

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 16 年度博士課程 入学

氏 名 矢吹 崇吏
指導教員名 祥雲 弘文

論文題目 *Sulfolobus tokodaii* 由来硫黄代謝関連酵素及び脂肪酸代謝関連酵素に関する研究

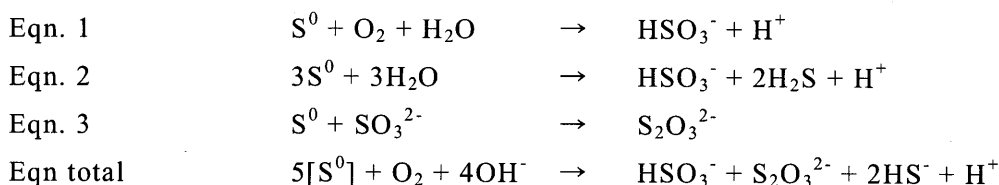
1. 序

世界中の熱水噴出孔、温泉および火山性の環境には、その高熱・酸性環境に適応した真正細菌や古細菌が生育している。硫黄代謝高度好熱好酸性菌に属する *Sulfolobus tokodaii* は pH 2~4、75~80℃ 付近で最もよく生育する古細菌であり、そのエネルギー獲得様式や生体分子の代謝様式は、他の生物との比較において興味深い。本研究では *S. tokodaii* の硫黄代謝関連酵素と脂肪酸代謝関連酵素の構造決定と機能解析を行なった。

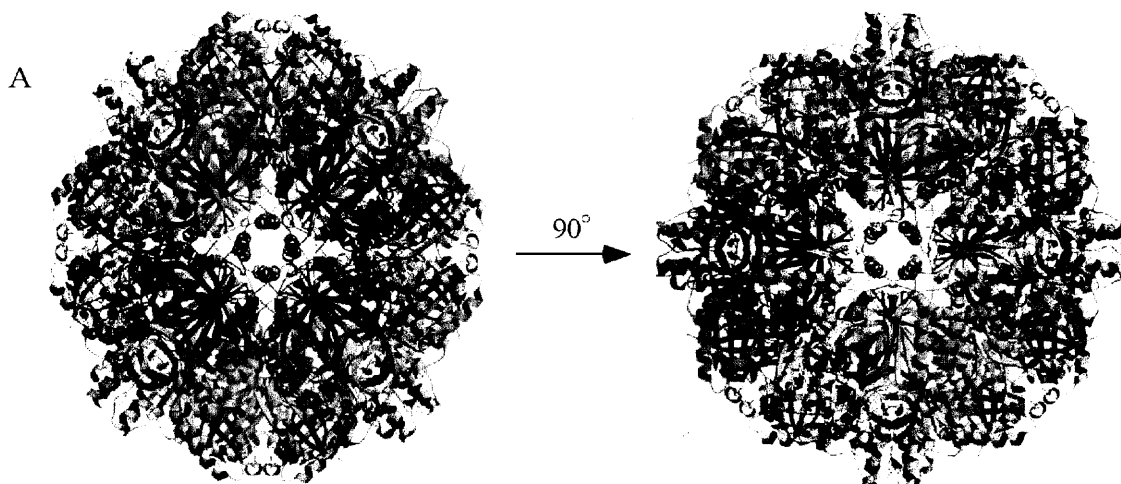
2. *Sulfolobus tokodaii* 由来硫黄代謝関連酵素

Sulfolobus の生育環境には多くの硫黄化合物や元素状硫黄が存在している。生物学的な元素状硫黄の酸化・還元は、地球上における元素状硫黄の循環において非常に重要な反応である。元素状硫黄は好氣的無機栄養生物による様々な硫黄酸化経路において電子受容体として働き、嫌氣的な有機栄養微生物や独立栄養微生物の呼吸鎖においては電子供与体として働く。*Sulfolobus* 属は含硫黄化合物が豊富な温泉域に生息しており、元素状硫黄の酸化をしていると考えられているが、そのような活性を持つ酵素は報告されていない。硫黄代謝についてよく研究されている *Acidianus ambivalens* において、元素状硫黄の酸化に関わる Sulfur oxygenase reductase (SOR) という可溶性の酵素が報告されており¹⁾、この酵素のホモログが *S. tokodaii* にも保存されていることが明らかとなった。そこで我々は、*S. tokodaii* 由来の SOR (StSOR) の性質決定ならびに構造解析を目的として研究を行

