

称号及び氏名 博士（ 理学 ） 山本 等

学位授与の日付 平成21年 3月31日

論文名 「好熱菌由来酵素の耐熱化機構」

論文審査委員 主査 多田 俊治
副査 徳富 哲
副査 藤井 郁雄

論文要旨

第一章 緒論

高温環境で生育する生物種由来のタンパク質は一般的にそれ自身が高い耐熱性を有している。その構造安定化要因としては、イオン結合、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力などのさまざまな相互作用の増加、変性状態でのエントロピーの低下、多量体形成などがあり、タンパク質全体の安定性はこれらの総和によって決定される。タンパク質の機能はその立体構造により実現されており、進化的に保存されている酵素では一般的にその基本フォールドも保存されている。そのため、高温で生育する生物種由来タンパク質のアミノ酸の一次構造は、基本フォールドを保存しつつ同時に高い安定性を有するように巧みに設計されていると言える。タンパク質内部残基は隣り合う残基と多くの相互作用を成していることから、それらの変異はフォールド変化ひいては活性低下を引き起こす可能性があり、変異許容度は低いと考えられる。一方、タンパク質表面残基については周辺の相互作用が少なくより多くの変異が許容され、立体構造変化を伴いにくいと考えられる。

本研究では、好熱菌由来タンパク質の耐熱化機構について知見を得るため、超好熱菌 *Methanococcus jannaschii* 由来エノラーゼ・MJ0232、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素スーパーファミリー酵素・PH1421、および高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来グルコース-6-リン酸イソメラーゼ・TtGPI のX線結晶構造解析および物理化学・生化学的手法による溶液構造の解析を行い、得られた立体構造情報を元に構造安定化要因の評価を行った。

第二章 超好熱菌由来エノラーゼの構造

エノラーゼは、解糖系において2-ホスホグリセリン酸からホスホエノールピルビン酸への脱水反応を触媒する酵素である。さまざまな生物種に由来する多くのエノラーゼは何れも約430個のアミノ酸残基よりなり、相同性は約40%以上と進化的に高度に保存されている。また、その活性分子種は二量体であることが知られている。本章では、超好熱古細菌 *M. jannaschii* (最高生育温度 90°C) 由来エノラーゼ MJ0232 の立体構造をX線結晶構造解析により決定し、構造安定化要素の解明を行った。分子置換法による構造解析の結果(分解能 1.85 Å、R = 17.0%)、サブユニットの基本フォールドもこれまでに見いだされたものと同様であり、ラージおよびスモールの二つのドメインからなっていることが明らかになった。ホモ二量体構造が結晶学的非対称単位を形成していたが、結晶学的対称操作によってこれら二量体が展開され、結果として環状の八量体構造の形成が見出された。これら会合面での接触面積

を求めたところ、環状八量体構造は安定な会合体であることが示唆された。また、溶液中での会合体構造につき動的散乱法により解析したところ、八量体に相当する分子量を示すことが明らかとなった。これらのことから、この会合構造が高温環境下での熱安定性に重要な役割を担っているものと推定した。本知見に基づいて、他生物種由来エノラーゼの既報の結晶構造を検討したところ、腸球菌 *E. hirae* および肺炎連鎖球菌 *S. pneumoniae* 由来エノラーゼにおいても保存されていることが明らかになった。*S. pneumoniae* 由来エノラーゼは細胞内および細胞表面という二つの異なる環境に存在して機能することが報告されており、安定な構造形成が要求されているものと考えられた。

第三章 超好熱菌由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素スーパーファミリー酵素の構造

超好熱菌 *P. horikoshii* OT3 (最高生育温度 98°C) 由来ハロ酸ハロゲン化酵素スーパーファミリーに属する酵素、PH1421 (231 アミノ酸残基) は、アミノ酸配列から中等度好熱菌 *T. acidophilum* (最高生育温度 65°C) 由来二量体酵素 2-ホスホグリセリン酸脱リン酸化酵素 TA0175 (224 残基) のホモログであることが示唆され、その機能は脱リン酸化であると推定されている。PH1421 は、他生物種由来ホモログと 30% 前後の相同性を示していることから、基本フォールドは保存されているものと考えられる。ディスプレイ法を用いた多波長異常分散法により構造を決定した (分解能 1.85 Å、R = 17.0%)。その結果、PH1421 は TA0175 と同様のホモ二量体構造をもっていること、プロトマーの基本フォールドは TA0175 と同じであり、脱リン酸化反応を行うコアドメインおよび基質特異性を担うキャップドメインの二つのドメインからなっていることが明らかとなった。また、両ドメインは 2 本のフレキシブルループによりリンクされており、オープン/クローズ構造をとる可能性が示唆された。コアドメイン会合面には疎水性コアが存在し、キャップドメインは他方のプロトマーのコアドメインと接触していた。動的散乱実験の結果、溶液中では二量体を形成していることがわかった。そこで両酵素の二量体構造の安定性を会合面における相互作用様式および会合理没面積から評価したところ有意な差はなかった。一方、プロトマーの構造を比較した結果、PH1421 は TA0175 よりもプロトマーの安定性が高く、その構造安定化因子として、(1) 疎水性相互作用の増加、(2) アミノ酸組成改善による変性エントロピーの減少、および (3) イオンペア数の増加、が挙げられた。TA0175 では正の協同性が見られ高い基質特異性を示すことから、PH1421 の二量体会合形成も構造安定性への寄与ではなく、主に酵素触媒機能に関わるものであると考えられた。

