

学 位 論 文 要 旨

氏 名

モハメド アブル カシエム タン

題 目

南極産好冷細菌 *Shewanella* sp. AS-11 由来酢酸キナーゼの低温適応に関する研究
 (Studies on Cold Adaptation of Acetate Kinase from Antarctic Psychrotrophic *Shewanella* species AS-11)

好冷細菌は氷点下に近い温度環境下で生育でき、一般に低温でも高い活性を有する低温適応酵素を生産する。酢酸キナーゼは ATP から酢酸への可逆的なマグネシウム依存性のホスホリル基転移反応を触媒し、アセチルリン酸と ADP を生じる酵素である。本酵素は構造的に ASKHA (acetate and sugar kinases/Hsc70/actin) スーパーファミリーに属し、触媒反応時にドメイン間の開閉のように大きな構造変化を起こす。本研究では、南極産好冷細菌 *Shewanella* sp. AS-11 由来の酢酸キナーゼ (SAK) を対象として、酵素構造の動きと触媒反応の関係を理解し、その低温適応機構を明らかにすることを目的とした。

SAK と大腸菌由来酢酸キナーゼ (EAK) 遺伝子の open reading frame を発現ベクター pETY-16b にクローニングし、T7 発現システムを用いて *E. coli* BL21 (DE3) 中にそれぞれの組換え酵素を過剰発現した。菌体抽出液の Blue Sepharose CL-6B と Super-Q カラムを用いたクロマトグラフィーにより両酵素を精製した。SAK は EAK とよく似た酵素学的性質を示したが、EAK より至適温度が低く、低い熱安定性を示した。SAK の酢酸に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) は 10°C で EAK の 13 倍高かった。両方向の酵素反応において、EAK に対する SAK の相対活性は低温になるほど増加した。さらに、両方向の反応で SAK 触媒反応の活性化エンタルピーとエントロピーは、EAK より低かった。これらの機能の比較解析結果は、SAK が低温適応酵素であることを示しており、酵素反応過程で SAK が EAK より大きな構造変化を起こし、遷移状態に到達することが示唆された。

SAK と EAK のホモロジーモデル構造は、ヒンジ領域で結ばれたほぼ等しいサイズの 2 つのドメインからなる似た構造をしていたが、SAK では、分子内塩橋とカチオン-パイ相互作用の数が EAK より少なかった。これは SAK が EAK より柔軟な構造をしていることを示唆している。両酵素のコンフォメーションの柔軟性を実験的にさらに調べるために、分子内の Trp と蛍光プローブである 8-anilino-naphthalene-1-sulphonate (ANS) の定常状態蛍光分析を行った。EAK は 46 番目に 1 つの Trp を有するが、SAK は 46 と 388 番目に 2 つの Trp を有する。これら Trp は活性部位の外に位置している。これら Trp の蛍光スペクトル、アクリルアミド、 Cs^+ および Γ^- による消光とその温度依存性、それにグアニンジン塩酸塩による変性を測定した結果より、SAK は EAK より柔軟で不安定な構造を有していることが証明された。さらに、SAK への ATP 結合のアクリルアミド消光に対する影響は EAK の場合より大きかった。これは、基質結合により誘導されるコンフォメーション変化が SAK では EAK より明らかに大きいことを示している。この結果は、SAK と結合した ANS の蛍光が ATP の SAK への結合により EAK の場合より著しく大きく消光されることから確認された。なお、ANS は両酵素の活性に対して混合型の阻害様式を示すことから、活性部位に拮抗的に結合するものではないことが示された。以上の結果より、SAK は EAK より柔軟な構造を有し、基質結合の際により大きな構造変化を受けることが明らかとなった。これは、酵素反応の温度依存性の速度論的解析結果と一致しており、これらの SAK の構造的な特徴が低温での高い活性に寄与しているものと考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

MD. ABUL KASHEM TANG

題 目

Studies on Cold Adaptation of Acetate Kinase from Antarctic Psychrotrophic *Shewanella* species AS-11
 (南極産好冷細菌 *Shewanella* sp. AS-11 由来酢酸キナーゼの低温適応に関する研究)

Psychrophiles have an ability to grow and to colonize environments, where the temperature is close to the freezing point of water and those organisms usually produce cold adapted or psychrophilic enzymes. Acetate kinase catalyzes the reversible magnesium-dependent phosphoryl transfer from ATP to acetate to form acetyl phosphate and ADP. The enzyme is a member of the ASKHA (acetate and sugar kinases/Hsc70/actin) superfamily of phosphotransferases, which undergoes a large conformational change during catalysis. This work has been undertaken to elucidate the mechanism of cold adaptation as well as the relationship of conformational dynamics and catalytic function of enzymes.

