

氏名	李 艶 秋 (^リ ^{ヤン} ^{チュウ})
学位の種類	博士 (情報工学)
学位記番号	情工博甲第182号
学位授与の日付	平成18年6月30日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	古細菌 <i>Sulfolobus tokodaii</i> のビオチン化反応の特性
論文審査委員	主査 教授 近藤 寛 樹 " 米 谷 快男児 " 堀 江 知 義 助教授 安 永 卓 生

学位論文内容の要旨

ビオチン依存酵素は生体内でピルビン酸やアセチル-CoA などのカルボキシル化を行う酵素で、糖新生や脂肪酸合成において中心的役割を果たしている。これらの酵素はそれぞれのビオチン担持部 (BCCP) に補酵素のビオチンを結合して初めて活性型になる。この反応を司るのがビオチンプロテインリガーゼ (BPL) である。BPL による BCCP のビオチン化反応は従ってビオチン依存酵素をもつ生物にとっては普遍性の高い重要な反応といえることができる。従来真正細菌や真核生物のビオチン化反応については詳細に調べられていて、ある生物の BPL が他の生物の BCCP をビオチン化できることが知られている。これは BPL と BCCP の機能に不可欠の部分の構造が保存されているためと考えられてきた。しかしながら、古細菌の一部の属 *Sulfolobaceae* においてはこの部分に変異が認められる。このような重要な変異があっても、他の生物で見られたようなビオチン化反応の互換性が成立するかどうかは興味ある命題である。そこで、本研究では *Sulfolobus tokodaii* のビオチン化反応の特性を検討した。本論文はその研究成果をまとめたもので、以下に論文の構成を示す。

第1章は序論であり、研究の背景と意義を述べた。

第2章では、*S. tokodaii* の BPL (27 kDa) と BCCP (17 kDa) を大量に発現するプラスミドの構築について述べた。作製した発現プラスミドを大腸菌に形質転換したところ、目的のたんぱく質の大量発現が認められた。同様にして、大腸菌 BPL (35 kDa) と BCCP (22 kDa) を大量に発現するプラスミドの構築も行った。次に、*S. tokodaii* BCCP の 136 番目のセリンをメチオニンに変えた変異体 (S136M) と BPL の 43 番目のアラニングリシンに変えた変異体 (A43G) の作製も行った。また大腸菌 BCCP の 123 番目のメチオニンをセリンに変えた変異体 (M123S) も作製した。いずれの変異体も野生型と同程度に発現した。

第3章では、前章で作製したプラスミドを大腸菌に形質転換し、目的のタンパク質の発現と精製を行った。目的のタンパク質は細胞内で概ね可溶性の形で発現したので、常法に従い菌破碎後硫酸アンモニウム分画、陰イオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーなどを組み合わせてほぼ均一に精製した。得られたたんぱく質の質量分析、アミノ末端の配列分析によって目的物であることを確かめた。

第4章では、前章で調製した各種の酵素たんぱく質を使ってビオチン化反応が起こるか否か検討した。その結果、同じ生物 (*S. tokodaii* もしくは大腸菌) 由来の BPL と BCCP の組み合わせでは当然ビオチン化反応が起こったが、異種生物の BPL と BCCP の組み合わせでは全くビオチン化反応が認められなかった。これがビオチン化されるリシンの直ぐ C 端側のアミノ酸残基の違い (セリンかメチオニン) によるものかどうか知るために、S136M 変異体と M123S 変異体のビオチン化反応も検討した。その結果、前者は大腸菌の BPL によって、後者は *S. tokodaii* の BPL によってビオチン化されるようになったが、基質としての活性は野生型に比べて極めて低かった。しかしながら、この結果は確かに注目している残基がビオチン化反応が起こるか否かを決定する一つの因子であることを示す。また、*S. tokodaii* のビオチン化系ではビオチン化された BCCP と BPL の結合が強くて、

