

博士論文

深海性 *Shewanella* 属細菌由来
シトクロム *c* の安定化機構の解明
(要約)

平成 28 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

政成美沙

深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定化機構の解明

(要約)

広島大学大学院生物圏科学研究科 生物機能開発学専攻

D136119 政成美沙

第 1 章

深海は低温、高圧力という極限環境の一種である。高圧力は蛋白質を変性・失活させる要因となるため、深海に生息する微生物は、圧力に適応した蛋白質を生産している。これまでに、いくつかの多量体蛋白質について、圧力によってサブユニットが解離し、活性を失う様子が観察されている。それらの蛋白質では個々のサブユニットの構造が浅瀬由来のものとは異なり、その構造の違いが圧力によるサブユニットの解離に影響していることが示唆されている。このことから、単量体で分子量の小さな蛋白質を用いて、蛋白質の立体構造への圧力の影響を調べることが、蛋白質の圧力適応機構を構造面から解明するための道筋となると考えられる。

Shewanella 属細菌は主に海洋に生息し、その分布は浅瀬から深海にまで広がっている。海洋環境の中でも、深海は低温かつ高圧であり極限環境の一つとされている。深海に生息する *Shewanella* 属細菌は低温や高圧に適応することによって、浅瀬に生息する *Shewanella* 属細菌とは異なる性質を持つ蛋白質や脂質を生産していると考えられる。本研究では、深海および浅瀬に生息する *Shewanella* 属細菌由来の単量体蛋白質であるシトクロム *c* を対象に、立体構造の観点から圧力適応機構の解明を目指す。

第 2 章

深海に生息する好圧菌のほとんどは γ -プロテオバクテリアに分類されている。過去に、深海由来細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統樹が作成されている。それによると、*Shewanella* 属細菌は大きく 2 つのグループに分かれ、それぞれのグループで生育の圧力感受性が異なることが分かっている。本研究で新たに、いくつかの *Shewanella* 属細菌由来蛋白質のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成したところ、

全ての系統樹で 16S rRNA 遺伝子配列と同様に、2つのグループに分かれることが確認できた。2つのグループは由来する細菌の生育の圧力感受性が異なるため、*Shewanella* 属細菌の蛋白質アミノ酸配列と生育圧力に何らかの関係があることが示唆された。

第3章

系統樹作成で得られた結果をもとに、生育圧力の異なるグループからそれぞれ2種ずつ、計4種の *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* を研究対象とした。深海に生息する *Shewanella benthica* (至適生育圧力:50 MPa)および *Shewanella violacea* (至適生育圧力:30MPa), 浅瀬に生息する *Shewanella livingstonensis* (至適生育圧力:0.1 MPa)および *Shewanella amazonensis* (至適生育圧力:0.1 MPa)由来のシトクロム *c* (以下それぞれ SB, SV, SL, SA)である。

SV および SA については、当研究室で既に大腸菌を用いた異種発現、および精製法が確立されている。本研究では、新たに SL, SB の大腸菌を用いた異種発現系を構築した。好気条件下で効率的かつ大量にシトクロム *c* を発現し、これをイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで精製した。

第4章

蛋白質は、それぞれのアミノ酸配列に従って、固有の立体構造を形成する。これを天然状態といい、熱力学的に最も安定な状態 (最も自由エネルギーが低い状態) であると考えられている。立体構造の安定性は天然状態と変性状態の自由エネルギーの差で決まり、蛋白質の性質を示す重要な指標の一つでもある。

4種の *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の熱安定性を測定した結果、深海由来の SV および SB は浅瀬由来の SA および SL よりも高い熱安定性を示した。また、グアニジン塩酸塩を用いて変性剤耐性を測定した結果、やはり深海由来の SV および SB は浅瀬由来の SA および SL よりも高い変性剤耐性を示した。また、由来する細菌の生育圧力が最も高い SB は、同様に深海由来の SV よりも、熱、および変性剤に対して高い安定性を示した。これらのことから、シトクロム *c* は圧力に適応することで安定化していることが示唆された。

