPMDH の 60℃,150 MPa における活性は常圧の 51.4%であり、熱安定性が 3.9 °C上昇するとの報告がある TtIPMDH-L134N 変異酵素では 28.6%と減少し、耐熱性と耐圧性とは違いがみられた。

共同研究により X線結晶構造解析によって決定した野生型 TtIPMDH と TtIPMDH-L134N の立体構造を比較したところ、活性中心残基近傍のアミノ酸残基の違いが耐圧性の差に大きく関与しており、おそらく活性中心の裏側への水分子の侵入のしやすさが共通して影響していることが示唆された。

4.2 目的

従来、「好熱菌の酵素（熱安定性の高い酵素）＝耐圧性の高い酵素」（68～70）という説もあるが、*Shewanella benthica* DB21MT-2 由来の IPMDH の活性の耐圧性が、266 番目のアミノ酸残基一つの違いに起因しており、その耐圧性と熱安定性の間には相関関係は存在しないことが明らかとなった。熱安定性と耐圧性の関係についてより明らかにするため、熱安定性の上昇した変異体が得られている *Thermus thermophilus* 由来の IPMDH で、加圧下の活性を測定することにした。Watanabe と Yamagishi(50)が解析した変異体のうち 5 つを用いた。

用いた酵素とそれぞれに対して報告されている活性の半減温度は、TtIPMDH 87.4℃、TtIPMDH-L134N 91.3℃、TtIPMDH-V181T 89.1℃、TtIPMDH-A335E 88.3℃、TtIPMDH-SUP3 (V181T/P324T/A335E) 90.9℃、TtIPMDH-SUP4(L134N/V181T/P324T/A335E) 92.7℃である。

4.3 材料

本研究では、東京薬科大学大学生命科学部分子生命科学科山岸明彦教授・赤沼哲史助教より、pET21 ベクターに *Thermus thermophilus* 由来の IPMDH (TtIPMDH) とその 1 アミノ酸置換により熱安定性上昇させた変異酵素、TtIPMDH-L134N、TtIPMDH-V181T、TtIPMDH-A335E、TtIPMDH-SUP3 (V181T/P324T/A335E)、TtIPMDH-SUP4(L134N/V181T/P324T/A335E)をコードしている各 *leuB* 遺伝子を含むプラスミド 6 種、および *E.coli* BL21 株の *leuB* 遺伝子を欠損させた発現用変異大腸菌株 MA153 の提供を受けた(50)。

4.4 方法

4.4.1 酵素の発現・精製

Thermus thermophilus 由来 *leuB* 遺伝子、および各種変異型 *leuB* 遺伝子を含む *E. coli* MA153 株を 3 ml の LB+Amp (50 µg/ml) 培地にてオーバーナイトで培養後、2 L の 2×TY (Bacto Yeast Extract 1 %, Bacto Tryptone 1.6 %, NaCl 0.5 %) + Amp (50 µg/ml) 培地に植菌し OD 0.3 付近で IPTG (0.5 mM) になるように添加、8 時間培養を行った。回収した菌体を、Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl) で洗浄、凍結した。凍結した菌体は Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol) に 1 g / 5 ml になるように懸濁、リゾチーム (10 mg/ml) を 1/10 vol 加え、氷上で 30 分間反応、ソニケーションで菌体を破碎した。遠心分離機で 4℃、32,000 ×g、30 分遠心し、上清を回収した。70℃10 分の熱処理を行い大腸菌由来のタンパク質を変性させ、遠心分離機で 4℃、32,000 ×g、30 分遠心し、上清を回収し、粗精製サンプルを耐圧性の測定に使用した。

活性中心残基近傍に変異がある L134N、および野生型酵素 TiIPMDH に関しては、ジャーファメンターにて 20L のタンク培養を行い、菌体を回収した。粗精製サンプルと同様の方法で菌体を破碎し、上清を回収、80℃20 分間熱処理を行い遠心分離機で 4℃、32,000 ×g、30 分遠心し、上清を回収した。その後、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) で平衡化した DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) カラムに上清を添加し、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) で Wash 後、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) に KCl 0~400 mM の濃度勾配で溶出を行った。活性各分に硫酸アンモニウムを 40%飽和加えて、IPMDH を沈殿させて回収し、沈殿を 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) に懸濁し、25%飽和の硫酸アンモニウムを加えて、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) ・ 25%飽和硫酸アンモニウム Buffer で平衡化した、Butyl Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) カラムに添加し、50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) ・ 25~0%飽和硫酸アンモニウム Buffer で溶出を行った。溶出した画分は、アミコンウルトラ 30 KDa で脱塩濃縮し、10 mM Tris-HCl (pH8.0)に Buffer を置換後 -80℃で凍結保存を行った。

4.4.2 活性測定・活性化体積の計算

IPMDH の活性測定は、「2.4.5 高圧下での IPMDH の活性測定」と同様の方法で、

50 mM Tris-HCl (pH7.6, 60°C)、100 mM KCl、0.4 mM MnCl₂、0.4 mM IPM、0.4 mM NAD⁺を用いて行った。60°Cにて活性測定を行った。活性化体積の計算は、「3.3.3 活性測定」と同様の方法で計算を行った。

4.4.3 結晶化

TtIPMDH、TtIPMDH-L134N の結晶化は、PEG/ION 1・2、Crystal Screen I・II、Wizard I,II,III、Index、Cs cryo の結晶化スクリーニングキットを用いて、シッティングドロップ法で 480 パターンの条件の検討を行った。その結果 19 条件で結晶がみられ、構造解析が可能に見える結晶は 7 条件、リン酸や硫酸アンモニウムを使わない条件で、高圧 X 線結晶構造解析が可能であると考えられた結晶は CrystalScreen の 17 番 0.2 M LiSO₄, 0.1 M Tris-HCl (pH8.5)、30% pEG4000 で得られた。

そこで、その条件を中心に、0.15~0.2 M LiSO₄、0.1 M Tris-Hcl(pH7.6~8.8)、40~25% PEG4000 で、ハンギングドロップ法とシッティングドロップ法を用いて 20°Cにて結晶化条件の検討を行った。結晶ができるのは、0.2 M LiSO₄、0.1 M Tris-HCl (pH8.0~8.6)、40~30% PEG4000 の結晶化条件で、酵素量が 25 mg/ml 以上の濃度の IPMDH の時に 3 日~1 週間で結晶が観察された (図 25)。

