

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	米澤 悌
題 目	<p>中度好塩性細菌 <i>Halomonas</i> sp.#593 株由来 nucleoside diphosphate kinase に関する研究 (Study of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium <i>Halomonas</i> sp. #593)</p>
<p>好塩菌は通常生物が生育できない高濃度塩環境下で生育する極限環境微生物の一種である。好塩菌が産生する好塩性酵素はその活性や安定性に高濃度の塩を必要とするものが多い。好塩菌の中でも 0.5~2.5 M NaCl という幅広い塩環境で生育可能な中度好塩菌は、その幅広い塩要求性から、それが産生する酵素も幅広い塩濃度において安定であると推測される。そのため、中度好塩菌産生酵素は酵素化学的にも非常に興味深い工業的利用も期待されるが、その研究例は非常に少ない。そこで本研究では、あらゆる生物によく保存されている nucleoside diphosphate kinase (NDK) をモデル酵素として選択し、中度好塩菌由来 NDK の性質を明らかにすることを目的とした。</p> <p>中度好塩性グラム陰性細菌 <i>Halomonas</i> sp. #593 株由来 NDK (HaNDK) を均一に精製し、そのアミノ酸配列情報より <i>ndk</i> 遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した。そのアミノ酸配列は非好塩性細菌である <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 株由来 NDK (PaNDK) と高い相同性を示した。両 NDK の性質を比較し、その違いを明らかにした。</p> <p>両 NDK の等電点を計算すると PaNDK の 5.36 に比べて HaNDK は 4.56 と低く、HaNDK は一般的な好塩性酵素の特徴である酸性タンパク質の特性を保持していた。</p> <p>光散乱法と化学的架橋実験を用いた実験の結果、PaNDK は 4 量体を示したのに対し、HaNDK は 2 量体を形成しており、これまでに例の無い活性型のサブユニット構造を形成していた。</p> <p>HaNDK は 50 mM NaCl 存在下で最大活性を示し僅かな好塩性がみられたが、それ以上では塩濃度の上昇に従い、PaNDK と同程度に活性の減少がみられた。</p> <p>HaNDK と PaNDK の至適反応温度はそれぞれ 40 °C および 60 °C を示し PaNDK の方が一見すると高い熱安定性を示した。ところが、両 NDK が失活する 80 °C で熱処理後冷却すると、HaNDK は素早く活性のある 2 量体への再会合がみられたのに対し、PaNDK は不可逆的な変性を示した。この HaNDK の熱変性後の巻き戻りは、好塩性酵素によくみられるネットの負荷電に因るものと考えられた。熱変性後の HaNDK は負電荷どうしの反発と疎水的なコア構造パッキングのエネルギーバランスが保たれ、不可逆的な凝集体の形成が妨げられる。一方、非好塩性酵素である PaNDK は負電荷どうしの反発が低いため、エネルギーバランスはより凝集体形成に向かうと考えられた。このことから HaNDK の高い構造可逆性、つまり、非凝集性は他の一般的な好塩性酵素と共通した構造上の特性であり、多くの好塩性酵素は様々な要因による変性後も不可逆的な凝集体を形成せずに可溶性を保ち、その変性要因を取り除くことで構造と機能が素早く回復する、あらゆる環境において安定な酵素であると考えられた。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Yasushi Yonezawa
題 目	<p>Study of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium <i>Halomonas</i> sp. #593 (中度好塩性細菌 <i>Halomonas</i> sp.#593 株由来 nucleoside diphosphate kinase に関する研究)</p>
<p>Halophiles, a member of extremophiles, grow at high salt conditions, under which most non-halophilic microorganisms cannot grow. Most proteins from halophiles have adapted to high salt concentrations. Moderate halophiles can grow in a broad range of salt concentration, e.g. optimally at 0.5~2.5 M NaCl but sometimes up to saturated salts, because their proteins can tolerate varying salt concentration. I studied here the salt dependence of enzymatic and structural properties of nucleoside diphosphate kinase (NDK) from moderately halophilic bacteria as a model enzyme: NDK is conserved among almost all organisms.