

論文内容の要旨

氏名	はた 秦	かず 和	み 澄
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	工第17号		
学位授与の日付	平成21年3月21日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	深海微生物 <i>Moritella profunda</i> 由来ジヒドロ葉酸還元酵素の立体構造と熱力学特性		
論文審査委員 (主査)	教授	橘	秀 樹
	(副主査)	教授	赤 坂 一 之
	(副主査)	教授	泉 井 桂

深海は水温が4℃以下ならびに圧力が数百気圧以上に及ぶ低温かつ高圧の環境である。深海に生息する生物の蛋白質は、そのような低温・高圧環境でも変性せずに活性を保持する何らかの耐性機構を持っている筈である。ここに審査に付された秦和澄の研究は、温度2℃ならびに圧力28 MPa (約280気圧)の環境に生息する深海微生物 *Moritella profunda* 由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (MP-dihydrofolate reductase, MP-DHFR) の結晶化を試み、その立体構造をX線結晶解析によって明らかにし、さらに高圧NMR法を用いてMP-DHFRの立体構造の熱力学的安定性を調べたものである。

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) はNADPHを補酵素とし、ジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に還元する酵素である。テトラヒドロ葉酸は補酵素として核酸およびアミノ酸の代謝に必須の分子であり、それを生成するジヒドロ葉酸還元酵素もまた必要不可欠な蛋白質である。多くの生物種由来のジヒドロ葉酸還元酵素について、その1次構造・立体構造・酵素機能の研究が行われている。しかし、深海微生物由来のジヒドロ葉酸還元酵素のX線結晶解析による立体構造の解明はこの研究が初めてであり、またそもそも深海生物由来の蛋白質のX線結晶解析としてもこの研究は世界で2例目となるものである。

まず、本論第1章に述べるように、*Moritella profunda* を始め全部で17種の深海微生物、およびコントロールとしての *Escherichia coli* (大腸菌) 由来のクローン化されたジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子の、大腸菌内での発現を行った。発現産物のDHFR蛋白質は、微生物種によって可溶性画分あるいは不溶性画分、あるいはその両者に見られた。このうち、可溶性画分に十分量の発現が見られたのは *Escherichia coli* 以外では、*Moritella profunda*、*Moritella japonica*、*Shewanella violacea* の3種のDHFRであった。すでにX線結晶解析によって立体構造が報告されている *Escherichia coli* DHFR を除いた残り3種のDHFRについて、MTXアガロース・陰イオン交換・ハイドロキシアパタイト・ゲルろ過などのカラムクロマトグラフィにより目的蛋白質の精製を行った。精製DHFRの収量は、10リットルの培養液あたり5 mg から19 mg であった。

次に、基質アナログの葉酸ならびにNADP⁺を含む状態で、これら3種のDHFRの結晶化を試みている。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、4℃、1気圧で行った。結晶化溶液条件のスクリーニングの結果、*Moritella profunda* DHFR (MP-DHFR) においてのみ、0.2 M ammonium acetate, 0.1 M sodium citrate, pH

5.6, 15% w/v polyethylene glycol 4,000, 0.1 M hexamine cobalt chloride の溶液条件下で、X線結晶解析に用いることが出来るような良質の結晶が得られた。

理化学研究所 播磨研究所 放射光科学総合研究センター ビームライン 26B1 を用いて、このMP-DHFR単結晶のエクス線回折実験を行った。結晶構造は空間群 $C22_1$ に属しており、単位格子長は $a = 56.598$, $b = 77.458$, $c = 159.819$ Å であった。2.0 Å 分解能までの回折斑点を用い、既知のEC-DHFRの立体構造を基に分子置換法によりMP-DHFRの立体構造を決定した。

その結果、非対称単位内に2分子のMP-DHFRと292個の水分子が存在しており、MP-DHFR 1分子は4本の α -ヘリックスと10本の β ストランドから構成されていることがわかった。この主鎖構造はこれまでに立体構造が報告されているヒト、マウス、大腸菌など常圧環境下で生息する16生物種のDHFRの主鎖構造とよく似ていた。大腸菌DHFR (EC-DHFR)の主鎖構造と比べると、対応原子間の root mean square deviation (RMSD)は0.920 Å であった。部位別に見ると、 α -ヘリックスや β ストランド部分はよく似ているが、ループやターンの部分ではRMSD値が1.433から1.598 Å と、若干の違いが見られた。また、NADPHによるDHFの還元の前後で、“open”-“close”-“occluded”の構造変化を起こすMet20ループの構造は“close”型であった。一方、側鎖構造に関しては、EC-DHFRと比較した場合、活性中心アミノ酸残基や、基質アナログの葉酸および補酵素NADP+の結合部位に違いが見られたが、他の15種の構造も含めて考えた場合、MP-DHFRだけに特異的なものではなかった。