TtIPMDH と TtIPMDH-L134N の結晶のでき方を比較すると、TtIPMDH-L134N の結晶ができやすい傾向があり、ハンギングドロップ法とシッティングドロップ法では、シッティングドロップ法の結晶ができやすかった。常圧の構造解析用に 0.1 M Tris-HCl (pH7.6~8.8)、0.8~2.0 M 硫酸アンモニウム、ハンギングドロップ法を用いて作製した結晶は、pH に関係なく、硫酸アンモニウムが 1.2~1.5 M、の条件で酵素量が 10~15 mg/ml のときによくでき、1 日で結晶が観察された (図 26)。

酵素濃度が濃くなると結晶が大きくなり解析には不向きであった。

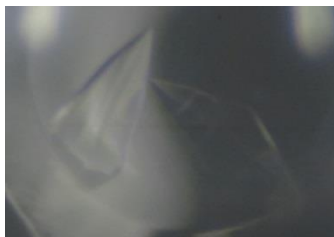


図 25 TtIPMDH L134N 結晶



図 26 TtIPMDH L134N 結晶

4.4.4 結晶構造解析

名古屋大学大学院工学研究科渡邊研究室との共同研究により X 線結晶構造解析を行った。0.2 M LiSO_4 、0.1 M Tris-HCl (pH8.4)、30% PEG4000 の結晶化条件と 0.1 M Tris-HCl (pH7.6~8.8)、0.8~2.0 M 硫酸アンモニウムの結晶化条件でできた結晶の X 線結晶構造解析の結果、TtIPMDH と TtIPMDH-L134N のどちらの結晶も、2.1 Å の分解能となった。今回詳細な解析を行ったのは、0.1 M Tris-HCl (pH8.0)、1.2 M 硫酸アンモニウムの条件で作製した結晶を用いて解析を行った。FR-E $\text{CuK}\alpha$ X-ray source (Rigaku, Tokyo, Japan) を線源とし、R-AXIS V-II detector (Rigaku, Tokyo, Japan) を使用して、カメラ長 120mm、30 秒露光、振動角 1 度 0~91 フレームでデータを測定した。データの解析には、HKK2000 で回折データの指数付け、積分、スケーリングを行い、CCP4: MOLREAP プログラムを使用して、*Thermus thermophilus* の IPMDH (PDB 番号 1XAA) を用いた分子置換法によって求めた。構造解析の精密化には Coot および CCP4 を用いた。

4.5 結果

4.5.1 高圧下の活性

粗精製酵素による、高圧下の活性測定の結果を図 26 に示す。TtIPMDH と比較をすると TtIPMDH-V181T、TtIPMDH-A335E、-SUP3 (V181T/P324T/A335E) の 3 つの変異型酵素では、耐圧性がほとんど変化をしていない。これに対して TtIPMDH-L134N、-SUP4 (L134N/V181T/P324T/A335E) は、TtIPMDH と比較すると顕著に耐圧性の減少がみられた。L134N を含む酵素で、共通して耐圧性の低下がみられた。(本データは、2011 年今井研卒研究生新沼との共同研究で測定した。)

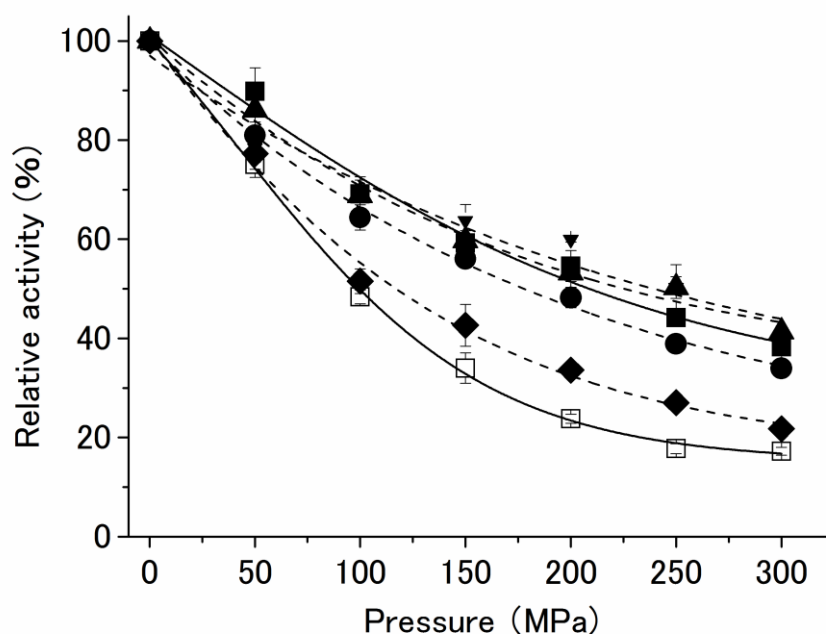


図 26 TtIPMDH とその 1 アミノ酸置換の耐圧性

■TtIPMDH-wt □TtIPMDH-L134N ●TtIPMDH-V181T ▲TtIPMDH-A335E
▼-SUP3 (V181T/P324T/A335E) ◆-SUP4 (L134N/V181T/P324T/A335E)

4.5.2 精製した酵素の耐圧性

精製した TtIPMDH、TtIPMDH-L134N の耐圧性を比較した結果。次のようなグラフになった(図 27)。粗精製サンプルと同様の耐圧性を示したことから、L134N の変異は耐圧性を低下させることが明らかとなった。

