

氏 名	よし だ しょう すけ 吉 田 昭 介
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2897 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Engineering of a Type III Rubisco from a Hyperthermophilic Archaeon Aimed to Enhance Catalytic Performance at Ambient Temperatures (超好熱始原菌由来 Type III Rubisco の常温域における機能改良に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏 教 授 濱 地 格

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、鹿児島県小宝島から単離された超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来 Type III Rubisco を題材として機能改良を行い、その成果についてまとめたものであり、序論、本論 3 章、結論から構成されている。

序論では、生物的炭酸固定、Calvin-Benson 回路、Rubisco の反応機構、Rubisco の機能改良の現状、本研究の題材である超好熱始原菌由来 Rubisco の生化学的、結晶構造学的特徴などがまとめられている。

第 1 章では、超好熱菌由来 *Tk*-Rubisco が常温光合成生物の炭酸固定酵素として機能し得るかどうかを検証した。本研究では宿主として、常温光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* No. 7 株を用いた。まず、本菌内在性 Rubisco 遺伝子を探索し、3 種の Rubisco 遺伝子を同定した。これらの Rubisco 遺伝子を破壊し、独立栄養増殖を示さない *R. palustris*  $\Delta 3$  株を単離した。自律複製型プラスミドに *Tk*-Rubisco 遺伝子を載せて  $\Delta 3$  株に導入し ( $\Delta 3pRbc$  株)、常温での光独立栄養増殖の可能性を検討した。野生型の *R. palustris* No. 7 株と比較して増殖速度は低いものであったが、 $\Delta 3pRbc$  株が光独立栄養生育を示したことから、*Tk*-Rubisco は常温で独立栄養生物の炭酸固定酵素として機能できることが判明した。そこで次に、*Tk*-Rubisco の発現量を低く抑えるため、*Tk*-Rubisco 遺伝子をゲノム上に 1 コピー挿入した組換え株 ( $\Delta 3cRbc$  株) を作製した。 $\Delta 3cRbc$  株も光独立栄養増殖が可能であった。 $\Delta 3pRbc$  株と  $\Delta 3cRbc$  株の細胞内 carboxylase 活性と比増殖速度を比較し、相関関係があることを見出した。このことから、*R. palustris*  $\Delta 3$  株を宿主として利用することにより *Tk*-Rubisco 変異体の常温における機能を生体内で評価することが可能となった。

第 2 章では、*Tk*-Rubisco の常温における機能改良を目的として種々の合理的変異導入を試みた。変異導入に先立ち、*Tk*-Rubisco の常温域 (25℃) における機能を反応速度論解析により明らかにした。本解析により、carboxylase 活性、特にその回転数が低いことが判明したため、これを改善することを目標とした。一般的に超好熱菌由来酵素は高度な耐熱性を示し、高温領域で触媒機能が最大となるような構造を示すが、これは常温酵素と比べてタンパク質内部の疎水性相互作用の増強や分子内イオン結合の増加により達成されている。しかしながら、これらの相互作用により超好熱菌由来酵素は逆に常温域では柔軟性が抑制され、常温生物由来酵素と比べて活性が低い傾向がある。そこで常温領域における *Tk*-Rubisco の柔軟性を向上させる目的で、既に解明された *Tk*-Rubisco の立体構造のデータから特に強いイオン結合が示唆されるイオンペアを選び出し、片方のアミノ酸に部位特異的変異を導入することでイオンペアを解除した。これらの変異タンパクを  $\Delta 3$  株に導入し、光独立栄養条件下で評価したが、有意な機能向上を示す変異体は存在しなかった。そこで従来の Rubisco タンパク質で反応中に構造変化を起こすことが知られている Loop6 から  $\alpha$ -helix6 領域に着目した。この領域を常温生物由来の Rubisco と置換することにより、常温での柔軟性を向上させ、触媒活性向上が期待できるのではないかと考えた。常温生物由来 Rubisco として、ホウレンソウ、紅藻 *Galdieria partita* および紅色非硫黄細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来酵素のアミノ酸配列を参考にした。Loop6 領域の変異体解析から、この領域のいかなる変異も活性に致命的な影響を与えることがわ