</p> <p>NDK from moderately halophilic gram-negative bacterium, <i>Halomonas</i> sp. #593 strain (HaNDK) was purified to homogeneity and the <i>ndk</i> gene was cloned. The deduced amino acid sequence shows 78% identity to NDK from non-halophile <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (PaNDK). I also cloned the PaNDK gene and purified the protein for comparison with HaNDK.</p> <p>The isoelectric point of HaNDK and PaNDK was calculated from the amino acid sequence to be 4.56 and 5.36, respectively; i.e., HaNDK is more acidic and has a stronger halophilic character.</p> <p>Light scattering and chemical cross-linking analysis of HaNDK demonstrated that this enzyme formed a dimeric structure, in contrast to the PaNDK, which showed tetrameric structure, an oligomeric state in common among all known NDK from gram-negative bacteria.</p> <p>HaNDK showed a maximum activity in the presence of 50 mM NaCl, indicating a marginal halophilic character. However, as the salt concentration was further increased, the activity was gradually lost, similarly to PaNDK.</p> <p>HaNDK appeared to be less thermostable than PaNDK, as the optimum reaction temperature was higher for PaNDK (60 °C) than for HaNDK (40 °C). However, when both NDK were completely denatured at 80 °C-heat treatment and renatured by cooling, HaNDK regained its native dimeric structure, but the PaNDK remained unfolded. The high reversibility of HaNDK was due to its abundant minus net charges as described above, which suppressed aggregation of heat-denatured HaNDK. Conversely, a less negatively charged PaNDK suffered extensive aggregation upon heating, resulting in irreversible aggregates. The observed high reversibility (less aggregation) for HaNDK may be a common structural property of halophilic enzyme.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	米澤 悌
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄
	副査 鹿児島大学 教授 安部 淳一
	副査 宮崎大学 教授 水光 正仁
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
題 目	<p>中度好塩性細菌 <i>Halomonas</i> sp. #593 株由来 nucleoside diphosphate kinase に関する研究 (Study of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium <i>Halomonas</i> sp. #593.)</p>
<p>好塩菌は通常生物が生息できない高い塩分濃度環境において生育できる極限環境微生物の1種であり、高い塩濃度に適応して生育できる特殊能力を持っている。中度好塩性細菌は、0.2M～飽和食塩濃度まで極めて幅広い塩環境で生育でき、その産業的利用が最も注目されている好塩菌である。味噌、醤油の醸造や塩蔵食品加工など食品産業においても極めて重要な細菌群であるが、その酵素の構造-機能相関に関する研究は緒についたばかりである。本研究では、グラム陰性中度好塩性細菌 <i>Halomonas</i> sp. #593株の細胞質酵素で、多くの生物にubiquitousに保存されているnucleoside diphosphate kinase (NDK) について詳細な検討を行った。その蛋白化学的性質と構造-機能相関を明らかにするとともに、通常細菌や高度好塩菌由来のNDKとその性質を比較し、中度好塩性菌由来NDK(HaNDK)の特徴を解明した。まず、NDKがATPカラムに結合することを利用し、その精製の容易さを目安にして研究室保存の中度好塩菌をスクリーニングして1菌株を得、rDNA塩基配列や生理的性質より <i>Halomonas</i>属細菌と同定した。本菌株よりNDKを均一に精製し、そ</p>	

