

## 論文題目 極限環境生物由来ヘム蛋白質の環境適応機構の解明

広島大学大学院 生物圏科学研究科  
生物機能開発学専攻  
氏名 藤井 創太郎

極限環境とは、ヒトが住めない環境等の定義がなされており、温泉などがこれに該当する。温泉中には、好熱菌などの原核生物や、ユスリカなどの真核生物の昆虫が生育している。高温かつ酸性の環境となる温泉は、それらの生物が有する蛋白質を変性させる要因となる。しかし、そのような環境に生息する生物は、熱や酸に対して安定に機能する蛋白質を有するとされる。本研究では、好熱菌やユスリカを由来とするヘム蛋白質に着目し、温泉環境に対してどのような適応機構を有するか、それらの分子レベルの環境適応機構を探った。

### 第1章 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'* の熱安定性

シトクロム *c'* は細菌から見出されるヘム蛋白質の1種であり、CO・NO 結合能を有する。当研究室では、至適生育温度 52°C の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* からシトクロム *c'* を見出し、PHCP と名付けている。本項目では、PHCP の構造レベルの環境適応機構を解明することを目的とする。比較対象として、至適生育温度 25°C の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* (AVCP) を用いた。PHCP と AVCP のアミノ酸配列は 55% 一致しており、また AVCP は X 線結晶構造が解かれているため、PHCP を特徴付けるうえで良き比較対象となる。

シトクロム *c'* は  $\alpha$ -ヘリックスから成る蛋白質であるため、CD スペクトルの 222 nm に特徴的な負のピークを観測できる。これを指標として、熱に伴う CD スペクトルの変化から熱安定性を測定した。その結果、PHCP の方が AVCP よりも安定性が高いことを見出した。

### 第2章 X線結晶構造解析と変異導入による安定性変化

PHCP の安定化機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行うことで、PHCP の立体構造から安定化に寄与する相互作用を探った。その結果、AVCP では見られない相互作用が PHCP では確認できた。PHCP のアミノ酸残基を AVCP に近づける変異体 6 種を作製して安定性を測定した結果、ヘム周辺環境およびサブユニット界面に変異を入れた際に安定性が大きく下がることを見出した。

### 第3章 アポ型 PHCP の特徴

PHCP 変異体の熱安定性は AVCP の安定性に大きく近づいたが、AVCP の変性温度には達しなかった。さらなる PHCP の安定化要因を探るため、ヘムを除いたアポ型の蛋白質を作製し、アポ型でも構造を維持できるかどうかを調べた。すると、アポ型 PHCP は、CD スペクトルの測定により特徴的な負のピークが観測された。このピークは、AVCP では観測されなかった。すなわち、PHCP はアポ型でも構造を有し、ヘムに依存しないようなサブユニット内部の安定化機構を有する可能性が示された。

### 第4章 PHCP のリガンド結合能とその環境適応性

PHCP の構造から、チャンネルおよび 5 配位型ヘムを有することが分かり、CO や NO に対して結合できることが示唆された。PHCP 蛋白質溶液に対して CO や NO を作用させると、その吸収スペクトルが特徴的なピークを示すことが分かり、PHCP がこれらのリガンドに対する結合能を有することが示唆された。CO についてその親和性を測定すると、25°C にお

る PHCP の CO に対する親和性は、AVCP よりも低いという結果が得られた。これは、ヘム周辺の疎水性残基の違いが関与していると考察した。さらに、PHCP では 55 °C まで昇温した際にも CO 結合能を有するが、AVCP では温度を上げると結合能を示さなかった。よって、PHCP は至適生育環境となる温度でもガスを結合して機能していることが示唆された。

## 第 5 章 酸耐性ユスリカ *Chironomus sulfurosus* と由来するヘモグロビンの特徴

ヘモグロビン (Hb) は、生体内で O<sub>2</sub> を運搬して機能するヘム蛋白質である。Hb の O<sub>2</sub> の親和性には、温度や pH などが関与しており、特に低い pH では O<sub>2</sub> を結合しにくくなる (Bohr 効果)。霧島山の河川から採集されたフトゲユスリカ *Chironomus sulfurosus* の幼虫は pH 3.1 の酸性水域に生息する酸耐性ユスリカの 1 種である。この幼虫は赤色をしており、多種多様な Hb を有することが分かっている。しかし、Bohr 効果が起こるような酸性環境で、なぜユスリカ幼虫が生存できるのかは未知であった。*C. sulfurosus* は、Bohr 効果に対して適応するような O<sub>2</sub> 親和性の高い Hb を有する可能性がある。本項目の目的は、*C. sulfurosus* 幼虫由来 Hb の酸性環境への適応機構の解明である。

*C. sulfurosus* を形態から同定し、その成虫から受精卵を得た。この卵塊から幼虫を孵化させ、酸性 (pH 2.0) および中性 (pH 7.0) の飼育環境中で、第 4 齢まで飼育した。それぞれの幼虫をホモジナイズし、得られた体液を Native-PAGE することで、酸性環境と中性環境で発現する Hb の量や種類に違いがあることを見出した。

## 第 6 章 RNA-seq による酸性環境適応ヘモグロビンの探索

酸性環境に適応した Hb を探索することを目的とし、酸性および中性で飼育した *C. sulfurosus* 幼虫から全 RNA を抽出して、mRNA 次世代シーケシング (RNA-seq) による全遺伝子の発現量の比較を行うことで、酸性環境で飼育した時に Hb の発現量に変化があるかを探った。解析した 34,964 個の遺伝子のうち、1,208 個が酸性条件で発現量が増加することが明らかになった。Hb 遺伝子については 21 種類同定でき、そのうち約 11 種の Hb 遺伝子の発現量が酸性条件で上昇し、6 種類の Hb の発現量が低下した。また、残り 4 種類の Hb の発現量は変化しなかった。アミノ酸配列を用いた Hb の三次構造予測から、発現量が酸性環境で上昇した Hb はヘム周辺がより疎水的である特徴があり、より安定性の高い Hb 成分が発現していることが分かった。また、発現量が上がった Hb の中には疎水性度を下げる Hb も存在し、これらは O<sub>2</sub> への親和性を上げている Hb であると予測した。以上の結果から、*C. sulfurosus* 幼虫は、酸性環境に適応するために、ヘム周辺の疎水性度を上げた安定性の高い Hb や、ヘム周辺の疎水性度を下げた O<sub>2</sub> 親和性の高い Hb まで、幅広い性質の Hb を有しており、さらにそれらを転写レベルで制御していることを明らかにした。

## 総括・展望

好熱菌由来のシトクロム *c'* である PHCP は、常温菌由来の AVCP よりも高い安定性を有していた。その安定化機構は、PHCP の X 線結晶構造解析と変異導入実験から、ヘム周辺環境とサブユニット間にある相互作用が寄与していることによるものであった。また、PHCP が CO や NO などのリガンドに対する結合能を有することを明らかにし、その結合能は高温でも維持されていることが分かった。

そして、酸耐性ユスリカ *C. sulfurosus* は 1 個体あたり 21 種の遺伝子配列の異なる Hb を有しており、酸性条件によって性質の異なる Hb の発現を誘導していた。さらに Hb の構造シミュレーションから、ヘム周辺の疎水性環境が異なることが示され、Hb の種類によって安定性や O<sub>2</sub> 親和性のバリエーションを変えていることが示唆された。今後、これらヘモグロビンの安定性や酸素親和性を実測することが望まれる。