

氏 名 ラジャ ノール ザリハ ラジャ アブドール ラハマン
Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman
 学位(専攻分野) 博 士 (工 学)
 学 位 記 番 号 論 工 博 第 3362 号
 学位授与の日付 平成 10 年 7 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学 位 論 文 題 目 Studies on enzymes for ammonium assimilation in hyperthermophilic archaeon
Pyrococcus sp. strain KOD 1
 (超好熱菌 *Pyrococcus* sp. KOD 1 株のアンモニア同化系酵素に関する研究)
 (主査)
 論文調査委員 教 授 今 中 忠 行 教 授 砂 本 順 三 教 授 田 中 渥 夫

論 文 内 容 の 要 旨

超好熱菌 (Hyperthermophile) は、その生育環境の特殊性や系統解析から、原始生命体に最も近い生物の一つと考えられている。特に超好熱始原菌 (Hyperthermophilic archaea) は 16SrRNA の配列による系統解析では高等真核生物と同一の枝から分岐しており、両者の近縁性が指摘されている。実際、転写、翻訳といった遺伝情報をプロセスする酵素はその一次配列のみならず、立体構造、触媒機構に真核生物の酵素と同じ特徴がみられる。一方、代謝経路においては不明な点が多く、特にアンモニアを中心とする窒素代謝の機構は明らかにされていない。

本論文では超好熱始原菌 *Pyrococcus* sp. KOD 1 株のアンモニア同化に中心的な役割を果たすと考えられるグルタミン合成酵素 (GS)、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)、及びグルタミン酸合成酵素 (GOGAT) に注目し、各遺伝子の系統解析を行うとともに、酵素的性質を研究している。また、組換え蛋白質の熱処理による構造の成熟化について、GDH をモデル蛋白質として研究を行っており、第 1 章から第 6 章で構成されている。

第 1 章ではこれまでの研究で蓄積された超好熱菌の特殊な遺伝子構造と酵素の興味深い反応特性の概略を述べ、本研究を行うに至った経緯を説明している。

第 2 章では KOD 1 株の GS 遺伝子 (*glnA*) をクローニングし、その塩基配列に基づく系統解析を行うとともに、大腸菌を宿主にして発現した酵素を用いて GS の酵素的性質の検討を行っている。KOD 1 株の GS は系統上、細菌の酵素と同様、GSI のグループに属していることが示されている。基質に対する反応速度定数の比較から本酵素は低アンモニア濃度下ではグルタミンを合成するが、高アンモニア濃度下ではグルタミン酸の合成活性が強いことが示されている。また、アデニル化による調節は受けず、反応には ATP 以外に GTP も効率良く利用することが明らかにされている。

第 3 章では GDH の性質について調べ、細胞内含量が異常に多いこと、また酵素の反応速度定数の比較から反応がグルタミン酸合成の方向に偏っていることを示している。このことから、GDH がアンモニア同化の中心的な酵素と予想している。加えて GDH はグルタミンからグルタミン酸の合成反応も触媒することが示されている。また、GDH 遺伝子 (*gdhA*) のクローニングを行い、組換え酵素を精製し天然型酵素と性質を比較したところ、組換え酵素は比活性、耐熱性の点で天然型酵素に劣っていることが示されている。(本酵素を用いた熱処理による構造成熟については第 5 章で詳しく述べている。) また、アミノ酸配列を用いた系統解析により、本酵素は高等真核生物の GDH と近縁性が高く、GDH ファミリー II に分類されている。

第 4 章では GOGAT 遺伝子 (*gltA*) の性質について触れている。塩基配列の解析から、KOD 1 株のゲノム上には小サブユニット部分の遺伝子しか存在しないことが示されている。この *gltA* 遺伝子が大腸菌で発現し、精製して性質を調べたところ、GOGAT として機能することから、GltA も KOD 1 株のアンモニア同化に関与する酵素であると考えられている。GS、GOGAT (GltA) 及び GDH の反応速度定数を比較したところ、アンモニア同化は主に GDH によってなされ、GS はグルタ

ミンの生合成を行うと予想されている。

第5章では超好熱菌の蛋白質が高次構造を形成する上で、熱の果たす役割を明らかにするため、KOD 1 株のGDHをモデル蛋白質として、熱処理と構造変化の関係について検討している。大腸菌で発現された組換えGDHは活性を持たない単量体（分画Ⅰ）と、活性を有する6量体（分画Ⅱ）となり、分画Ⅰは熱処理により活性を有する6量体へと変化することが示されている。また、分画Ⅱを熱処理したところ、比活性が上昇し、天然型GDHとほぼ同一の構造へと変換されることが明らかにされている。以上の結果は熱処理が蛋白質分子の適切なアセンブリー、高次構造形成を促していることを示している。

超好熱菌由来のGDHは分子間に多数のイオンペアを形成することが知られている。KOD 1 株のGDHの構造予測でも、多数の分子間イオンペア及びイオンペアネットワークの存在が予想されている。構造予測に基づきKOD 1 株のGDHにイオンペアの形成を阻み、ネットワークを破壊するアミノ酸置換（E158Q：Glu158をGlnに置換）を導入したところ、耐熱性が低下し、熱処理による構造変化も見られなくなっている。一方、人為的にイオンペアを導入する変異（T138E：Thr138をGluに置換）では耐熱性の上昇が認められている。これらの結果から熱処理によるGDHの構造成熟化は、適切な分子間イオンペアネットワークが形成されるためであると結論している。

第6章は上記の内容を要約している。

論文審査の結果の要旨

本研究では超好熱菌*Pyrococcus* sp. KOD 1 株のアンモニア同化の中心的酵素であるグルタミン合成酵素（GS）、グルタミン酸脱水素酵素（GDH）、及びグルタミン酸合成酵素（GOGAT）に注目し、各遺伝子の特徴を明らかにするとともに酵素的性質を解析し、原始代謝を予想する知見を得ている。また、組換え蛋白質の熱処理による構造成熟化について、GDHをモデル蛋白質として研究を行っている。主な成果は次の通りである。

(1) 各遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定した後、それらの情報に基づき系統解析を行ったところ、GDHは真核生物型、GSは細菌型の特徴を有し、GOGATは小サブユニットの保存領域のみで機能する特殊な構造であることが明らかになった。

(2) 各酵素の反応速度定数を比較したところ、グルタミン酸の合成によるアンモニアの同化経路が予想された。特に、GDHの細胞内含量は総蛋白質の1割以上に及ぶことから、GDHがアンモニア同化を行う上で中心的な役割を果たしていることと結論した。

(3) 超好熱菌由来の遺伝子が大腸菌で発現させることで得られた組換え蛋白質は天然型蛋白質とは異なる性質、構造を有することを示した。また、組換え蛋白質が熱処理により分子の適切なアセンブリー、高次構造形成（構造の成熟化）を起こすことを明らかにした。

(4) 変異GDHを用いた解析から構造の成熟化、及び蛋白質の安定化は、適切な分子間イオンペアネットワークの形成によってなされることを示した。

以上のように、本論文において超好熱始原菌のアンモニア同化系酵素の進化的、生化学的特徴が明らかにされた。また、超好熱菌の蛋白質が適切な高次構造を形成する際に高温環境が重要な役割を果たしていることを示すとともに、分子間イオンペアの関与を明確にした点は学術上、評価される。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10年5月25日、論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。