のアミノ酸配列情報から *ndk* 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。データベースとの比較により非好塩性細菌である *Pseudomonas aeruginosa* PA01株のNDK (PaNDK) と高い相同性があることが判り、PaNDKの遺伝子もクローニングし、大腸菌を宿主として両遺伝子の高発現系を確立して両者の性質を比較した。

HaNDKとPaNDKの等電点はそれぞれ4.56と5.36と計算され、好塩性酵素の特徴である酸性タンパク質としての性質を保持していた。HaNDKは50mM NaCl存在下で最も高い活性を示しわずかに好塩性を示したが、1M以上の高濃度塩存在下では、PaNDKと同程度に活性が徐々に低下した。一方、円二色性による2次構造の熱変性曲線によると、2M NaCl存在下では0.2M存在下より5℃安定性が増加した。HaNDKとPaNDKの至適反応温度はそれぞれ40℃と60℃で、HaNDKの方が熱に対して不安定であった。しかし、両酵素が失活する80℃で熱処理後氷冷したところ、HaNDKは速やかに熱処理前の状態に可逆的に回復したが、PaNDKは変性凝集し、不可逆的に失活した。このHaNDKの高い構造可逆性は、ネットの荷電がマイナスに偏っていることに起因する好塩性酵素の構造上の特徴と考えられ、その高い可溶性（非凝集性）の反映と考えられた。よって、好塩性酵素は、熱だけでなく変性剤などの様々な構造的ストレスに対して、いったん変性しても、その変性要因が取り除かれると速やかに構造と機能を回復する「柔軟」な酵素であると考えられた。

一方、真核生物、古細菌、グラム陽性細菌などの数多くのNDKは6量体構造を、またグラム陰性細菌のNDKは4量体構造をとることが知られているが、HaNDKのサブユニット構造は他に例を見ない「2量体構造」であることを化学的架橋実験とゲル濾過-光散乱計により明らかにした。

以上のように、中度好塩性細菌細胞質由来のHaNDKについて、その好塩性酵素としての様々な新しい性質を解明し、特に「いったん変性しても変性要因が取り除かれることにより速やかに構造と機能を回復する」という酵素の性質として極めて有利な点を明らかにしたこと、さらにそれが好塩性酵素に一般的に共通した構造の特徴に起因することを示唆したことは大きな成果と考えられる。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	米澤 悌
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄
	副査 鹿児島大学 教授 安部 淳一
	副査 宮崎大学 教授 水光 正仁
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
実施年月日	平成19年 8月 6日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成19年8月6日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	米澤 悌
[質問 1]	HaNDKに対するNaClの効果は良く分かったが、細胞内で浸透圧の調整に重要と思われている適合溶質の効果はどのように考えているか。
[回答 1]	今回は <i>in vitro</i> でNaClの効果について詳細に検討し、さまざまな新しい知見を得たが、適合溶質については検討していない。 <i>in vivo</i> では、大きな役割を果たしていると考えている。
[質問 2]	HaNDKの精製に疎水クロマトグラフィーを用いているが、HaNDKが溶出された硫安濃度と今回種々の実験に用いたNaClの濃度には、相関が認められるか。
[回答 2]	詳細な考察はしていないが、硫安とNaClでは塩析効果など性質が異なるので、濃度領域は異なると推測される。硫安で実際きれいに精製することができた。
[質問 3]	HaNDKは、PaNDKに比べて巻き戻り効率が低いことは興味深く、その原因を酸性アミノ酸によるマイナス荷電への偏りで議論しているが、ネットのマイナス荷電が重要と考えているのか。それともどこか重要な位置や分布があると考えているのか。
[回答 3]	酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の分布状態を見るとタンパク質の前半部分（N-末端側）が重要と考えられた。実際にHaNDKとPaNDKのキメラ分子を作成して巻き戻り効率に寄与する部位を考察したところ、N-末端領域半分を含むキメラの巻き戻り効率が低いことが分かり、単にネットの荷電状態だけでなく、荷電の分布において重要な領域があることが示唆されたと考えている。
[質問 4]	今後どのような実験をすれば、上記の予測を実証できると思うか。
[回答 4]	より詳細に変異タンパク質を作成すること、また、X線結晶解析で立体構造を明らかにして、表面荷電等について検討したい。
[質問 5]	酸性アミノ酸の役割は、タンパク質のfolding時と、folding後の高塩濃度下での蛋白質立体構造の安定化という両面で考えられるが、好塩菌由来のNDKで結晶構造が決まっているものがあれば、その構造中での酸性アミノ酸の分布はどうなっているか。
[回答 5]	高度好塩菌由来 HsNDK の結晶解析結果では、蛋白表面に酸性アミノ酸が局在し、特にC-末端近傍に酸性アミノ酸がクラスターをなしていることが分かっている。
[質問 6]	至適反応温度は、相対活性 (%) で表しているが、比活性はどうか？
[回答 6]	通常の測定温度は30℃であるが、30℃での比活性は HaNDK と PaNDK では