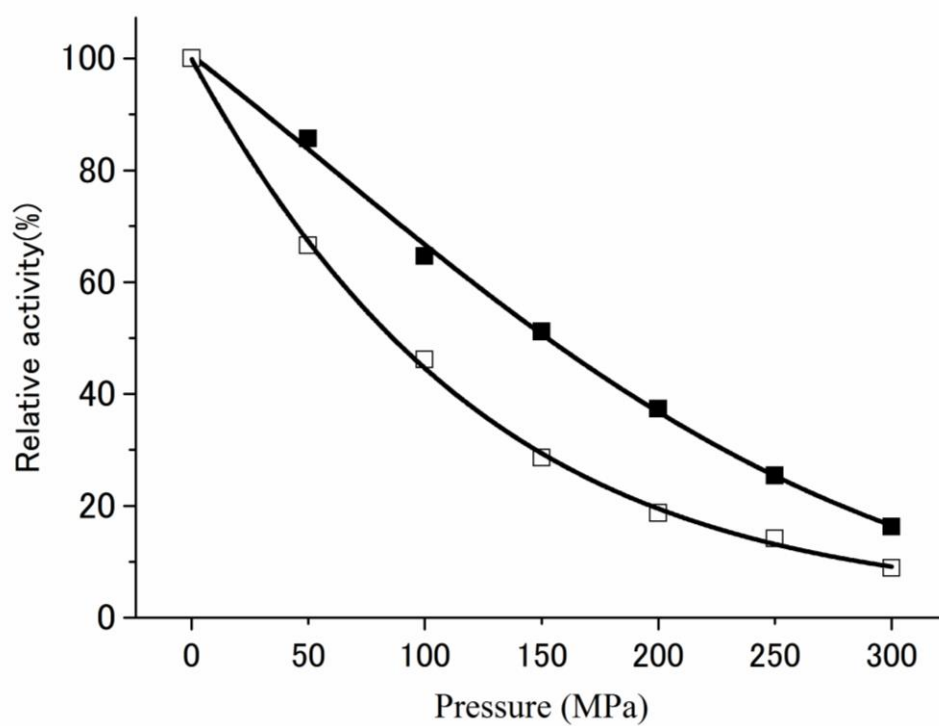


図 27 TtIPMDH と TtIPMDH L134N の耐圧性

■TtIPMDH -wt □TtIPMDH-L134N

4.5.3 活性化体積の計算

TtIPMDH と TtIPMDH-L134N で、飽和基質濃度における各圧力で反応速度 v から $(-RT\ln(v))$ の値を縦軸としてプロットし (図 28)、その傾きから活性化体積を求めた(表 7)。TtIPMDH は $15.2 \pm 1.4 \text{ ml mol}^{-1}$ 、TtIPMDH-L134N $22.9 \pm 0.9 \text{ ml mol}^{-1}$ と 1 アミノ酸置換により活性化体積の増加がみられた。

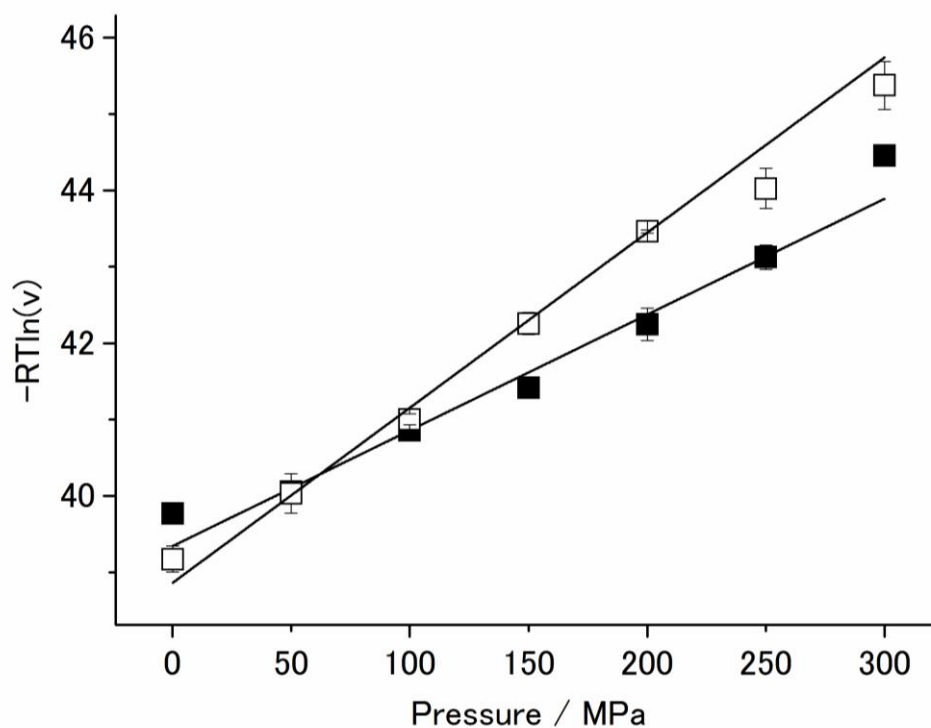


図 28 TtIPMDH と TtIPMDH L134N 変異型酵素の活性化エネルギーと圧力

■TtIPMDH-wt □TtIPMDH-L134N

表 7 各 IPMDH における活性化体積 ΔV^*

IPMDHs	$\Delta V^*(\text{ml mol}^{-1})$
	0.1~300 MPa
TtIPMDH-wt	15.2 ± 1.4
TtIPMDH-L134N	22.9 ± 0.9

4.5.4 結晶構造

4.5.1.に示したように、L134N 変異のある 2 つの変異体 TtIPMDH-L134N, TtIPMDH SUP4(L134N/V181T/P324T/A335E)で耐圧性が低下した。そこで、名古屋大学大学院工学研究科渡邊研究室との共同研究によって、TtIPMDH と TtIPMDH-L134N 両者の立体構造を決定した。TtIPMDH と TtIPMDH-L134N 主鎖の骨格を比較すると大きな違いは見られなかった (図 29)。L134N の部分を注目してみると、TtIPMDH では、134 番目の Leu が活性中心残基の真ん中に位置し、その隣の Thr135 が奥の方に存在している。TtIPMDH-L134N では、134 番目の Leu が Asn に変わり少し手前に来るとともに、隣の Thr135 も手前に移動をしている。裏側から見ると 99 番目の Phe と 100 番目の Leu の β シートの端の部分が、TtIPMDH-L134N では TtIPMDH よりも少し開いて、裏側の溝が広がっている(図 30)。