第 5 章

これまでの比較で、*Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* が圧力に適応し、安定化している可能性が示された。このことから、シトクロム *c* が圧力に適応するための分子機構は、熱や変性剤に対して安定化するための分子機構と共通であると考えた。安定化機構は、蛋白質の立体構造を決定し、内部のアミノ酸相互作用を調べることで知ることが出来る。浅瀬由来シトクロム *c* は既に立体構造が決定されているため、本研究では深海由来シトクロム *c* のうち、SV を結晶化し、X 線回折により構造を決定した。

全体的な構造としては、浅瀬由来 SL よりも深海由来 SV の方がコンパクトにまとまり、内部の空洞が小さくなっていた。SV と SL で異なるアミノ酸は僅かであるが、その部分的なアミノ酸の変化によって SV はアミノ酸相互作用を増していたため、アミノ酸同士が引き寄せ合い、結果として全体のパッキングが詰まっていると考えられる。

第 6 章

過去の知見として、深海由来蛋白質は内部の空洞が大きく、それが加圧による圧縮に対するクッションとなることが示されている。しかし、SV は SL よりも蛋白質内部の空洞が小さかったため、加圧により圧縮しやすい可能性があると考えた。

変性剤耐性の測定を加圧下で行うことで、4 種のシトクロム *c* 構造への、圧力の影響を比較した。その結果、深海由来 SV, SB の方が浅瀬由来 SA, SL よりも加圧による変性剤耐性の低下が顕著であった。つまり、SV, SB の方が圧力の影響をより受け、圧縮されやすいことを示している。この結果は、深海由来シトクロム *c* の内部の空隙が少なく、圧縮に対するクッションが無いという前述の考察と合致した。しかし、由来する細菌の各生育圧力下での変性剤耐性を比較すると、深海由来 SV, SB の方が高い安定性を保持しており「圧力適応＝安定化」という結果を裏付けた。

第 7 章

アミノ酸相互作用が異なり、安定性に影響する可能性のある 37 番目, 41 番目, 50 番目のアミノ酸について、SV と SL で相互に入れ替える変異を導入した。各変異体の熱安定性を測定した結果、特に 50 番目のアミノ酸(SL では Leu, SV では Lys)が安定性に寄与していることを見出した。また、構造解析より、50 番目のアミノ酸の単独変異では立体障害を起こす可能性があったため、51 番目のアミノ酸(SL では Asn, SV では Gly)をともに置換した二重変異体を作成した。その結果、二重変異は、単独変

異よりも効果的に安定性を変化させた。

第 8 章

過去に、異なる温度環境に生息する微生物由来のシトクロム *c* の熱安定性が比較されており、その結果、由来する微生物の生育温度が高いほどシトクロム *c* の熱安定性も高いという、正の相関性が示されている。しかしながら、深海に生息する好冷菌由来の SB や SV はこの相関関係に則っておらず、低温環境由来でありながら高い熱安定性を示した。深海は低温環境であるとともに高圧力環境でもあることから、深海由来シトクロム *c* が低温への適応よりも高圧への適応を優先し安定化していることを示唆している。さらに、高温環境由来のシトクロム *c* と深海由来シトクロム *c* は、蛋白質内部のアミノ酸の水素結合や疎水性相互作用を増加するという共通の機構で安定化していることが示された。

また、深海由来蛋白質は蛋白質内部の空洞を大きくすることで、圧縮に対してクッションを持たせているという過去の知見に対し、本研究では、深海由来シトクロム *c* の内部の空洞は浅瀬由来のものに比べて小さいことが示された。しかし、分子内部の空洞が小さい分、アミノ酸側鎖の相互作用が増え、高温環境由来シトクロム *c* と同様の機構での安定化に繋がっていた。

以上の結果より、深海由来シトクロム *c* が圧力に適応するためアミノ酸相互作用を増やし、安定化した構造を有することが示された。これは、今までに報告のない新たな圧力への適応機構であり、これまでの酵素活性を指標とした研究では得られなかった知見である。今後、この「立体構造」という視点からの研究を他の単量体蛋白質や、多量体蛋白質の持つ個々のサブユニットにも適用することで、蛋白質の圧力適応性の一般的な機構に迫ることが出来るものと確信する。