

## 学位論文の要旨

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

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号 D136119

氏名 政成美沙

## 【目的と背景】

生物が生息する環境は、温度や圧力、pH、塩濃度など様々な物理的、化学的要因が関わっている。環境を決定するこれらの要因が大きく外れた環境を極限環境という。極限環境をつくる要因は蛋白質や脂質を変性、失活させるため、一般の動植物は極限環境に生息することができない。しかし、極限環境を好んで生息する生物も存在し、その中でも極限環境に生息する微生物は極限環境微生物と呼ばれる。極限環境微生物は、生息する環境に合わせて極端な物理的、化学的要因の中でも機能する蛋白質を持っている。このような蛋白質は、通常的环境由来の蛋白質では失活する環境でも活性を保つため、産業上の利用価値が高い。

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、いくつかの深海細菌由来の酵素については、圧力が活性にどのように影響するのか研究されている。しかし、それらの研究の多くは多量体蛋白質を対象とし、その活性が圧力によりどのような影響を受けるかを調べたものである。多量体蛋白質は圧力によってサブユニットが解離し、活性を失う。つまり、圧力による活性の変化を調べた研究は、圧力によるサブユニットの解離を調べているということである。また、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深海由来のもので異なり、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。しかしながら、分子量の大きな多量体蛋白質を用いては、個々のサブユニットの構造の解析が難しい。そのため、単量体であり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、構造面から蛋白質の圧力適応機構を解明する道筋となると考えられる。本研究では、深海由来の単量体蛋白質としてシトクロム *c* を対象とし、蛋白質の構造面で圧力や温度に対する安定化機構をアミノ酸レベルで解明することを目指す。

## 【方法と結果】

対象としたのは、生育圧力の異なる 4 種の *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* である。深海に生息する好冷好圧菌 *Shewanella benthica* (至適生育圧力: 50 MPa) および *Shewanella violacea* (至適生育圧力: 30 MPa)、浅瀬に生息する好冷菌 *Shewanella livingstonensis* (至適生育圧力: 0.1 MPa)、常温菌 *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) を、大腸菌を用いて異種発現させた。Differential scanning calorimetry (DSC) を用いてこれら 4 種シトクロム *c* の熱安定性を測定した。その結果、深海由来である SV, 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。熱力学パラメータを算出したところ、深海由来 SV および SB はエンタルピー的な寄与で安定化していることが示された。また、変性剤グアニジン塩酸塩 (Gdn-HCl) を用いて変性剤耐性を測

定した。その結果、深海由来である SV, 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、同じ深海由来であっても SB は SV より高い熱安定性、変性剤耐性を示した。細菌の生育圧力が高いほどシトクロム *c* の熱安定性や変性剤耐性が高いことから、「圧力適応＝安定化」であることが示唆された。

深海由来シトクロム *c* の構造レベルでの安定化機構を知るために、SV の結晶構造を決定した。また、浅瀬由来シトクロム *c* として相同蛋白質である *Shewanella oneidensis* 由来シトクロム *c* が構造決定されている (PDB:1kx2) ため、その構造を基に SWISS-Model を用いて SL の立体構造をモデリングした。両者の構造全体を比較すると、分子内部の空洞に大きく違いがあり、SV は SL よりも空洞が少なくなっていた。蛋白質内部の空洞は加圧によって潰れるため、空洞の大きさは蛋白質の圧力適応に重要なポイントとなる。過去に、深海由来蛋白質は空洞を大きくし、それによって加圧による圧縮のクッションとなることが示されている。シトクロム *c* の場合は SV の方が小さい空洞を持つため、加圧による圧縮の影響を受けやすい可能性がある。

そこで、4 種シトクロム *c* の構造への圧力の影響を比較するために、高压下での変性剤耐性を測定した。変性剤には Gdn-HCl を使用し、高压分光光度計を用いて測定を行った。その結果、どのシトクロム *c* も加圧によって変性剤耐性が下がった。加圧による変性剤耐性の減少度は深海由来シトクロム *c* の方が大きかった。このことは、構造解析の結果と合っており、やはり深海由来シトクロム *c* の構造は圧力の影響をより強く受けるということである。しかし、由来する細菌の生育圧力下での変性剤耐性を比較すると、生育圧力の高いものほど高い変性剤耐性を保持していた。このことから、「圧力適応＝安定化」であることが裏付けられた。

安定化に関わるアミノ酸を知るため、立体構造上で空洞の大きさに差が出ている箇所のアミノ酸相互作用を SV と SL のもので比較すると、SV では浅瀬由来の SL にはない水素結合を形成しているアミノ酸があった。そのアミノ酸について、SV と SL で相互に置換する変異体を作製した。DSC を使用して熱安定性を測定した結果、SV の 50, 51 番のアミノ酸を同時に置換した変異体は野生体と比べて熱安定性が下がっていた。これに対して、SL の同じ箇所の変異体は野生体と比べて熱安定性が上がっていた。しかし、50 番目のアミノ酸単独の変異では、熱安定性への影響は少なかった。また、41 番目のアミノ酸の変異によっても SL の安定性は上がった。しかし、SV の 41 番目のアミノ酸の変異体では僅かに安定性が上がり、さらに 37 番目のアミノ酸の変異体では、SV の変異体は安定性が上がり、SL の変異体では安定性が下がるという逆の効果が得られた。

### 【考察】

立体構造の解析より、深海由来の SV は浅瀬由来の SL よりも蛋白質内部の空洞が少ないことが示された。このことは、深海由来蛋白質は内部の空洞を増やして加圧による圧縮のクッションとしているというこれまでの研究とは相反するものである。実際に、構造への圧力の影響を調べると、深海由来である SV や SB の方が浅瀬由来の SA や SL よりも圧力の影響をより大きく受けていた。しかし、由来する細菌の生育圧力下での安定性は深海由来のものの方が高く、SV や SB が圧力に適応した結果安定化していることが示唆された。蛋白質内部の空洞が少なく、パッキングが密になっている構造は、一般的な安定性の高い蛋白質の特徴でもある。事実、常圧下での熱安定性や変性剤耐性は深海由来シトクロム *c* の方が高い。

蛋白質内部の空洞の大きさに違いがある領域では、SV と SL で異なるアミノ酸相互作用があった。これらのアミノ酸を相互に置換する変異導入を行った結果、深海由来 SV を不安定化し浅瀬由来 SL を安定化させるアミノ酸があることを見出した。このことは、蛋白質内部の空洞が安定化に寄与していることを示唆している。以上の結果より、シトクロム *c* という蛋白質においては、「圧力への適応＝安定化」であることが示された。

これまでの多量体蛋白質を用いて酵素活性を指標とした研究では、蛋白質が圧力に適応するためにどのような構造をとっているのかが理解できていなかった。本研究で単量体蛋白質を用いた比較を行うことによって、初めて深海由来蛋白質が立体構造レベルで安定化していることが示された。今後、同様の研究を他の単量体蛋白質や多量体蛋白質の個々のサブユニットに適用することで、蛋白質の圧力適応機構の一般性に迫ることができると考えている。