った。SORは元素状硫黄の酸化反応 (Eqn. 1) と不均化還元反応 (Eqn. 2) を触媒する。また、高温条件下において元素状硫黄と亜硫酸は非酵素学的にチオ硫酸になる (Eqn. 3)。



精製した StSOR は 80°C、pH 6.0 で最大活性を示した。*A. ambivalens* 由来の SOR (AaSOR) は 1 mM の Zn^{2+} によって酵素活性が大幅に減少したという報告がある¹⁾。しかし、1 mM Zn^{2+} は StSOR では酸化活性の 26% を阻害し、還元活性においては逆に活性化するという結果が得られた。また、10% ジオキサン、0.1 M MES pH 6.5、1.6 M 硫酸アンモニウムという条件において、StSOR の結晶を得ることができた。AaSOR の構造²⁾ (PDB ID: 2CB2) をサーチモデルとして分子置換を行い、構造決定ならびに精密化を行った。構造精密化の結果、分解能 2.0 Å、 $R_{factor} = 16.7\%$ 、 $R_{free} = 22.8\%$ の構造を得ることができた。StSOR の構造は AaSOR の構造と非常によく似ていたが、活性中心付近の構造で相異が見られた (図 1)。既知の AaSOR の構造では Cys31 が Cysteine persulfide (C_{ss}) であると報告されている²⁾ が、StSOR においては通常の Cys であった。AaSOR において活性を示すにはこの C_{ss} が重要であると考察されていたが、StSOR も活性型の酵素であるため、活性には必ずしも Cys31 の C_{ss} が必要ではないことが示唆された。また、活性中心となる non-heme Fe に配位する正体不明な電子密度も観察された。



B

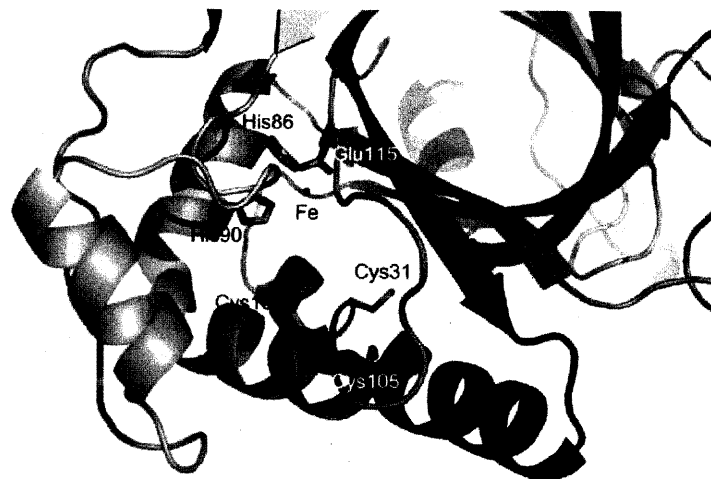


図1. StSORの全体構造と活性中心付近の様子

A : StSORはホモ24merの球状の構造をしており、各サブユニットには活性中心であるnon-heme Feが存在していた。

B : StSORの活性中心付近の様子を示した。活性中心であるとされるnon-heme FeにはHis86、His90およびGlu115が配位していた。既知のAaDORではCys31がcysteine persulfide (C_{ss})であるとされていたが、StSORでは修飾の受けていないCysであることがわかった。

3. *Sulfolobus tokodaii* 由来脂肪酸代謝関連酵素

以前、当研究室で *S. tokodaii* の無細胞抽出液よりルブレリスリン様タンパク質³⁾を精製する際、Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーの過程において、フラビン由来の黄色を呈する画分が発見された。TOF-MS を用いて、この黄色のタンパク質の部分アミノ酸配列を決定したところ、ST0916 という ORF の産物であることが明らかとなった。*S. tokodaii* のゲノムには7つの hypothetical acyl-CoA dehydrogenase (ACD)がコードされており、ST0916 はそのうちの1つであった。ACDは脂肪酸のβ酸化に関与し、脱水素反応によりアシル CoA のαβ間にトランス型の二重結合を形成することでトランス-Δ²-エノイル CoA を生成する酵素である。2章では、ST0916 の X線結晶構造を解析した。大腸菌を用いて組み替え ST0916 を大量発現させ、陰イオン交換・ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。回折データの収集は、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設 PF-AR ビームライン NW12 で行った。初期位相の決定にはセレノメチオニン置換体によるMAD法およびMR法(モデル分子、medium chain ACD ; 3MDE)⁴⁾により行った。構造精密化の結果、分解能 1.9 Å、 $R_{\text{factor}} = 22.0\%$ 、 $R_{\text{free}} = 25.1\%$ の構造を得ることができた。図2にST0916のモノマー構造と全体構造を示す。ST0916はFADが結合したflavoproteinであり、イソアロキサジン環周辺ではHis341とPhe342によって基質進入通路がふさがれており、この環境からACD活性の発現は考えにくい。