The open reading frames of the genes of psychrotrophic *Shewanella* sp. AS-11 (SAK) and the mesophilic counterpart from *Escherichia coli* K-12 (EAK) were cloned into the expression vector pETY-16b and the enzymes were overproduced by using the T7 system in *E. coli* BL21 (DE3). After extraction of recombinant SAK and EAK, these enzymes were purified by chromatographic steps on blue Sepharose CL-6B and Super-Q columns. SAK shared most of its properties with EAK but was characterized by a shift of the optimum activity towards low temperatures and by a lower thermal stability compared with EAK. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for acetate of SAK was 13-fold higher than that of EAK at 10°C. The activity ratio of SAK to EAK increased with decreasing temperature in both of the forward and reverse reactions. Furthermore, the activation enthalpy and entropy in both reaction directions catalyzed by SAK were lower than those catalyzed by EAK. These comparative functional analyses revealed that SAK is a cold-adapted enzyme and suggested that SAK reaches the transition state of enzymatic reaction through a larger conformational change than EAK.

The homology model structure of SAK and EAK displays a similar fold consisting of two domains of about equal size connected by hinge region but SAK shows reduced numbers of salt bridges and cation- π interactions than EAK, suggesting a more flexible structure of SAK. To experimentally further examine the conformational flexibility of both enzymes, the steady state fluorescence analyses of intrinsic Trp and the hydrophobic probe 8-anilino-naphthalene-1-sulphonate (ANS) were performed. EAK contains only one Trp at a position 46, while SAK contains two Trps at 46 and 388 outside the active site cleft. From the fluorescence emission spectra of the intrinsic Trp(s), quenching of Trp fluorescence with acrylamide, Cs⁺ and I⁻ at different temperatures and denaturation with guanidine-HCl, it was proved that the SAK has a more flexible and unstable structure than that of EAK. Furthermore, a larger effect of ATP-binding on the acrylamide quenching of SAK Trp fluorescence than that of EAK demonstrates that the substrate-induced conformational change for SAK was significantly larger than that for EAK. This was also supported by the fact that the fluorescence of ANS bound with SAK was much more drastically quenched by ATP-binding to SAK than observed with EAK. ANS inhibited both of SAK and EAK in a manner of mixed inhibition, suggesting that ANS is not a competitive dye that is bound to the active site. From all of these results, it can be concluded that SAK has a more flexible structure and undergoes larger substrate-induced conformational changes than EAK. This is consistent with the kinetic data for the temperature dependency of enzymatic reactions and these structural features of SAK may contribute to its high activity at low temperatures.

学位論文審査結果の要旨

| | |
|---|--|
| 学位申請者 氏 名 | MD. ABUL KASHEM TANG |
| 審査委員 | 主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一 |
| | 副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄 |
| | 副査 佐賀大学 教授 光富 勝 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志 |
| 審査協力者 | |
| 題 目 | <p>Studies on cold adaptation of acetate kinase from Antarctic psychrotrophic <i>Shewanella</i> species AS-11 (南極産好冷細菌 <i>Shewanella</i> sp. AS-11 由来酢酸キナーゼの低温適応に関する研究)</p> |
| <p>好冷細菌は氷点下に近い温度環境下で生育でき、一般に低温でも高い活性を有する低温適応酵素を生産する。酢酸キナーゼは ATP から酢酸への可逆的なマグネシウム依存性のホスホリル基転移反応を触媒し、アセチルリン酸と ADP を生じる酵素であり、微生物による酢酸代謝の最初の反応を触媒し、メタン産生においても重要な役割を果たす。本酵素は構造的に ASKHA (acetate and sugar kinases/Hsc70/actin) スーパーファミリーに属し、触媒反応時にドメイン間の開閉を伴った大きな構造変化を起こす。本研究では、南極産好冷細菌 <i>Shewanella</i> sp. AS-11 由来の酢酸キナーゼ (SAK) を対象として、その機能と構造を調べ、その低温適応機構について知見を得ることを目的とした。</p> <p>SAK と大腸菌由来酢酸キナーゼ (EAK) 遺伝子の ORF を発現ベクター pETY-16b にクローニングし、pET 発現システムを用いて大腸菌で組換え酵素を過剰発現した。菌体抽出液の Blue Sepharose CL-6B と Super-Q カラムを用いたクロマトグラフィーにより両酵素を精製した。SAK は EAK とよく似た酵素学的性質を示したが、EAK より至適温度が低く、低い熱安定性を示した。SAK の酢酸に対する触媒効率</p> | |