このように、蛋白質としての主鎖構造および側鎖構造を見ただけでは低温・高圧耐性の機構は明らかではない。そもそも加圧下で蛋白質の天然構造がその変性構造よりも不安定になる要因は、熱力学的には天然構造の部分モル体積が変性構造の部分モル体積よりも大きいからである。蛋白質の部分モル体積は構成原子の van der Waals 体積、分子内空隙(キャビティー)体積、そして水和に伴う体積変化の寄与からなる。そこで解析手法が複雑ではあるものの、得られた天然立体構造からその中のキャビティーの体積を求めた。その結果、MP-DHFRのアミノ酸残基あたりのキャビティー体積(0.375 Å³/残基)は、EC-DHFRのそれ(1.075 Å³/残基)よりも小さいことがわかった。すなわちMP-DHFRは分子内空隙が少ないために、加圧にともなう安定性の低下度合いが少ないと予想される。

以上、立体構造解析から明らかになった知見を述べてきたが、続いて第2章では、MP-DHFR 立体構造の圧力に対する安定性を高圧 NMR 法を用いて測定し、熱力学的に解析している。¹H-NMR スペクトル測定は800 MHz NMR 装置および可変圧力 NMR セルを用い、圧力範囲 $p = 0.1 \sim 375$ MPa、温度範囲 $-5 \sim 30^\circ\text{C}$ で行われた。高磁場側のメチル基の信号強度より各圧力・温度条件化でのMP-DHFRの天然構造Nと変性構造Dの存在比を求め、それより、変性にともなうGibbs自由エネルギー変化量 ΔG の常圧0.1 MPaでの値、 ΔG° 、および変性構造と天然構造の部分モル体積の差、 ΔV を求めている： $K=[D]/[N]=\exp(-\Delta G/RT)=\exp(-(\Delta G^\circ+\Delta V(p-p^\circ))/RT)$ 。

その結果、MP-DHFR天然構造の安定化自由エネルギー $-\Delta G^\circ$ はせいぜい15 kJ/mol程度と、EC-DHFRの37 kJ/molや高度好熱菌 *Thermotoga maritima*での報告値145 kJ/molに比べて大変低いことがわかった。また、MP-DHFR天然構造の安定化自由エネルギーの温度依存性はEC-DHFRに比べて少なかったが、その最安定温度はEC-DHFRの場合よりも低温側にシフトしており、*Moritella profunda*の生息環境にちかい5°C付近に見られた。

一方、MP-DHFRの変性構造と天然構造の部分モル体積差 ΔV は-58 ml/molであり、EC-DHFRの場合の約-100 ml/molと比べると、絶対値が小さいことがわかった。これは、前述したMP-DHFRの結晶構造の解析から得られた、その天然構造内のキャビティー体積が小さいという知見と一致するものであり、MP-DHFRは加圧にともなう安定性の低下度合いが少ないことを意味する。

得られた熱力学的データを総合すると、MP-DHFRの天然立体構造は、その常圧での安定性は低いが、変性構造との部分モル体積差を少なくすることによって、高圧下での変性を防いでいるということが言える。構造安定性を低く保っている理由は、低温環境下でも酵素機能を発揮するために、天然構造に近い励起型構造への移行に必要な揺らぎを起り易くするためではないかと思われる。

以上、本研究は、低温・高圧環境に生息する微生物由来のジヒドロ葉酸還元酵素の結晶化に成功し、その主鎖および側鎖の立体構造からは判然としない高圧耐性機構を、分子内キャビティー量の解析ならびに高圧 NMR 法を用いた温度・圧力軸での安定化自由エネルギー解析、および変性構造と天然構造の部分モル体積の差の面から明らかにしたものである。

論文審査結果の要旨

微生物のなかには、高温、低温、高圧、高塩濃度など、さまざまな極端環境条件で生息しているものが見られる。これら極端環境条件への適応機構は、生物学的にも物理化学的にも興味ある重要な解明課題である。ここに審査に付された秦和澄の研究は、温度 2°C ならびに圧力 28 MPa (約 280 気圧) の環境に生息する深海微生物 *Moritella profunda* 由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (MP-DHFR) の結晶化を行い、X 線結晶解析によって明らかにしたその立体構造ならびに高圧 NMR 法を用いた熱力学的安定性の解析から、低温・高圧への適応機構を調べたものである。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は核酸およびアミノ酸代謝に必須の酵素であり、これまでに 17 種におよぶ生物由来のジヒドロ葉酸還元酵素について立体構造が報告されているが、深海微生物由来のジヒドロ葉酸還元酵素の立体構造の解明はこの研究が初めてである。また深海生物由来の蛋白質の X 線結晶解析としてもこの研究は世界で 2 例目となるものであり、新しい研究領域に挑戦したものと評価できる点である。

