

論文審査の要旨

| | | | |
|--|----------------|---------------------|--------|
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) | 氏名 | 宮下 由里奈 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第①・②項該当 | | |
| 論文題目 | | | |
| <p>Halophilic mechanisms of the structure, stability and function of a halophilic dihydrofolate reductase from <i>Haloarcula japonica</i> strain TR-1 (<i>Haloarcula japonica</i> TR-1株由来ジヒドロ葉酸還元酵素の 構造、安定性、機能における好塩性のメカニズム)</p> | | | |
| 論文審査担当者 | | | |
| 主 査 | 准教授 | 片柳 克夫 | |
| 審査委員 | 教 授 | 泉 俊輔 | |
| 審査委員 | 教 授 | 中田 聡 | |
| 審査委員 | 教 授 | 相田美砂子 | |
| 審査委員 | 教 授 | 三本木至宏 (生物圏科学研究科) | |
| 審査委員 | 客員教授 | 月向 邦彦 (放射光科学研究センター) | |
| 〔論文審査の要旨〕 | | | |
| <p>塩は生体に不可欠な構成成分であり、溶液中のタンパク質の構造安定性や機能において重要な役割を果たしている。塩は溶液の物性を変化させるだけでなく、タンパク質分子表面に特異的に結合したり、帯電基の電荷を遮蔽したりする。さらに酵素の触媒反応には、基質との結合や生成物の解離、化学反応過程などの複数の素過程が含まれるため、酵素機能に対する塩の作用機構は複雑で、未だ十分には解明されていない。</p> <p>本論文の著者は、酵素の構造、安定性、および機能に対して塩が及ぼす影響を調べるために、石川県能登の塩田土壌から発見された高度好塩性古細菌<i>Haloarcula japonica</i>TR-1株由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (HjDHFR P1) に着目した。HjDHFR P1は、モデル酵素として広く研究されている大腸菌由来DHFR (EcDHFR) とのアミノ酸配列の相同性が47.5%であるが、予測される立体構造はほとんど同じである。組換え体として単離精製したHjDHFR P1の構造と安定性、および、酵素反応の素過程に対する塩の効果を調べ、好塩性とそのメカニズムを検討した。</p> <p>本論文では、著者は大きく分けて次にあげる2つの研究を行った。</p> <p>1つめに行った研究は、HjDHFR P1の構造と安定性に対するNaClの効果の研究である。</p> <p>HjDHFR P1の構造と安定性に対するNaClの効果、円偏光二色性 (CD) と蛍光分光法を用いて調べた。その結果、HjDHFR P1は、NaCl濃度の増加に伴って立体構造が変化し、500 mMで構造変化が収束することがわかった。さらに、このような構造変化はNaCl濃度の増加だけではなくpHの低下や補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の添加によっても誘起され、またNaCl存在下と非存在下でのCDスペクトルの葉酸 (基質類似体) とNADPH濃度依存性との比較からこの構造変化は基質結合部位周辺の構造形成を示すことがわかった。</p> <p>また、HjDHFR P1の熱安定性はNaCl濃度の増加に伴って顕著に増加した。変性に伴う熱容量変化 (ΔC_p) は500mM NaClで収束し、基質結合部位周辺の構造形成に伴って未変性状態の溶媒露出表面積が変化することが確認できた。一方、尿素に対する安定性もNaCl濃度の増加に伴っ</p> | | | |

て顕著に増加したが、変性に伴うGibbs自由エネルギー変化 (ΔG°) はNaCl濃度に対して直線的に増加した。このことから、NaClによるHjDHFR P1の構造安定性の増加には、基質結合部位周辺の構造形成は関与しておらず、酵素分子とNaClとの選択的な相互作用が関与していることが示唆された。

2つめに行った研究は、HjDHFR P1の酵素機能に対するNaClの効果の研究である。

NADPHを含む活性測定条件の下では、基質結合部位周辺の構造が形成されているにも関わらず、HjDHFR P1の酵素活性はpH 6で500mMの至適NaCl濃度を持つという、中程度の好塩性を示した。そこで、HjDHFR P1の活性化と不活性化のメカニズムを明らかにするために、酵素活性に対するpHと様々な塩の効果、定常状態の酵素反応速度と重水素同位体効果、およびリガンドの結合・解離速度を調べた。

