

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 矢吹 崇吏

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。本論文は *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について述べたものである。

第1章では、生命の誕生と古細菌において議論されているパイライト説や、硫黄代謝高度好熱好酸性菌に属する *Sulfolobus tokodaii* について述べ、さらに、好熱性古細菌による元素状硫黄の代謝系および脂肪酸代謝関連酵素について述べている。*S. tokodaii* は絶対好気性通性独立栄養古細菌であり、その生育環境には豊富に元素状硫黄が存在している。このような環境に生育する *S. tokodaii* には硫黄代謝系が存在しているのではないかと容易に推測することができるが、現在までに硫黄代謝に関する酵素の報告はなかった。*Sulfolobus* 属と近縁である *Acidianus ambivalens* において、元素状硫黄を直接酸化する sulfur oxygenase reductase (SOR) という酵素が報告されている。SOR は細胞質に局在する可溶性の酵素であり、高温・好気条件下で元素状硫黄の酸化と還元を同時に行う酵素である。SOR は *S. tokodaii* や *A. ambivalens* などの古細菌および限られた真正細菌にのみ保存されている酵素であり、それらのアミノ酸配列は非常に類似していた。*Sulfolobus* 属で *sor* 遺伝子を保存しているのは、*S. tokodaii* のみであった。当初、SOR の機能解析などの研究は進んでいたものの、その構造は明らかにならず、構造学的な研究は全く進んでいなかった。

第2章では、*S. tokodaii* 由来の SOR (STSOR) の大腸菌を用いた大量発現系の構築について述べている。STSOR の大量発現に成功し、高純度で精製が可能となった。

第3章では、精製した STSOR の機能解析について述べている。STSOR の至適温度は 80℃、至適 pH は 6.0 であった。ICP 発光分析の結果、1 サブユニットあたり 0.8 mol の鉄イオンが含まれていることが明らかとなり、それ以外の補因子は含まれていなかった。Hg²⁺ や pCMB によって活性が著しく低下したため、活性にシステイン残基が関与することが示唆された。

第4章では、STSOR の結晶化と X 線結晶構造解析について述べている。良質な STSOR の結晶の作成に成功し、セレンメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法や重原子同型置換法による位相決定を試みたが、位相問題を解決することができなかった。しかし、Urich 等に

よって *A. ambivalens* 由来 SOR (AASOR; 2CB2) の構造が報告された。この構造をサーチモデルとした分子置換法により、STSOR の位相を決定し、2.0Å の分解能で立体構造を明らかにした。STSOR と AASOR の構造は非常に類似していた。全体構造はホモ 24 量体の中空球状の構造をしており、chimney と呼ばれる特徴的な煙突状の構造が球の表面に 6 つあった。この chimney は 4 つのサブユニットの α 4-helix が疎水的相互作用でバンドルすることによって形成されていた。chimney は疎水的なゲートを形成し、外部と内腔を遮断されることで、内腔は reaction chamber となっていた。AASOR の構造では Cys31 が Cysteine persulfide (Css) であると報告されているが、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 Css 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 Css が必要ではないことが示唆された。

第 5 章では、*S. tokodaii* の無細胞抽出液中から見出された黄色タンパク質の X 線結晶構造解析について述べている。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。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 α β 間にトランス型の二重結合を形成することでトランス- Δ^2 -エノイル CoA を生成する酵素である。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) により行った。その結果、分解能 1.9Å の構造を得ることができた。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。

以上、本論文では、*S. tokodaii* の硫黄酸化還元酵素および ACD 様タンパク質の構造と機能において重要な知見を得ることに成功した。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。