かった。一方で、 $\alpha$ -helix6領域のみの変異体酵素は全て活性を保持していた。 $\alpha$ -helix6領域の変異体の中で、特に $\alpha$ -helix6領域全体をホウレンソウ由来の同部位（11アミノ酸）と入れ替えた変異体SP6は $\Delta 3$ 株の系で比増殖速度が31%増加した。*in vitro*解析においてもSP6は $k_{cat}$ が32%、 $k_{cat}/K_{CO_2}$ が17%増加していることが判明した。

第3章ではSP6変異タンパクの置換残基の中で触媒機能向上に寄与する残基の特定を試みながら、本領域の最適化を目指した。SP4（ $\alpha$ -helix6前半部分がホウレンソウ由来Rubiscoと置換）とSP5（ $\alpha$ -helix6後半部分がホウレンソウ由来Rubiscoと置換）の変異の合計がSP6であるが、SP6が $\Delta 3$ 株の増殖を向上させたのに対し、SP4とSP5は $\Delta 3$ 株の増殖を低下させた。このことから、SP6の機能向上の原因は単なる個々のアミノ酸置換の加算的な効果によるものではなく、前半と後半領域の相互作用がSP6の機能向上に働いたと考えた。SP4を土台とした $\alpha$ -helix6後半領域への変異導入、SP5を土台とした $\alpha$ -helix6前半領域への変異導入を行い、これにより、前半1つ、後半1つの重要残基を同定することに成功した。特にここで得られたSP5-V330T変異体は、種々の変異導入で得られた変異体の中で最高の性能を示し、*in vitro*解析で $k_{cat}$ が73%、 $k_{cat}/K_{CO_2}$ が57%増加していることがわかり、 $\Delta 3$ 株の比増殖速度を55%増加させた。また、機能向上が観察された変異型酵素の耐熱性を調べたところ、明らかな耐熱性の低下が認められ、これらの変異型酵素が柔軟性を獲得し、より常温型酵素へとシフトした結果であると考えられた。

結論では、本論文で得られた成果について要約している。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来 Rubisco Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) の常温域における機能改良に関して研究を行い、その成果についてまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

(第1章) 超好熱菌由来 *Tk*-Rubiscoを、常温光合成細菌の Rubisco 遺伝子破壊株に導入することにより、本酵素が常温でも Calvin回路の炭酸固定酵素として機能し得ることを発見した。また、本酵素の発現量の異なる組換え株を作製し、細胞内の Rubisco活性と比増殖速度との間に相関関係があることを見出した。これにより、*Tk*-Rubisco 変異体の常温における機能を生体内で評価する系が構築できた。

(第2章) *Tk*-Rubisco の常温における機能改善を目的として種々の合理的変異導入を試みた。これらの変異タンパク質の機能を常温光合成細菌の系を用いて評価した。 $\alpha$ -helix6領域をホウレンソウ由来の同部位と入れ替えた変異タンパク質 (SP6) を導入した株は野生型 *Tk*-Rubisco を導入した株より高い比増殖速度を示し、SP6 変異タンパク質の機能向上を *in vitro* 解析においても確認できた。

(第3章) SP6 変異タンパク質の置換残基の中で触媒機能向上に働く残基の特定を、種々の部位特異的変異導入によって試み、2つの重要残基を同定することに成功した。また、 $\alpha$ -helix6領域の最適化を行い、さらに触媒効率の良い変異型 *Tk*-Rubisco を作製した。SP6 などの大規模な変異導入を施されたタンパク質は構造安定性に明らかな低下が見られ、その代わりに常温における flexibility を獲得した結果、触媒機能が向上した可能性が示唆された。

以上のように本論文は、超好熱菌由来 Rubisco の構造安定性を利用して常温域において改良するという新しい試みに成功しており、その評価手法として常温光合成細菌を用いる系を開発し、使用している点が優れている。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成20年1月30日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。