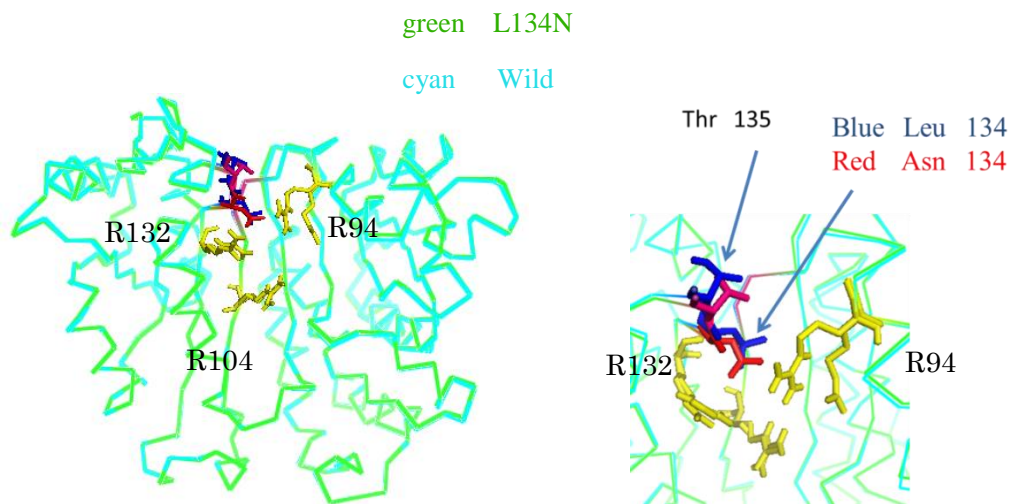


図 29 TiIPMDH と TiIPMDH-L134N の活性中心側から見た構造と活性中心近辺

水色が TiIPMDH の構造、Leu134 とその隣の Thr を青色で表示している。

緑色が TiIPMDH-L134N の構造、Asn134 とその隣の Thr を赤色で表している。

黄色 活性中心残基 (R94、R104、R132) を示す。

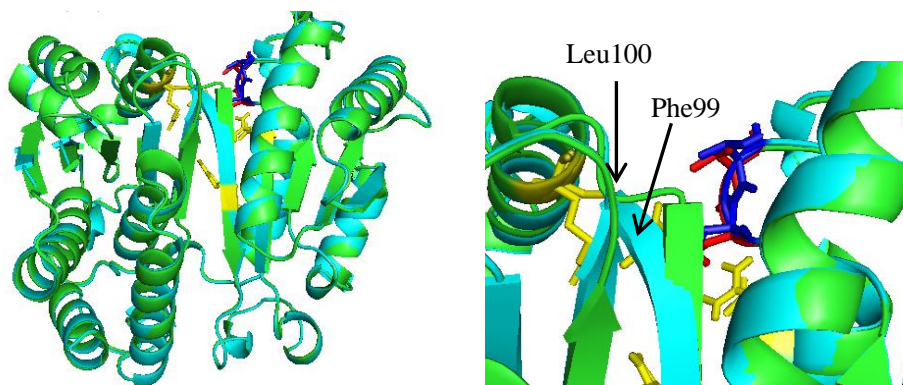


図 30 活性中心裏側からの構造 β シートの端の部分の構造が違う。

4.6 考察

Thermus thermophilus 由来の IPMDH とその 1 アミノ酸変異酵素で、熱安定性と耐圧性の関係を調べた結果。熱安定性が上昇している変異型酵素 TtIPMDH-L134N において耐圧性の低下がみられた。この結果は、これまで一般則とされてきた「熱安定性の高い酵素＝耐圧性の高い酵素」という考えは必ずしも正しくはなく、耐圧性と熱安定性は別の要因に起因していることが明らかとなった。変異酵素の中で、もっとも耐圧性の低下をしたのは、L134N 変異酵素と SUP4 (L134N/V181T/P324T/A335E) であるため、共通する L134N 変異が重要と考え、TtIPMDH-L134N 酵素を精製し、結晶化してその構造を野生型酵素と比較した。その結果、大きな構造的な変化は見られず、アミノ酸が置換されている 134 番目のアミノ酸とその隣の 135 番目 Thr の 2 つのアミノ酸残基にのみ違いがあることがわかった。熱安定性に着目をしてみると、元の TtIPMDH では、134 番目の Leu と 135 番目の Thr が少し奥に存在しているが、TtIPMDH L134N では、134 番目のアミノ酸が Asn に置換されることで、活性中心側にアミノ酸残基が移動し、その間を埋めるように 135 番目の Thr も手前に移動してきている。

水素結合を求めるプログラムである PIPE (<http://pipe.ibibiosolutions.com/>) で 2 つの構造を比較すると、TtIPMDH-L134N では、TtIPMDH と比べると主鎖－側鎖の水素結合が 20 か所、側鎖－側鎖の水素結合が 3 か所減少し、かわりに主鎖－主鎖の水素結合が 27 か所増加した。この水素結合の変化が、酵素の熱安定性の上昇に関与している一因であると考えられる。しかし、Asn¹³⁴、Thr¹³⁵ が手前に移動するとともに、裏側に存在する活性中心残基の溝が拡大をしている (図 27)。、*S. oneidensis* の野生型 IPMDH のように、この裏側の溝が拡大することで、高圧下での水和水の安定化が起こりやすくなっている可能と考えられる。今後、高圧での X 線結晶構造解析をすることで、この部分の構造の違いにより水分子が局在しやすくなっているか明らかになるものと考えられる。

TtIPMDH-L134N は 134 番目の Leu から Asn の 1 アミノ酸置換により、熱安定性は上昇したが、耐圧性は低下した。どちらも構造的な要因に起因をしているが、熱安定性の上昇は水素結合の増加が、耐圧性の低下は活性中心残基裏側の溝における水分子の局在のしやすさが影響を与えている可能性が示唆された。

第5章 総合考察

本研究では、深海微生物の酵素の高圧環境への適応メカニズムを明らかにするため、絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 の IPMDH を材料にその耐圧性が高い理由を明らかにすることを目的とした。

第2章において、*S. benthica* と常圧菌 *S. oneidensis* の IPMDH のキメラ酵素を作製することで、熱安定性・耐圧性に関与する領域が中央のアミノ酸配列にあることが示した。