まず、*Moritella profunda* を始め全部で 17 種の深海微生物由来の DHFR 遺伝子の腸菌内での発現を行い、微生物種によって可溶性画分あるいは不溶性画分、あるいはその両画分に発現産物が見られることを示している。ジヒドロ葉酸の還元という同一の機能を持つ相同な酵素であり、当然、それらの一次構造も相同であるにもかかわらず、蛋白質の発現が異なる画分に見られるというこの知見は、蛋白質の精妙な物理化学的挙動の例として興味深いものである。続いて、精製した DHFR 3 種について結晶化を試みている。蛋白質の結晶化は一般に困難とされ、必ずしも成功するとは限らない作業である。この研究においても、結晶化条件のスクリーニングの結果、最終的に X 線結晶解析に用いることが出来るような良質の結晶が得られたのは *Moritella profunda* 由来の DHFR のみであった。

得られた MP-DHFR 単結晶のエックス線回折実験により、2.0 Å 分解能で MP-DHFR の立体構造を決定した。その結果を、これまでに立体構造が報告されている常圧環境下で生息する生物種の DHFR、特に大腸菌 DHFR と比較すると、主鎖構造はよく似ており、幾らかの側鎖構造上の違いも MP-DHFR だけに特異的なものではなかった。

そこで、蛋白質の安定性 $\Delta G = \Delta G^\circ + \Delta V(p - p^\circ)$ の圧力依存項の強さを決めていく ΔV (変性構造と天然構造の部分モル体積の差) に寄与する要因のひとつである

分子内空隙(キャビティー)の体積を、エックス線回折実験により得られた立体構造から算出した。その結果、MP-DHFR 中のキャビティー体積は、EC-DHFR のその半分に小さいことがわかった。深海微生物由来の蛋白質で、分子内空隙が少ないために加圧にともなう安定性の低下度合いが少ない、という知見が得られたのは初めてのことであり、それが深海微生物由来の蛋白質に共通する特性かどうかは今後の検証に俟つとしても、この知見が示された意義は大きい。

また、得られた立体構造を元にタンパク質表面の静電ポテンシャルの検出を行ったところ、MP-DHFR の分子表面は電荷を帯びていない中性表面が多いことを示している。天然の立体構造において、もし疎水表面が多ければ、それは天然状態の比熱が大きいことを意味しており、変性状態への移行に際しての比熱変化が小さいことを意味する。そしてこれはさらに、変性にともなう自由エネルギー変化がプラスでの天然状態がより安定である温度領域が低温側に伸びることを意味しており、低温耐性機構の可能性のひとつとして興味深い知見である。

続いて、高圧 NMR 法を用いて MP-DHFR 立体構造の圧力ならびに温度に対する安定性を解析している。その結果、常圧においては、MP-DHFR 天然構造の安定化自由エネルギー ΔG° はせいぜい 15 kJ/mol 程度であって、大腸菌や高度好熱菌の DHFR に比べて大変低いことがわかった。一方、変性構造と天然構造の部分モル体積の差 ΔV は -58 ml/mol と大腸菌 DHFR の場合の半分程度であり、MP-DHFR においては加圧にともなう安定性の低下 $\Delta V(p - p^\circ)$ が少ないことが示された。これは、前述の、MP-DHFR 結晶構造の解析から得られた、天然構造内のキャビティー体積が小さいという知見と一致するものであり、圧力耐性の機構を明瞭に示したものと評価できる。また、MP-DHFR 天然構造の安定化自由エネルギーの温度依存性は EC-DHFR に比べて少なく、その最安定温度は EC-DHFR の場合よりも低温側にシフトして、*Moritella profunda* の生息環境にちかい 5°C 付近に見られた点も、上述の比熱変化量からの予想と合致している。変性にはいたらないが構造安定性を低く保っている理由として、天然構造に近い励起型構造への移行に必要な揺らぎを起り易くするため、という示唆は新規性の高いものである。

以上、秦和澄による本研究は、低温・高圧環境に生息する微生物由来のジヒドロ葉酸還元酵素の結晶化に成功し、その高圧耐性機構を、分子内キャビティー量の解析ならびに高圧 NMR 法を用いた温度・圧力軸での安定化自由エネルギー解析から明らかにしたものであり、博士(工学)論文として価値あるものと認める。