実際に、ACDの基質である各種アシル CoA が還元されることはなかった。ST0916に相同性を示すタンパク質は、ACD familyにおいて高度に保存された活性中心周辺の IYEG モチーフとは異なる LHF モチーフ (ST0916 ; Leu340-His341-Phe342) を有していた。この LHF モチーフを持つ ACD 類似タンパク質が他の好熱性古細菌である *Thermoplasma* にも存在していた。以上のことより、これらの LHF モチーフを持つ ACD 様タンパク質は機能未知ではあるが新しい family を構成していることが示唆された⁽⁵⁾。

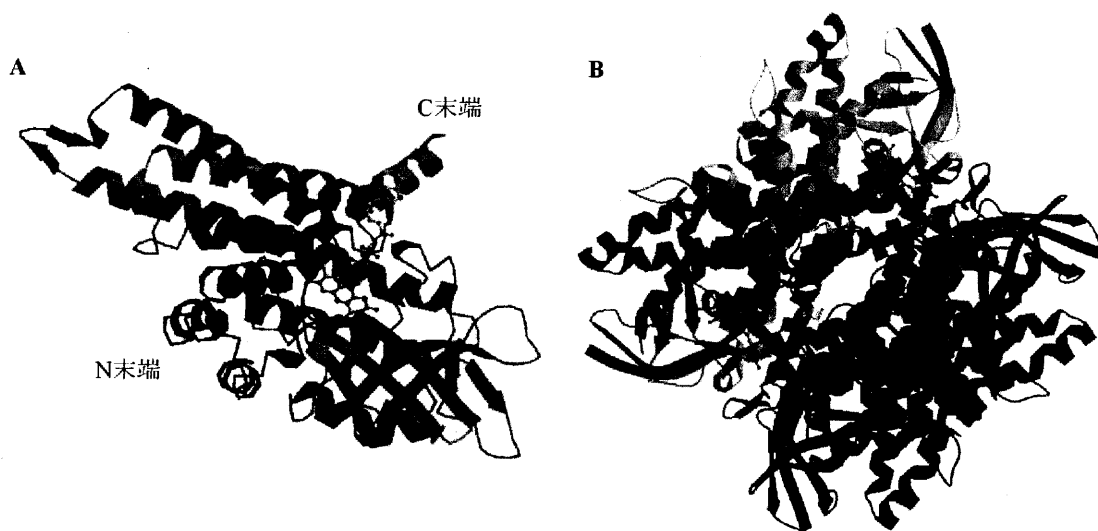


図2. ST0916のモノマー構造と全体構造

A : ST0916のモノマー構造。FADは黄色のball-and-stickモデルで示した。モノマー構造は青色の α -ヘリックスドメイン、緑色の β -シートドメイン、およびオレンジ色の α -ヘリックスドメインから成り、豚由来のmedium-chain acyl-CoA dehydrogenaseと非常によく似ていた (RMSD = 1.6 Å)

B : ST0916の全体構造。2量体が基本単位であり、dimer-of-dimerの全体構造であった。

Reference

- 1) Kletzin, A. (1989). *J. Bacteriol.* **171**(3) : 1638-43.
- 2) Urich, T., Gomes, C.M., Kletzin, A., and Frazao, C. (2006). *SCIENCE*. **311** : 996-1000.
- 3) Fushinobu, S., Shoun, H., and Wakagi, T. (2003). *Biochemistry*. **42**(40) : 11707-715.
- 4) Kim, J.J., Wang, M., and Paschke, R. (1993). *Proc.Nati.Acad.Sci.* **90** : 7523-27
- 5) Yabuki, T., Fushinobu, S., Shoun, H., Wakagi, T. (2005). 15th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FLAVINS AND FLAVOPROTEINS, Program and Abstracts. : 182.