(kcat/Km)は10°CでEAKの13倍高かった。両方向の酵素反応において、EAKに対するSAKの相対活性は低温になるほど増加した。さらに、両方向の反応でSAK触媒反応の活性化エンタルピーとエントロピーは、EAKより低かった。これらの機能の比較解析結果は、SAKが低温適応酵素であることを示しており、酵素反応過程でSAKがEAKより大きな構造変化を起こし、遷移状態に到達することが示唆された。

SAKとEAKのホモロジーモデリングによる構造は、ヒンジ領域で結ばれた2つのドメインからなる似た構造をしていたが、SAKの分子内塩橋の数はEAKより著しく少なかった。これはSAKがEAKより柔軟な構造をしていることを示唆していた。両酵素のコンフォメーションの柔軟性を実験的に調べるために、分子内のTrpと蛍光プローブである8-anilinonaphthalene-1-sulphonate (ANS)の定常状態蛍光分析を行った。EAKは46番目に1つのTrpを有するが、SAKは46と388番目に2つのTrpを有し、これらのTrpは活性部位の外に位置している。Trpの蛍光スペクトル、アクリルアミド、Cs⁺およびI⁻による消光とその温度依存性、それにグアニジン塩酸塩による変性を測定した結果より、SAKはEAKより柔軟で不安定な構造を有していることが証明された。さらに、SAKへのATP結合のアクリルアミド消光に対する影響はEAKの場合より大きかった。これは、基質結合により誘導されるコンフォメーション変化がSAKではEAKより明らかに大きいことを示している。この結果は、SAKと結合したANSの蛍光がATPの結合によりEAKの場合より著しく大きく消光されることから確認された。なお、両酵素の活性に対するANSの阻害様式を調べた結果より、ANSはATPと拮抗的に活性部位に結合するものではないことが示された。これらの結果より、SAKはEAKより柔軟な構造を有し、基質結合の際により大きな構造変化を受けることが明らかとなった。これは、酵素反応の温度依存性の速度論的解析結果と一致しており、これらのSAKの構造的な特徴が低温での高い活性に寄与しているものと考えられた。

以上のように、本研究は、微生物による酢酸代謝の最初の反応を触媒し、メタン産生の鍵となる酢酸キナーゼを対象として、その低温適応酵素を初めて発現、精製し、性質を調べたものである。これらの成果は、純粹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、微生物による環境浄化やメタン産生に関わる応用分野でも重要な基礎的知見を与えている。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。

最終試験結果の要旨

| | |
|--|----------------------|
| 学位申請者 氏名 | MD. ABUL KASHEM TANG |
| 審査委員 | 主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一 |
| | 副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 徳永 正雄 |
| | 副査 佐賀大学 教授 光富 勝 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志 |
| 審査協力者 | |
| 実施年月日 | 平成 24 年 7 月 4 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>主査および副査は、平成24年7月4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、関連事項について諮問を行った。具体的には、別紙の様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出来た。</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

MD. ABUL KASHEM TANG

[質問 1] 好冷細菌 (*Shewanella* sp. AS-11) と大腸菌 (*E. coli*) はメタンを生産できますか？

[回答 1] いいえ、これらの細菌はメタンを生産できません。

[質問 2] なぜメタンを生産できない生物の酢酸キナーゼの研究をするのですか？

[回答 2] 立体構造が報告されているのは好熱性のメタン生産菌 (*Methanoserquina thermophila*) 由来酢酸キナーゼのみなので、構造の説明ではこの酵素を使用しましたが、本研究の主な目的は、酵素反応における低温適応機構の解明です。それで、好冷細菌と常温菌由来の酵素の比較を行いました。用いた酢酸キナーゼは触媒作用時に大きな構造変化を引き起こすので、酵素の低温適応機構を研究する材料として適していると考えています。もちろん、酢酸キナーゼはメタン生産に関わる重要な酵素であるということも本酵素を研究対象として選んだ理由の一つです。

[質問 3] 好冷細菌 (*Shewanella* sp. AS-11) 由来酢酸キナーゼ (SAK) の構造はメタン生産菌由来酢酸キナーゼ (MAK) に類似していますか？

[回答 3] はい、類似しています。SAKとMAKのアミノ酸残基数はそれぞれ401と408、ミノ酸配列の同一性は46%、活性に重要とされている活性部位と基質結合部位のアミノ酸はMet180以外完全に一致しています。また両酵素は生理的条件下では同じように二量体を形成しています。これらの事実から、両酵素の立体構造はよく似ていると考えられます。発表で示したSAKの三次元構造は、MAKの三次元構造を鋳型として構築したモデル構造で、MAKとほとんど同じ構造をしていました。したがって、本研究で得られた構造と低温適応との関係に関する知見は、メタン生産菌の酢酸キナーゼにも適応できるものと考えています。