とんど変わらない。

[質問 7] マイナス荷電を遮蔽するために必要な NaCl 濃度はどのくらいか。蛋白質濃度に比べると圧倒的に多量である 0.2 M NaCl では不足で、2.0 M なら十分というのは、それで良いのか。

[回答 7] この実験結果からすると 0.2M では、不十分と推測される。HaNDK と PaNDK の構造の相違は、HsNDK と両者の違いとに比べると非常に少ないにもかかわらず、可逆性については大きな差が出ているということから考えて、蛋白質の folding は極めて微妙であり、要因を網羅的に見る必要があると思われる。

[質問 8] pH を下げて、カルボキシル基が荷電していない状態で巻き戻りを見たらどうなるか。

[回答 8] HaNDK の巻き戻りに対する pH の効果は検討していない。

[質問 9] 熱変性状態はモデル図のように均一でなく、異なった構造が種々あるはずで、それによって塩の効果は異なるのではないか。

[回答 9] モデル図は単純化したもので、様々な複雑な条件がからんでいると思う。

[質問 10] 0.2 M NaCl 存在下での菌の生育においては最終の菌濃度が低いですが、その理由はどのように考えられるか。

[回答 10] 原因は分かりません。

[質問 11] NDK の 2 次構造は、どのような分布になっているか。各種 NDK 間で似ているのか。CD の測定結果と併せて考察すべきでないか。

[回答 11] 各種 NDK において、その構造は非常に良く似ていて保存されてる。論文に立体構造的な観点を加筆したい。

[質問 12] 酸性アミノ酸が「過多」という表現は、「多すぎる」という意味であり、言葉の使い方が適切でない。

[回答 12] はい、わかりました。

[質問 13] クロスリンクの実験で、2 量体と予測されるものをクロスリンクした場合、3 量体や 4 量体は検出されないのか。

[回答 13] 今回使用したクロスリンカーでは、分子内の結合だけで、2 量体分子間の結合と思われるものは検出されなかった。クロスリンカーの長さによると考えている。

[質問 14] 硫酸化酵素においては、酸性アミノ酸が周りに多い tyr 残基が修飾されるのだが、硫酸基の転移に塩基性アミノ酸がかかわっていることが分かっている。HaNDK の活性中心の構造や転移されるリン酸の結合場所における塩基性アミノ酸の配置はどうか。酸性アミノ酸の塩存在下における蛋白質安定化効果は理解できるが、活性に関与する塩基性アミノ

酸があるのではないか。

[回答 1 4] はい。立体構造を見て、今後詳細に検討します。

[質問 1 5] HaNDK と PaNDK の一次構造はほとんど似ているにもかかわらず、それぞれ 2 量体と 4 量体と四次構造が異なるのは、構造のどのあたりの違いが効いていると考えられるのか。

[回答 1 5] 結晶解析で構造が明らかになっている 4 量体 NDK においては、4 量体中での 2 量体間の接触面が異なる 2 つのタイプの 4 量体が報告されている (type I と type II)。HaNDK はじめ多くの細菌由来の NDK は、一次構造から見ると type II に属すると予測できる。サブユニット形成には、C-末端領域が重要とされているので、HaNDK においてもその可能性が高いと考えている。

[質問 1 6] 結晶解析が終わっている他の NDK の四次構造は、溶液中でも確かめられているのか。

[回答 1 6] はい。確かめられています。

[質問 1 7] 硫酸濃度を下げることによりカラムから溶出した大腸菌発現型 HaNDK は、活性が低いという記述があるが、非組換え型酵素でもそのようなデータはあるか。構造の安定性に寄与する金属イオンなどの関与は知られていないか。

[回答 1 7] 詳しい検討はしていないが、非組換え型酵素の精製に疎水クロマトを用いており、それでは問題はない。活性には Mg^{++} の関与が知られているが、構造の安定化にかかわっている金属イオンの報告はない。