HjDHFR P1の酵素活性は、pH6では500 mMで非添加時の8倍に増加し、pH 8では250 mMで4倍に増加したものの、pH 10ではNaCl濃度依存的な活性の変化は観測されなかった。さらに重水素同位体効果より、pH 10における酵素反応の律速過程は化学反応 (Hydride transfer) 過程であることがわかった。これらの結果から、塩による活性化と不活性化は酸性～中性領域でのみ起こり、Hydride transfer過程は塩濃度に依存しないことがわかった。また、様々な塩を用いた酵素活性の塩濃度依存性の比較と、幾つかのモデルを用いたNaCl濃度依存性の解析より、塩による活性化には無機アニオンの結合が、不活性化には酵素と塩との選択的な相互作用が関与していることが示唆された。一方で、stopped-flowによるリガンド結合実験では、Trp残基に由来する蛍光の基質 (ジヒドロ葉酸 : DHF) の結合に伴う消光量はNaCl濃度依存的に増加するが、消光速度はNaCl濃度に依存しないことが示された。さらに、500mM以上のNaCl存在下では、生成物 (テトラヒドロ葉酸 : THF) の解離速度や触媒サイクルの回転速度を示す k_{cat} 値がNaCl濃度依存的に減少した。これらのことから、HjDHFR P1の塩による活性化機構は、無機アニオン非結合型でDHF結合能を持たない分子種と、アニオン結合型でDHFと結合可能な分子種間の平衡に基づいており、塩による不活性化機構は、酵素と塩との選択的な相互作用が、律速過程であるTHFの解離過程を減速させることに起因していることが示された。

全体を通して本論文の著者は、好塩菌由来タンパク質HjDHFR P1に関し、塩を含まない条件下では部分的な構造しか形成しておらず、塩やNADPHの添加、さらにはpHの低下により基質結合部位周辺の構造が形成されることを明らかにした。一方で、HjDHFR P1の構造安定性には、塩との選択的な相互作用が寄与しており、酵素の構造形成は寄与していなかった。また、HjDHFR P1の塩による酵素機能の活性化には、無機アニオンの結合に伴うDHF非結合型と結合型間の平衡の変化が寄与しており、不活性化は、酵素と塩との選択的な相互作用により生成物の解離過程が減速されることに起因していることが示された。

本研究で明らかにしたHjDHFR P1の塩による活性化・不活性化の機構は、死海に生息する*Haloferax volcanii*由来の2つの好塩性DHFRや、非好塩性のEcDHFRにも共通していると考えられ、高い塩濃度という極限環境に生息する好塩菌酵素の生物化学的及び物理化学的な基盤となる知見を提起するものであり、学術的価値の高い研究である。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Effects of salt on the structure, stability, and function of a halophilic dihydrofolate reductase from a hyperhalophilic archaeon, *Haloarcula japonica* strain TR-1

Y. Miyashita, E. Ohmae, K. Nakasone, and K. Katayanagi
Extremophiles **19**: 479–493 (2015)

参考論文

- (1) **Halophilic mechanism of the enzymatic function of a moderately halophilic dihydrofolate reductase from *Haloarcula japonica* strain TR-1**
Y. Miyashita, E. Ohmae, T. Ikura, K. Nakasone, and K. Katayanagi
Extremophiles (submitted)
- (2) **Vacuum-ultraviolet circular dichroism spectra of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase and its mutants: Contributions of phenylalanine and tyrosine side chains and exciton coupling of two tryptophan side chains**
E. Ohmae, S. Tanaka, Y. Miyashita, K. Katayanagi, and K. Matsuo
J. Phys. Chem. B **119**: 13002–13008 (2015)
- (3) **Solvent environments significantly affect the enzymatic function of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: Comparison of wild-type protein and active-site mutant D27E**
E. Ohmae, Y. Miyashita, S. Tate, K. Gekko, S. Kitazawa, R. Kitahara, and K. Kuwajima
Biochim. Biophys. Acta **1834**: 2782–2794 (2013)
- (4) **Thermodynamic and functional characteristics of deep-sea enzymes revealed by pressure effects**
E. Ohmae, Y. Miyashita, and C. Kato
Extremophiles **17**: 701–709 (2013)
- (5) 酵素の構造安定性と機能におけるキャビティーと水和の役割—深海微生物由来酵素からの知見—
大前英司, 宮下由里奈, 加藤千明
熱測定 **43** (2): 59–65 (2016)
- (6) 深海微生物由来ジヒドロ葉酸還元酵素の高圧力適応機構
大前英司, 宮下由里奈, 月向邦彦, 加藤千明
高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー (野村一樹・藤澤哲郎・岩橋均 編集, 三恵社) : pp130–144 (2015)