第四章 高度好熱菌由来グルコース-6-リン酸イソメラーゼの構造

グルコース-6-リン酸異性化酵素 (GPI) は解糖系の 2 番目に位置する酵素である。哺乳類細胞内 GPI (mGPI; 約 560 アミノ酸残基) は、溶液中で安定な二量体構造を形成しているものと推定されている。また、これまでに報告された立体構造においても、活性部位は 2 つのプロトマーに由来するアミノ酸により構成されており、二量体形成が GPI 活性に必須であることが示唆されている。一方、中等度好熱菌由来 GPI (445 残基) では溶液中で四量体をとることが報告されている。*T. thermophilus* HB8 (最高生育温度 75°C) 由来 GPI・TtGPI は、全長 415 残基から成り最小の GPI の部類に属する。X 線結晶構造解析は、白金誘導体結晶を用いた単波長異常分散法により行った (分解能 1.95 Å、R = 18.5%)。その結果、基本構造は mGPI と同様のホモ二量体構造であり、プロトマーのフォールドは mGPI と同様で、ラージおよびスモール二つのドメインからなっていることが明らかとなった。プロトマーの相対配置は保存されており、N 末端、C 末端およびフック領域が互いに他方のプロトマーを抱きかかえるように会合していた。しかし本酵素では、mGPI 二量体会合において重要な役割を担っている N 末端の 50 残基および C 末端の 30 残基に相当する部分が欠失しており、フック領域の構造が異なっていることが見出された。さらに、興味深いことに二量体の安定性に重要と考えられていた残基が保存されていないことも明らかとなった。そこで、溶液中での多量体構造を動的散乱

乱、平衡沈降法、ゲル濾過、化学架橋法により解析したところ、*Tt*GPI二量体の会合は弱く ($K_d = 0.37 \cdot M$)、溶液中では交換速度の速い単量体-二量体の動的平衡にあることが明らかになった。耐熱性の由来を評価したところ、*Tt*GPIはプロトマーが安定化されており、構造安定化因子として、(1)ポリペプチド鎖長の減少、アミノ酸組成変化による変性エントロピーの減少、(2)イオンペア数の増加、および(3)タンパク質内ファンデルワールス相互作用の増加、が挙げられた。これらのことから、GPI活性には安定二量体形成は必須ではなく、活性二量体の一時的生成で十分である可能性が示唆された。

第五章 総論

本研究では、好熱菌由来酵素の耐熱化機構について知見を得ることを目的とし、3種の酵素の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにした。さらにその構造安定化要因および溶液中での多量体構造について検討しその役割を考察した。その結果、超好熱菌由来であり、構造進化的に高度に保存されている酵素であるエノラーゼ MJ0232 では、タンパク質表面残基を改変して環状八量体を形成することで高い耐熱性得ている可能性が示唆された。また、超好熱菌由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素スーパーファミリー酵素 PH1421 では中等度好熱菌由来の2-ホスホグリセリン酸脱リン酸化酵素 TA0175 に比べ、プロトマーの内部残基の改変によりプロトマー自体の耐熱性を向上させており、二量体形成による安定化にはそれほど違いがないことが考えられた。高度好熱菌由来グルコース-6-リン酸イソメラーゼ *Tt*GPI では哺乳類由来のGPIに比べ、プロトマーの内部残基の改変によりプロトマー自体の耐熱性を向上させ酵素全体の耐熱化を図っているが、その結果、二量体の安定性は逆に低下していることが示唆された。本研究により、酵素の耐熱化戦略は一樣ではなく、高次多量体形成やプロトマー内での相互作用の増加、変性状態エントロピーの低下、キャビティー体積の減少など、さまざまな方法が用いられていることを明らかにした。また、本研究で得られた知見は、産業上有用な耐熱性酵素の設計・開発に応用できるものと考えられる。

審査結果の要旨

タンパク質の機能はその立体構造により実現されており、進化的に保存されているタンパク質では一般的に基本フォールドも保存されている。そのため、高温で生育する生物種由来タンパク質のアミノ酸の一次構造は、基本フォールドを保存しつつ同時に高い熱安定性を有するように構築されている。しかし、タンパク質の耐熱化がどのような分子設計指針によっているのかは、タンパク質フォールド問題にも繋がる重要な課題であるにも関わらず、未解明のままである。本学位論文は、3種の好熱菌由来酵素タンパク質の耐熱化機構に関して、構造生物学の観点から検討した結果を取り纏めたものである。

第二章では、超好熱菌由来エノラーゼの構造について検討している。エノラーゼは、解糖系において2-ホスホグリセリン酸からホスホエノールピルビン酸への脱水反応を触媒する酵素である。多くの生物において、活性分子種は二量体であることが知られている。しかし、本酵素は八量体構造をもつことを見出し、会合体形成による耐熱化が図られていることを明らかにした。

第三章では、超好熱菌由来ハロ酸脱ハロゲン化酵素スーパーファミリー酵素の構造について検討している。結晶構造は放射光を用いた多波長異常分散法により決定している。その結果、二量体構造は酵素活性を発現するために必要な構造であり、耐熱化は単量体の構造内で

の相互作用の増加によるものであることを明らかにした。

第四章では、高度好熱菌由来グルコース-6-リン酸イソメラーゼの構造について検討している。本酵素は解糖系の2番目に位置し、細胞内では安定な二量体構造を形成しているものと推定されている。構造解析は単波長異常分散法により行っている。動的光散乱、平衡沈降法、化学架橋法などによる溶液中での多量体構造解析も行い、交換速度の速い単量体-二量体の動的平衡にあることを明らかにした。これらの結果から、単量体構造の熱安定性が向上しており、酵素活性には安定二量体形成は必須ではなく一時的生成で十分であるという極めて興味深い結論を導き出した。

以上のように、本論文は、酵素タンパク質の構造機能相関への理解を深めており、構造生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士（理学）の学位を授与するに相当すると結論した。