第3章において、*S. benthica* と *S. oneidensis* の IPMDH に、1 アミノ酸置換を導入し、耐圧性と熱安定性を測定した結果を示した。SoIPMDH の 266 番目の Ser を SbIPMDH 型の Ala に置換すると、その耐圧性が著しく上昇した。反対に SbIPMDH の 266 番目の Ala を SoIPMDH 型の Ser に置換をすると耐圧性が低下した。この結果から、*Shewanella* IPMDH の高圧環境への適応は、266 番目の 1 アミノ酸残基に起因しており、活性中心の裏側にあるこの残基が重要であることが明らかとなった。野生型 SoIPMDH と SoIPMDH-S266A の X 線結晶構造解析の結果を比較すると、常圧下では変異が導入されている活性中心の裏側に構造的な大きな違いは見られない。ところが 580MPa の高圧条件下の構造になると、野生型の SoIPMDH の活性中心の裏側に 3 つの水分子の存在が観察され、SoIPMDH-S266A では水分子は観察できなかった。IPMDH はオープン構造とクローズド構造をとることが知られているが、今回、X 線結晶解析で調べた構造はクローズド構造である。観察された水和水は、クローズド構造を安定化することで、本酵素の律速段階として考えられているクローズド構造からオープン構造への変化を妨げて、結果的に活性を阻害しているものと考えられる。この描像は、高圧 X 線結晶構造解析をすることで初めて得られたものである。

フランスの Eric Girard 博士の 5 種類のアーキア由来の MDH の酵素の耐圧性と高圧結晶構造解析の結果によると、活性中心の裏側の溝に高圧で水分子が入る隙間のない MDH は、加圧下の活性は常圧よりも高くなり、高圧で水分子が多く侵入する MDH ほど、耐圧性が低い(72)。したがって、活性中心の裏側への水分子の侵入のしやすさは、酵素の高圧下の活性を決める共通原理である可能性が示唆される。今後、IPMDH や MDH 以外の酵素でも、酵素の高圧下の活性と高圧 X 線

結晶構造解析により高圧下での水分子の局在を調べることで、タンパク質の高圧活性は活性中心裏側への水分子の侵入の影響が原因なのか、一般則が明らかにされることが期待される。また、活性中心残基の裏側の溝の部分に水が入りにくいような構造、もしくは、入っても水分子が安定化できない構造を作り出すことができれば、活性化体積を減少することができ加圧下の活性が高くなるような酵素も作り出すことが可能であると考えられる。

第4章において、*Thermus thermophilus* 由来の IPMDH とそのアミノ酸置換変異酵素で、熱安定性と耐圧性の関係を調べた結果を示した。熱安定性を上昇させた変異酵素である TtIPMDH-L134N の耐圧性を野生型の TtIPMDH と比較すると、耐圧性が低下していた。これらの結果から、IPMDH の熱安定性と耐圧性の間には相関関係はないことが明らかとなった。結晶構造解析の結果から、TtIPMDH-L134N の活性中心残基の裏側の溝が若干広がっている様子が観察された。*Shewanella* 属の IPMDH の結果を参照すると、おそらくこの溝の大きさが耐圧性に関与しているものと考えられる。今後、高圧 X 線結晶構造解析を利用することで、水分子の様子を観察することができれば、耐圧性機構がより明らかになるものと考えられる。

本研究で対象とした *Shewanella* 属および *Thermus thermophilus* 由来の IPMDH では、耐圧性と熱安定性には相関がみられなかった。耐圧性の違いは、活性中心残基近傍のアミノ酸の性質の違いに起因し、活性中心の裏側にある溝の部分への高圧での水分子の侵入のしやすさに起因して、反応速度の違いとして表れたものである。これに対して、熱安定性はタンパク質分子全体が関与する協同的な構造変化である。従来、耐圧酵素は熱安定性が高いという考えがあったが、このように考えると、酵素活性の耐圧性と、分子全体の立体構造の熱安定性の間に相関がみられないことは、むしろ、自然なことであると思われる。

参考文献

1. 掘越 弘毅, 井上 明 ベーシックマスター 微生物学 オーム社(2006).
2. 伊藤 政博, 鳴海 一成, 佐藤 孝子, 中村 聡, 東端 啓貴, 國技 武和, 為我井 秀行, 道久 則之, 伊藤 隆 極限環境生命—生命の起源を考え、その多様性に学ぶ コロナ社(2014).
3. 大島 泰郎 極限環境の生き物たち ～なぜそこに棲んでいるのか～ 技術評論社(2012).
4. 赤沼哲史, 山岸明彦 好熱菌のタンパク質はなぜ熱に強い, 生化学第 81 巻第 12 号, pp.1064—1071, (2009).
5. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 335-50.(1987).
6. 掘越 弘毅 極限微生物と技術革新 (2012).
7. Horikoshi, K. Extremophiles handbook. Horikoshi K, Antranikian G, Bull A, Robb F, Stetter K, editors. Extremophiles Handbook. Tokyo: Springer-Verlag. 163-181(2011).
8. C.E.Zobell.and R.Y. Morita: *J Bacteriol*, **73**.563 (1957).
9. Yayanos AA, Dietz AS, VAN Boxtel R. *Science* Vol. **205** No. 4408 , 808-810 (1979)
10. Yayanos, AA. S. Dietz, and R. Van Boxtel. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* Vol. **78**, No.8, 5212-5215, (1981).
11. Kato C. Extremophiles handbook. In: Horikoshi K, Antranikian,G, Bull A, Robb F, Stetter K, editors. Extremophiles Handbook.,Tokyo: Springer-Verlag; p. 643–655(2011).
12. 加藤千明 深海生物の圧力耐性機構 進化する食品高圧加工技術 NTS P65～84(2013).
13. Kato C, Li L, Nogi Y, Nakamura Y, Tamaoka J, Horikoshi K.,Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench,Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Microbiol.* **64**:1510–1513(1998).