[質問 4] スライド25で 左と右の図の違いは何ですか？

[回答 4] 左図は、変性剤 (グアニジン塩酸塩) 濃度の増加に伴う、Trp蛍光の最大波長の増加 (すなわちレッドシフト) の様子を示しています。右図は、グアニジン塩酸塩濃度に対する変性率を示していますが、このデータは波長355 nmでTrpの蛍光強度を測定した結果に基づいています。

[質問 5] グアニジン塩酸塩の濃度を上昇させたときに、レッドシフトと355 nmにおける蛍光強度の変化の様子が異なる理由は何ですか？特にSAKではグアニジン塩酸が0.5 M以下の低濃度の時からレッドシフトが見られますが、355 nmの蛍光強度には変化がみられません。

[回答 5] 大変、重要な指摘をありがとうございます。355 nmを最大波長とする蛍光は完全に変性した状態のものです。SAKでは完全変性とは異なる構造変化が低グアニジン濃度で引き起こされているものと考えられます。

[質問 6] 各グアニジン塩酸濃度における変性の自由エネルギーの算出方法を教えてください。

[回答 6] 天然状態 (N) と変性状態 (U) の2つの平衡状態 ($N \rightleftharpoons U$) にあると仮定して、次の式を用いて算出しました。

$$K_{eq} = [U]/[N]$$

$$\Delta G = - RT \ln K_{eq}$$

[質問 7] 酵素のATPとの結合とANSとの結合はどのような関係になっているのでしょうか？

[回答 7] ATP存在下と非存在下で酵素とANSの親和性に大きな違いが認められず、

ANSの蛍光強度のみに変化がみられることから、ANSはATPとは異なる部位に結合しているものと推定されます。このことは、ATPと酢酸を基質とする酵素活性に対するANSの阻害が拮抗型ではなく混合型阻害であることからもいえます。

[質問 8] スライド35において、25°CでSAKの場合のANS蛍光強度の増加曲線がANS低濃度でS字状に曲がっているのはなぜでしょうか？

[回答 8] 確かにSAKの場合、25°Cではヒル係数1.8のアロステリック・カーブをしています。10°Cから25°Cに温度が上がるとSAKの構造はより柔軟性に富んだ構造となり、ANSの結合により、アロステリックな構造変化を起こすものと考えられます。もし、ANSが酵素分子あたり1分子のみ結合するとしても、酵素がダイマーであることからANS結合のアロステリック効果は起こります。

[質問 9] SAK蛍光の塩化セシウムによる消光のStern-Volmer プロットは、温度の上昇と共に、傾き（消光定数）が増加していましたが、ヨウ化カリウムによる消光の場合は、温度の上昇と共に、傾きが減少しているのは、なぜでしょうか？

[回答 9] それは、Cs⁺とI⁻の消光原理の違いによるものと考えられます。この結果より、Cs⁺は動的な衝突消光物質として働いていることが分かります。温度が上昇するにつれて、Cs⁺がTrp残基のインドール・グループと衝突する頻度が高くなり、その結果、消光が大きくなったと考えられます。一方、I⁻は静的な結合消光物質として働いているものと考えられます。I⁻とSAKの陽電荷の間で結合が起こり、Trp残基のミクロ環境が変化し消光が起こっていると考えられます。温度が上昇するにつれて、I⁻が解離し、消光が減少するものと推察されます。

[質問 10] あなたは好冷菌由来のSAKと常温菌由来のEAKを比較することにより、低温適応するためには塩橋の消失が重要であるといっていますが、この結論は、データベースに登録されている他の酢酸キナーゼについてもいえることでしょうか？また、他の種類の酵素についても普遍的にいえることでしょうか？

[回答 10] 登録されている他の酢酸キナーゼのアミノ酸配列とは比較していません。また、酵素全般に塩橋の消失が低温適応に重要であるかは興味深いので、今後、検討したいと思います。

[質問 11] 塩橋の消失以外の例はこれまでに報告されていますか？

[回答 11] はい、これ以外にも水素結合、疎水的相互作用、陽イオン・パイ相互作用などの消失、グリシンの増加など、多くの可能性が報告されています。

[質問 12] どれくらいのANS分子がSAKとEAKに結合しているかについて計算することができますか？

[回答 12] いいえ、今回の結果からはSAKとEAKに結合しているANS分子の数を計算することはできません。ANS分子の結合数を出すには別の実験が必要ですが、この研究においては、2つの酵素間の構造的な柔軟性や動きの比較を行うことに重点をおいていたため、ANS分子の結合数を求めるための実験は行いませんでした。

[質問 13] ASKHAスーパーファミリーは代表的なものとしてHsc70またはActinがありますが、これらの特徴の説明がありません？

[回答 13] 今回はホスホリル基転移酵素を含むファミリーとしてあげていますので、Hsc70やActinについては触れませんでした。