

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	ELVY LIKE GINTING
審査委員	主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 佐賀大学 教授 濱 洋一郎
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 琉球大学 准教授 平良 東紀
審査協力者	
題 目	<p>Functional and structural analysis of inorganic pyrophosphatase from Antarctic psychrotroph <i>Shewanella</i> sp. AS-11 (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)</p>
<p>無機ピロホスファターゼ (PPase) は、無機ピロリン酸をリン酸へ加水分解する酵素で生物のエネルギー代謝に不可欠である。2種の可溶性 PPase ファミリーが存在し (ファミリー I、II)、これらの間でアミノ酸配列の類似性はないが、両ファミリー酵素の活性には金属イオンコファクターが必要である。<i>Shewanella</i> sp. AS-11 は、南極の氷に覆われた 0°C 以下の海に生息する貝類 <i>Neobuccinum eatoni</i> から分離された細菌である。本研究は、<i>Shewanella</i> sp. AS-11 由来無機ピロホスファターゼ (<i>Sh</i>-PPase) の低温適応機構を明らかにするために、大腸菌での大量発現系を確立し、硫安沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて組み換え酵素を精製した後、その機能及び構造解析を行ったものである。</p> <p><i>Sh</i>-PPase は、ファミリー II に属し、34 kDa のサブユニットからなるホモダイマーであり、活性発現には Mg²⁺ より Mn²⁺、Co²⁺あるいは Zn²⁺を必要とすることが明らかとなった。Zn²⁺、Co²⁺及び Mg²⁺で活性化した <i>Sh</i>-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、5°Cで著しく低かった。Co²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ で活性化した <i>Sh</i>-PPase の比活性は、そ</p>	

れぞれ、 Mg^{2+} 活性型の100倍、45倍、12倍、高かった。 Co^{2+} または Mn^{2+} 活性型は $50^{\circ}C$ で、未活性型より不安定であったが、 Zn^{2+} 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、 Mn^{2+} または Co^{2+} 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^{2+} 活性型 *Sh*-PPase の単結晶を、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。本研究では、酵素の立体構造を決定するには至っていないが、構造解析可能な良質の結晶を得るための基礎的情報を与えた。

以上のように、本研究は、全生物のエネルギー代謝において必須な役割を果たしているPPaseを対象として、その低温適応酵素を初めて発現、精製し、機能及び構造解析を行ったものである。これらの成果は、純粋に酵素の触媒反応機構の理解に貢献するばかりではなく、タンパク質の構造と機能に対する金属イオンの役割を理解する上でも重要な知見を与えている。よって、審査委員一同、本論文が博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。