14. Nogi, Y., Kato, C. and Horikoshi, K. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate. *Microbiol.* **170**, 331~338 (1998).
15. Aono E, Baba T, Ara T, Nishi T, Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Tomita M, Kato C, Oshima T, Nakasone K, Mori H, Complete genome sequence and comparative analysis of *Shewanella violacea*, a psychrophilic and piezophilic bacterium from deep sea floor sediments. *Mol Biosyst.* 1216-26 (2010).
16. A. Vezzi, S. Campanaro, M. D'Angelo, F. Simonato, N. Vitulo¹, F. M. Lauro, A. Cestaro, G. Malacrida, B. Simionati, N. Cannata, C. Romualdi, D. H. Bartlett, G. Valle. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* Vol. **307** no. 5714 1459-1461(2005).
17. Bartlett D, Wright M, Yayanos AA, Silverman M, Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature.* **342**(6249), 572-4(1989).
18. Nakasone K, Ikegami A, Kato C, Usami R, Horikoshi K. Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms. *Extremophiles.* **2**(3), 149-54(1998).
19. Ikegami A, Nakasone K, Fujita M, Fujii S, Kato C, Usami R, Horikoshi K. Cloning and characterization of the gene encoding RNA polymerase sigma factor sigma(54) of deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*. *Biochim Biophys Acta.* **1491**(1-3), 315-20(2000).
20. Nakasone K, Ikegami A, Kawano H, Kato C, Usami R, Horikoshi K. Transcriptional regulation under pressure conditions by RNA polymerase sigma54 factor with a two-component regulatory system in *Shewanella violacea*. *Extremophiles.* **6**(2) Review, 89-95(2002).
21. Tamegai H, Kawano H, Ishii A, Chikuma S, Nakasone K, Kato C. Pressure-regulated biosynthesis of cytochrome bd in piezo- and psychrophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles.*; **9**(3).247-53(2005).

22. Yamada M, Nakasone K, Tamegai H, Kato C, Usami R, Horikoshi K. Pressure regulation of soluble cytochromes c in a deep-Sea piezophilic bacterium, *Shewanella violacea*. *J Bacteriol.* **182** (10),2945-52 (2000).
23. Marquis RE. High-pressure microbial physiology. *Adv Microb Physiol.* **14**(11), 159-241(1976).
24. Ishii A, Sato T, Wachi M, Nagai K, Kato C. Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers in vivo and in vitro. *Microbiology.***150**(Pt 6),1965-72(2004).
25. Ishii A, Nakasone K, Sato T, Wachi M, Sugai M, Nagai K, Kato C. Isolation and characterization of the dcw cluster from the piezophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea*. *J Biochem.* ;**132**(2),183-8(2002).
26. DeLong EF, Yayanos AA. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science.* **228**(4703),1101-3(1985).
27. DeLong EF, Yayanos AA. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Appl Environ Microbiol.***51**(4),730-7(1986).
28. Ohmae, E., Kubota, K., Nakasone, K., Kato, C. and Gekko, K. Pressure-Dependent Activity of Dihydrofolate Reductase from a Deep-Sea Bacterium *Shewanella violacea* Strain DSS12. *Chem. Lett.* **33**, 798-799(2004).
29. Murakami C, Ohmae E, Tate S, Gekko K, Nakasone K, Kato C. Cloning and characterization of dihydrofolate reductases from deep-sea bacteria. *J Biochem.* **147**(4),591-9(2010).
30. Murakami C, Ohmae E, Tate S, Gekko K, Nakasone K, Kato C. Comparative study on dihydrofolate reductases from *Shewanella* species living in deep-sea and ambient atmospheric-pressure environments. *Extremophiles.* **15**(2), 165-75(2011).
31. 原崇. アレルゲン低減化 進化する食品高圧加工技術 NTS 151-160(2013).
32. 野口 琢史, 野口賢二郎, 森川篤史.まるごとエキス開発事例. 進化する食品高圧加工技術

NTS P261～269(2013).

33. 重松 亨. 高圧食品加工技術の特徴, 進化する食品高圧加工技術 NTS P17～21(2013).
34. Meersman F, Heremans K High hydrostatic pressure effects in the biosphere: from molecules to microbiology. In C Michiels, D. H. Bartlett, and A. Aertsen, High-pressure microbiology. ASM Press. (2008).
35. 赤坂一之, 前野覚大, タンパク質 進化する食品高圧加工技術 NTS P41～50(2013).
36. 山本和貴 澱粉の高圧処理 進化する食品高圧加工技術 NTS P23～37(2013).
37. 木戸みゆ紀, 重松 亨 米粉製造への高圧処理の応用 進化する食品高圧加工技術 NTS P133～140(2013).
38. Ohmae E, Miyashita Y, Tate S, Gekko K, Kitazawa S, Kitahara R, Kuwajima K. Solvent environments significantly affect the enzymatic function of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: comparison of wild-type protein and active-site mutant D27E. *Biochim Biophys Acta*. **1834**(12).2782-94(2013).
39. Yoko Hayashi-Iwasaki, Tairo Oshima, Purification and characterization of recombinant 3-Isopropylmalate dehydrogenases from *Thermus thermophilus* and other microorganisms. *Methods in Enzymology* **324**, 301–322 (2000).
40. Rajesh Kumar Singh, Georgia Kefala, Robert Janowski Christoph Mueller-Dieckmann, Jens-Peter von Kries and Manfred S. Weiss The High-resolution Structure of LeuB (Rv2995c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* **346**.1–11 (2005).
41. Nagae T, Kawamura T, Chavas LM, Niwa K, Hasegawa M, Kato C, Watanabe N. High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **68**(Pt 3), 300-9(2012).
42. Nagae, T., Kato, C., Watanabe, N. Structural analysis of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the obligate piezophile *Shewanella benthica* DB21MT-2 and the nonpiezophile *Shewanella oneidensis*

