

学 位 論 文 要 旨

氏 名	エルフィ リカ ギンティン
題 目	南極産好冷細菌 <i>Shewanella</i> sp. AS-11 由来無機ピロホスファターゼの機能及び構造解析 (Functional and structural analysis of inorganic pyrophosphatase from Antarctic psychrotroph <i>Shewanella</i> sp. AS-11)

無機ピロホスファターゼ (PPase) は、全生物に必須な、無機ピロリン酸をリン酸へ加水分解する酵素である。2つの可溶性 PPase ファミリーが存在し (ファミリー I、II)、これらのファミリー間で酵素の一次構造はまったく異なっている。両ファミリーの PPase は金属イオンコファクターの存在下でのみ活性を持つ。*Shewanella* sp. AS-11 は、南極の氷に覆われた 0°C 以下の水温となる海に生息する貝類 *Neobuccinum eatoni* から分離された細菌である。本研究では、*Shewanella* sp. AS-11 由来無機ピロホスファターゼ (*Sh*-PPase) の、クローニング及び大腸菌での大量発現、硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製に成功し、その機能および構造解析を行った。

Sh-PPase は、ファミリー II に属し、分子量 34 kDa のサブユニットからなるホモダイマーであり、活性に Mg²⁺ より Mn²⁺、Co²⁺ を必要とすることが分かった。Zn²⁺ も本酵素を顕著に活性化した。Zn²⁺、Co²⁺ 及び Mg²⁺ で活性化した *Sh*-PPase の至適温度は、それぞれ、20、30、40°C であったが、Mn²⁺ で活性化した酵素の至適温度は、驚くほど低くかった (5°C)。Co²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ で活性化した *Sh*-PPase の比活性はそれぞれ、Mg 活性型の 100 倍、45 倍、12 倍、高かった。Co²⁺ または Mn²⁺ 活性型は 50°C で、未活性型より不安定であったが、Zn²⁺ 活性型は未活性型より安定であった。また、2価金属イオンによる活性化により *Sh*-PPase の k_{cat} が著しく増加する一方、 K_m には大きな影響は認められなかった。以上の結果より、2価金属イオンは *Sh*-PPase の触媒効率、温度依存性、熱安定性に対して大きな影響を及ぼし、Mn²⁺ または Co²⁺ が、本酵素の低温適応のために必要であることが明らかとなった。

2価金属イオンで活性化した *Sh*-PPase の機能特性に、金属イオン結合による立体構造の変化が関係しているかどうかを調べるために、蛍光と円偏光二色性 (CD) 分光分析を行った。トリプトファン残基の異方性及び CD スペクトルに金属イオンによる活性化の影響が認められなかったことから、2価金属イオンの活性部位への結合は、本酵素のトリプトファン残基の構造の揺らぎや二次構造に影響しないことが示唆された。一方、トリプトファン残基や蛍光プローブである 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) の蛍光スペクトルの変化から、2価金属イオンによる活性化の際に、トリプトファン残基側鎖の周りや、ANS 結合部位の環境の疎水性が弱くなることが示された。さらに、2価金属イオンによる活性化はトリプトファン残基蛍光のアクリルアミドによる消光効果を弱めた。以上の結果と *Sh*-PPase のホモロジーモデル構造から、2価金属イオンの活性部位への結合が酵素分子全体に構造変化を引き起こし、これが活性型酵素の温度依存性と熱安定性に影響しているものと考えられた。

Sh-PPase の低温適応機構をさらに明らかにするために、X線結晶構造解析のための結晶化を試みた。未活性型及び Mn 活性型 *Sh*-PPase の結晶を、中性または酸性の pH でポリエチレングリコールを沈殿剤として成長させることができた。しかし、これらの結晶の X線回折データは、酵素の 3次元構造解析をするために十分な質ではなかった。