室温ではほとんど反応が回転しないことを見出した。

第5章ではビオチン化反応の動力学的測定の結果を記した。同じ生物の酵素と基質の組み合わせた場合の活性 (k_{cat}/K_m) を 100% としたとき、*S. tokodaii* の BPL による *S. tokodaii* の S136M 変異型 BCCP の活性は 5%、大腸菌の M123S 変異型 BCCP の活性は 0.1% であった。また大腸菌の BPL による *S. tokodaii* の S136M 変異型 BCCP の活性は 0.1%、大腸菌の M123S 変異型 BCCP の活性は 3.2% であった。これらの結果は、BCCP の基質としての性質を決定する因子として、ビオチン化されるリシンの直ぐ C 端側のアミノ酸残基よりも基質たんぱく質の全体の構造がより重要であることを物語るものと解釈される。また、*S. tokodaii* BPL の A43G 変異体の酵素活性は野生型の半分程度であったが、ビオチンと ATP に対する K_m が顕著に低下しており、この残基が基質の結合に関与していることを窺わせた。

第6章では上で得られた知見に基づいて、本研究の意義を考察した。従来、幅広い種に亘って互換性が高いとされてきたビオチン化系に、例外的とはいえ一部の古細菌に互換性の乏しい例が存在することが分かった。得られた知見はたんぱく質や生物の多様性を表すとともに、それらの起源や進化を解明する手がかりを与えるものと評価される。

学位論文審査の結果の要旨

本論文は、ビオチン依存酵素の活性化と作用に重要な働きをするビオチン化反応の特性を研究した成果をまとめたものである。ビオチン依存酵素はほとんど全ての生物に存在することから推測されるように、ビオチン化反応は普遍性が高く、真核生物か原核生物かを問わず、ある生物の酵素が他の生物の基質をビオチン化できること、つまり反応の互換性が高いとされてきた。これを可能にしているのは、基質と酵素の機能に不可欠の部分の構造が保存されていることによると考えられてきた。しかし、著者は一部の古細菌に基質と酵素の機能に重要な役割を果たすと考えられる部位に変異が入っている例を見つけ、これがビオチン化反応の基質特異性にどのような影響があるかを検討した。その結果、同じ生物由来の酵素と基質の組み合わせではビオチン化が起こるものの、*S. tokodaii* と大腸菌の酵素と基質の組み合わせでは全く反応が起こらないことを見出した。その原因が本当に注目する部位の変異によるものかどうかを部位特異的変異法によって調べた。その結果、一アミノ酸の置換によって *S. tokodaii* BCCP が大腸菌 BPL によって、また大腸菌 BCCP が *S. tokodaii* BPL によってビオチン化されるようになることを見出した。しかしながら、変異型の反応性は野生型に比べて極めて小さいものであった。特に、同じ生物の変異型の方が異種生物の変異型よりも反応性が高いという事実は、基質活性を決定する上で基質たんぱく質の全体的な構造がより重要であることを示すものといえる。今後 *S. tokodaii* BPL と BCCP の立体構造が解明されれば大腸菌のたんぱく質とどのような構造の違いがあるのか、また何が基質特異性を決定する最大の要因となっているのか判明するものと期待される。

また、*S. tokodaii* のビオチン化系では生成物のビオチン化された BCCP と BPL が、室温では容易に解離しない強固な複合体を形成することを見出した。このような現象が見られたのはビオチン化系では初めてのことである。この複合体の立体構造が解明されれば、BCCP と BPL の相互作用の様子を原子レベルで知ることができるものと期待され、生物化学的な意義は極めて大きいといえる。また、この強固で特異的な相互作用は各種の分析にも応用が可能と考えられ、この発見は分析化学の観点からも価値が高いと判断される。

以上の通り、本論文では古細菌のビオチン化系の特性を解明することによって、ビオチンという補酵素や酵素たんぱく質の機能をより深く理解するための材料を提供した。得られた知見は生体機能を解明する上で有用であるのみならず、ゲノム創薬の観点からも有益である。もって、生命情報工学の発展に貢献するところ大である。

以上によって、本論文は博士（情報工学）の学位に十分値するものと認められる。