- MR-1. *Acta Cryst. F* **68**, 265–268(2012).
43. Angelo Merli, Karuppasamy Manikandan, Eva Graczer, Linda Schuldt, Rajesh Kumar Singh, Peter Zavodszky, Maria Vas, Manfred S. Weiss. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of various enzyme–substrate complexes of isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* (2010).
 44. Steven Hayward. Identification of Specific Interactions that Drive Ligand-induced Closure in Five Enzymes with Classic Domain Movements. *J. Mol. Biol.* **339**, 1001–1021 (2004).
 45. Antony M. dean, Laura Dvorak. The role of glutamate 87 in the kinetic mechanism of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase. *Protein Science*, **4**, 2156-2167 (1995).
 46. Eva Graczer, Corinne Lionne, Peter Zavodszky, Laurent Chaloin and Maria Vas, Transient kinetic studies reveal isomerization steps along the kinetic pathway of *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase *FEBS J.* **280**(8),1764-72(2013).
 47. Gerlind Wallon, Kazutaka Yamamoto, Hiromi Kirino, Akihiko Yamagishi, Susan T. Lovetta, Gregory A. Petsko and Tairo Oshima. Purification, catalytic properties and thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1337**, 105-112(1997).
 48. Adam Svingor, Jozsef Kardos, Istva'n Hajdu, Attila Nemeth, Peter Zavodszky. A Better Enzyme to Cope with Cold. *BIOLOGICAL CHEMISTRY* , **276**, 30, 28121–28125(2001).
 49. Gerlind Wallon, Gitay Kryger, Susan T. Lovett, Tairo Oshima, Dagmar Ringe Gregory A. Petsko Structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-Isopropylmalate Dehydrogenase and Comparison with their Thermophilic Counterpart from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **266**, pp1016-1031(1997).
 50. Watanabe, K., and Yamagishi, A. The effects of multiple ancestral residues on the *Thermus*

- thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase. *FEBS Letters*, **580**, 3867–3871(2006).
51. Ohkuri, T., and Yamagishi, A. The effects of mutations at position 253 on the thermostability of the *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase subunit interface. *J. Biochem.* **141**, 791–797(2007).
 52. Yasugi, M., Amino, M., Suzuki, T., Oshima, T., and Yamagishi, A. Cold adaptation of the thermophilic enzyme 3-isopropylmalate dehydrogenase. *J. Biochem.* **129**, 477–484(2001).
 53. Motono C, Yamagishi A, Oshima T. Urea-induced unfolding and conformational stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the Thermophile *Thermus thermophilus* and its mesophilic counterpart from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **38**(4), 1332-7 (1999).
 54. Akanuma S, Yamagishi A, Tanaka N, Oshima T. Further improvement of the thermal stability of a partially stabilized *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase variant by random and site-directed mutagenesis. *J Biochem.* **260**, 499-504 (1999).
 55. Yoko Hayashi - Iwasaki, Koichi Numata, Akihiko Yamagishi, Katsuhide Yutani, Masahiro Sakurai, Nobuo Tanaka, Tairo Oshima. A stable intermediate in the thermal unfolding process of a chimeric 3 - isopropylmalate dehydrogenase between a thermophilic and a mesophilic enzymes. *Protein Science*. **5**, 511–516(1996).
 56. Eva Graczer, Andrea Varga, Bogdan Melnik, Gennady Semisotnov, Péter Zs´vodszy, and Maria Vas.. Symmetrical Refolding of Protein Domains and Subunits: Example of the Dimeric Two-Domain 3-Isopropylmalate Dehydrogenases. *Biochemistry* **48**, 1123–1134(2009).
 57. Masako Yasugi, Momoyo Amino, Toshiharu Suzuki, Tairo Oshima and Akihiko Yamagishi. Cold Adaptation of the Thermophilic Enzyme 3-Isopropylmalate Dehydrogenase. *Biochemistry* **129**, 3. 477-484(2000).
 58. Masako Yasugi, Toshiharu Suzuki, Akihiko Yamagishi, Tairo Oshima Analysis of the effect of accumulation of amino acid replacements on activity of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *PEDS* **14**, Issue 8, 601-607 (2001).

59. Hirose, R., Suzuki, T., Moriyama, H., Sato, T., Yamagishi, A., Oshima, T., and Tanaka, N. Crystal structures of mutants of *Thermus thermophilus* IPMDH adapted to low temperatures. *Protein Eng.*, **14**, 81-84(2001).
60. Gráczér E, Varga A, Hajdú I, Melnik B, Szilágyi A, Semisotnov G, Závodszy P, Vas M. Rates of unfolding, rather than refolding, determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic, and psychrotrophic 3-isopropylmalate dehydrogenases. *Biochemistry*. **41**. 11536-49 (2007).
61. Sayaka Hayashi, Satoshi Akanuma, Wakana Onuki, Chihiro Tokunaga, and Akihiko Yamagishi. Substitutions of Coenzyme-Binding, Nonpolar Residues Improve the Low-Temperature Activity of Thermophilic Dehydrogenases. *Biochemistry*, **50** (40), 8583–8593(2011).
62. Kato C, Nogi Y. Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol Ecol*, **35**(3), 223-230 (2001).
63. Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA, MacGregor BJ, Ringelberg DB, White DC, Nishijima M, Sano H, Burghardt J, Stackebrandt E, Nealson KH. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. *Bacteriol*. **49**, 705–724(1999).
64. de Poorter, L. M. I., Suzaki, Y., Sato, T., Tamegai, H. and Kato, C. Effects of pressure on the structure and activity of isopropylmalate dehydrogenases from deep-sea *Shewanella* species. *Biotechnol*. **6**, 190-194(2004).
65. Kasahara R, Sato T, Tamegai H, Kato C. Piezo-adapted 3-isopropylmalate dehydrogenase of the obligate piezophile *Shewanella benthica* DB21MT-2 isolated from the 11,000-m depth of the Mariana Trench. *Biosci Biotechnol Biochem*. **73**(11), 2541-3 (2009).
66. 濱島裕輝 2009年度卒業研究 深海由来の好冷好圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性について
67. <http://imagej.nih.gov/ij/> (imagej ウェブサイト)
68. Masanari M, Wakai S, Tamegai H, Kurihara T, Kato C, Sambongi Y. Thermal stability of cytochrome

- c₅ of pressure-sensitive *Shewanella livingstonensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **75**(9),1859-61(2011).
69. PETER C. MICHELS. DOUGLAS S. CLARK. Pressure-Enhanced Activity and Stability of a Hyperthermophilic Protease from a Deep-Sea Methanogen. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3985–3991 (1997).
 70. 青山 好男,朝賀 昌志,中西 律子,村井 恵子.高圧処理による酸化酵素の失活—加熱との比較—,東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, **21** 57–64(1996).
 71. Katrusiak, A. and Dauter, Z. Compressibility of lysozyme protein crystals by X-ray diffraction. *Acta Cryst. D***52**,607-608(1996).
 72. Louise Lassalle, Sylvain Engilberge, Dominique Madern, Bruno Franzetti, Eric Girard, High-Pressure and Functional Studies of Glyoxylate-Hydroxypyruvate Reductases from Different Thermococcal Species Indicate Clue to Understanding the Energy Metabolism of Deep Sea Archaea 10th International Congress on Extremophiles POSTER PRESENTATIONS(2014).

