

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 三橋 敏

炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase、以下 CA と略す) は水溶液中において二酸化炭素と重炭酸イオンとの間の平衡反応を触媒する酵素である。CA は、真核生物、原核生物、古細菌に広く分布し、イオン輸送、pH 調節、光合成などの様々な生理機能において重要な役割を持っている。近年、多くの生物より CA 遺伝子が単離され、それらは一次構造上お互いに相同性を殆ど示さない 3 タイプ (α, β, γ 型) に分けられることが明らかになってきた。このことから CA は 3 つの異なる起源を持つ収束進化の酵素の例として知られるようになった。3 つのタイプは一次構造上の違いから立体構造も全く異なっていると考えられ、実際 1996 年に明らかになった γ 型 CA の立体構造はそれまで知られていた α 型のものとは全く異なるものであった。 β 型 CA は高等植物、藻類、菌類、バクテリアに広く分布することが示されてきたが、その立体構造は一例も報告されていない。本研究は単細胞性紅藻 *Porphyridium purpureum* より β 型 CA を精製した後、cDNA を単離し、それを利用して結晶化を行い、X線結晶構造解析により立体構造をはじめて明らかにした点で注目される。論文の内容は以下のようにまとめられる。

まず、全長 cDNA クローンを単離した。CA 活性に対する阻害剤を利用したアフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにより藻体抽出液から CA を精製した。引き続き、この精製 CA をリジルエンドペプチダーゼにより消化し得られた断片のペプチド配列を決定し、それをもとに cDNA 部分断片を PCR により増幅した後、それをプローブとして全長 cDNA クローンをライブラリーよりスクリーニングした。塩基配列決定の結果、この cDNA は 571 アミノ酸残基のポリペプチド (分子量 62,094) をコードし、この酵素のモノマーは分子内に β 型 CA に保存されているアミノ酸配列の繰り返し構造があることが明らかとなった。モノマーの分子量は他の β 型 CA のほぼ 2 倍であるため、このモノマーは進化の過程で β 型 CA 遺伝子が重複融合した結果、形成されたものであることが示唆された。さらに、この cDNA を用いて大腸菌内での大量発現系および大量精製系を確立した。

つぎに大量発現させた CA を抗原としポリクローナル抗体を作製し、金コロイド免疫電顕法により細胞内局在を調べた結果、CA は空気通気条件で培養した *Porphyridium* 細胞の細胞膜の細胞質側表面に存在することが分かった。CA は植物の光合成反応において溶存無機炭素を効率よく固定するために重要な機能を持っていると考えられている。*Porphyridium* においては、細胞膜の内側に存在することにより細胞内に取り込まれた無機炭素が二酸化炭素の形で漏出することを防いでいるものと考えられた。

さらに立体構造解明のため X線結晶構造解析を行った。24% ポリエチレングリコール 4000、300 mM 硫酸アンモニウム、50 mM カコジル酸ナトリウム (pH 6.75) のリザーバー溶液と CA 溶液

(30 mg/mL, pH 8.5) を用いたハンギングドロップ法により板状結晶を得ることに成功した。得られた結晶は実験室レベルの X 線源を利用した検討で分解能 2.5 Å の反射が得られ、空間群 $P2_1$ の単結晶であることが判明した。構造決定に使用した X 線回折データは放射光施設 SPring-8 ビームライン 45XU で液体窒素により凍結させた結晶について 3 波長を用いて収集した。構造決定は、もともと活性部位に結合している亜鉛を用いた多波長波長異常散乱法により 2.2 Å の分解能で行い、 $R = 0.208$ 、 $R_{\text{free}} = 0.274$ まで精密化を行った。その結果、モノマーが 2 つ会合してダイマーを形成し、モノマー内の繰り返し配列を反映して、このダイマーは見かけ上テトラマー様分子として、疑似 222 対称を持つことが分かった。この結果は精製酵素について Superdex 200 カラムを用いたゲルろ過法により分子量 (137k) が得られたことと一致する。モノマー内に 2 回繰り返される β 型 CA の最小単位の構造は、4 本の平行 β -ストランドと 1 本の逆平行 β -ストランドによって形成されるコアとなる β -シートと、その周囲を取り巻く α -ヘリックスによって構成されることが分かった。全体的な立体構造上からも α 型 CA、 γ 型 CA とは全く異なっていることが判明し、起源の異なる酵素であることを裏付けることとなった。さらに、活性中心である亜鉛は Cys149-Asp151-His205-Cys208 および Cys403-Asp405-His459-Cys462 の 4 アミノ酸残基によって結合されていた。亜鉛結合部位は、 β 型 CA グループにおいて高度に保存されているアミノ酸残基で構成される“くぼみ”に存在する。これらのアミノ酸残基は反応機構において重要な機能を持っていると考えられる。 α 型 CA および γ 型 CA では亜鉛は His-His-His- H_2O によって結合されており、活性部位付近の構造も全く異なることが明らかとなった。

最後に、亜鉛を結合している Asp 残基および Cys 残基の役割を調べるためこれらの残基を Asn、Ala および Ser に置換した酵素を作製し単離精製した後、比活性と亜鉛結合量を測定した。その結果、Asp151 あるいは Asp405 のどちらかを置換すると酵素全体の活性が失われるが、亜鉛結合量は減少しなかった。一方、Cys149 あるいは Cys403 のどちらかを置換した場合は一方の活性部位に由来する活性が失われ、それに伴う分だけ亜鉛結合量も減少した。このことは Asp 残基が亜鉛を結合する役割だけを持つのではなく、より直接的に反応機構に関与することを示唆するものである。

炭酸脱水酵素は古典的に研究されてきた酵素であり、その反応機構について動力学的・構造学的両面から集中的な解析が行われている。最近、 γ 型 CA の反応機構が α 型 CA に類似したものであることが報告されたが、 β 型 CA については未だ解明されていない。本論文では β 型 CA の立体構造がはじめて明らかにされたが、これは β 型 CA の反応機構解明の基礎となるものとして高く評価される。進化的起源が異なるがゆえに構造的にも異なり、しかも同一の反応を触媒する酵素の、構造と反応機構の関係について本論文は重要な知見を与えるものであり、極めて意義深いと考えられる。

なお、本論文の内容は申請者がファーストオーサーの論文として公表されているが、いずれも申請者の貢献度が最も高い。これらの内容について審査委員会で評価した結果、審査委員全員一致して、申請者に博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。