謝辞

本論文は筆者が立教大学大学院理学研究科生命理学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

本研究にあたり 6 年間にわたって、公私にわたってご指導とご鞭撻をいただき、さまざまな学会にも連れて行ってくださり、非常に多くのことを勉強させていただいた、独立行政法人海洋研究開発機構の加藤千明博士に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、酵素活性の測定法・酵素の保存法・活性データの計算方法など非常に多くのご指導とご鞭撻をいただき、3 年間研究室に暖かく迎え入れていただきました山田康之准教授に心より感謝申し上げます。

学部 1 年生の時より、理数教育企画・立教理工工房といったサークル活動の支援をしていただき、4 年次には研究室の学生として海洋研究開発機構の加藤千明博士を紹介して本研究テーマを行うきっかけをくださった故・今井竹夫名誉教授に心より感謝申し上げます。

本研究のタンパク質の X 線結晶構造解析・高圧 X 線結晶構造解析の測定で大変お世話になり、酵素の結晶化方法などさまざまな実験手法を教えてくださいました。名古屋大学大学院工学研究科 化学・生命工学専攻 生物機能工学分野シンクロトロン光研究センターの渡邊信久教授・永江峰幸特任助教に心より感謝申し上げます。

本研究の高圧下での活性化体積の計算や、高圧での蛍光測定、ストップフロー装置の使い方などアドバイスをたくさんいただきました広島大学理学研究科数理分子生命理学専攻 生命理学講座 大前英司助教に心より感謝申し上げます。

Thermus thermophilus 由来の IPMDH とその変異酵素・*E.coli* MA153 株を提供してくださり、IPMDH の研究者として、実験方法について様々なアドバイスをさせていただきました東京薬科大学生命科学部分子生命科学科山岸明彦教授・赤沼哲史助教に心より感謝申し上げます。

海洋研究開発機構にて高圧分光光度計の操作方法を教えてください、高圧で活性測定の Buffer

の選択方法を教えていただきました青山学院大学理工学部化学・生命科学科の阿部文快准教授に心より感謝申し上げます。

ストップフロー装置の使い方を背中で教えていただき、ストップフロー実験をいつもサポートしていただいている牧野龍名誉教授に心より感謝申し上げます。

枯草菌を使った、*leuB* 遺伝子の発現系の構築方法を教えていただいた、河村研究室の河村富士夫名誉教授・鈴木祥太博士・田上和美博士に心より感謝申し上げます。

博士論文作成にあたり、多大なアドバイスをしてくださった花井亮教授に感謝を申し上げます。

極限環境生物学会にて、毎年ポスターを見て研究に的確なアドバイスをくださる極限環境生物学会大島泰郎会長に心より感謝申し上げます。

極限環境生物学会・生化学会・農芸化学会・特殊環境微生物セミナーなどで顔を合わせるたびに、公私にわたってアドバイスをくださる近畿大学工学部化学生命工学科の仲宗根薫教授、京都大学環境物質化学研究系分子微生物科学系の栗原達夫教授・川本純助教、東洋大学生命科学部生命科学科極限環境生命科学研究室の伊藤政博教授、東京大学生物生産工学研究センター 微生物機能代謝工学研究室的古園さおり特任准教授、日本大学理学部化学科生物化学系の為我井秀行教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、海洋研究開発機構の加藤研究室のメンバーとして様々な研究サポートをしていただいた、独立行政法人海洋研究開発機構の佐藤孝子博士、関口峻允博士（現・日本水産株式会社）、北里大学大学院海洋生命科学研究科水圏生態学研究室 吉成麻有さん、卒業生の座間千夏さん、坂本 詩織さん、太田裕也君に心より感謝申し上げます。本研究の前任者であり、公私にわたってお世話になりました板橋区立教育科学館の須崎泰央さんに感謝申し上げます。

海洋研究開発機構での研究時にアドバイスをいただきました、独立行政法人海洋研究開発機構の丸山正博士、藤倉克則博士、小山純弘博士、能木裕一博士、古島靖夫博士、瀧下清貴博士、矢吹彬憲博士、嶋根康弘博士、臼井けい子博士、開 俊樹博士(現・自治医科大学)に心より感謝申し上げます。

今井研究室のメンバーとして実験を指導していただきました。小澤由希子博士、小田良さん、興石 武さんに心より感謝申し上げます。TiIPMDH の基礎データの収集を行った新沼理紗さんにお礼をお申し上げます。アドバイスをいただきました上野裕子博士、高橋典男さん、鈴木安奈さん、山岡麻美さん、同期の遠藤司君、大島裕果さん、油木隼君に感謝を申し上げます。今井研卒研究生のみなさんにお礼を申し上げます。

山田研究室のメンバーとして、迎え入れてくださった石川透君、多賀名智昭君、福石健太君に心より感謝申し上げます。山田研のメンバーとして研究室をサポートしてくれている、岡村歩美さん、尾崎杏奈さん、高田浩志君、そして卒研究生のみなさんにお礼を申し上げます。

試薬を貸していただいたり、装置の使い方を教わったり、実験にアドバイスを下さったりと、立教大学での研究をさまざまな面で支援してくださったすべての先生方にこの場をもって感謝を申し上げます。

最後に、26 年間育てていただき、21 年間にわたる立教での生活をささえ、博士課程の進学も認めてくれた両親に感謝するとともに、亡くなる最後の瞬間まで研究内容に理解を示して、生活面・研究面で惜しみない支援を日々に続けてくれた母・濱島優子に心から感謝をいたします。

2014 年 11 月 30 日