

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

大腸菌で生産される超好熱菌由来の 不活性型グルタミン酸脱水素酵素の活性化機構

郷田 秀一郎¹, 櫻庭 春彦², 大島 敏久³

海洋性超好熱菌の *Pyrococcus furiosus* のグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) は、遺伝子組換え大腸菌では、活性型 (六量体) と不活性型 (単量体) の混合物として生産され、加熱処理により、不活性型が活性型に変換されることが見出された。我々は、内陸性の超好熱アーキア *Pyrobaculum islandicum* のグルタミン酸脱水素酵素を遺伝子組換え大腸菌で発現させると、全く活性が認められない六量体構造の不活性型で生産されるが、それを 90°C で加熱するか、或いは 5M 尿素 (37°C) を添加すると活性化され天然型 (六量体) と同じ活性を示すことを見出した。この活性化の機構を酵素の結晶構造、小角散乱、蛍光、熱量などの分析を行い、構造と機能の面から解明を進めた。その結果、不活性型酵素の活性化は表面の疎水領域が内部に折りたたまれ、コンパクトな四次構造のアレンジメントをとることにより起こることが明らかになった。これは、酵素のサブユニット形成の過程を構造と機能の面から観た最初の例である。

1. 緒 言

活性のある酵素は、単量体だけでなく、同一または異種の複数個のポリペプチド鎖からなる多量体構造 (サブユ

ニット構造、四次構造) を形成するものが多く存在している。酵素の多量体構造の形成は、それらの安定性の増強、触媒能の増減、アロステリック調節機能の発現、膜結合性や膜透過性機能など、生命現象の最も基本となる重要な機能の発現と調節に直接係っている。同一の反応を触媒する酵素であっても、生体内全体の反応を構成する一部としての個別の生理的機能が異なるためにサブユニット構造が異なることは、しばしば観察されることである。また、同じ酵素であっても、それらを有する生物種によって生理的機能を反映して、異なる多量体を形成することが認められることもある。このように、酵素の多量体形成は生理的機能と関連して重要であるが、意外にも酵素がリボソームで生産された後、どのような分子機構で多量体化し活性型酵素を形成するかに関しては、ほとんど明らかになっていない。もちろん一次構造情報が多量体化を決定していることは間違いないが、多量体形成を決定する具体的な酵素分子の情報はほとんど不明である。我々は、水の沸点付近の高温で増殖する超好熱菌のグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) (EC 1.4.1.2) を、常温菌である遺伝子組換え大腸菌で発現させると、殆ど活性がない不活性型酵素として生産さ

¹長崎大学工学部応用化学科 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

²香川大学農学部応用生物科学科 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393)

³九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門微生物遺伝子工学分野 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)
Activation mechanism of the inactive hyperthermophilic glutamate dehydrogenases produced in *Escherichia coli*

¹ Shuichiro Goda (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521 Japan)

² Haruhiko Sakuraba (Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2392 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan)

³ Toshihisa Ohshima (Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

れ、それが本来の生育温度である 90℃ の温度、または高濃度の尿素 (37℃ の条件で 5M 濃度) 処理で活性型酵素に変換されることを見出した¹⁾。この超好熱菌酵素の活性化機構を構造と機能の面から追跡することは、これまで不明であった多量体構造の形成機構の詳細を解明するうえで、新たな情報を提供することが期待できる。本稿ではその結果を中心に、他の超好熱菌由来の GDH の関連情報について説明する。

2. 大腸菌体内で生産される超好熱菌由来の組換え不活性型 GDH

GDH は補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (リン酸) (NAD(P)) 依存的に L-グルタミン酸の 2-オキソグルタル酸とアンモニアへの可逆的な酸化的脱アミノ反応を触媒する。補酵素の特異性により NAD 及び NADP 特異的酵素と、特異性のない酵素の 3 種類が知られ、エネルギー代謝と窒素 (アミノ酸) 代謝をつなぐ鍵酵素として重要な生理的役割を担っている。そのために多くの生物種で普遍的に存在し、種々の生物由来の本酵素の構造と機能に関して多くの知見が得られている²⁾。その中で、興味深い発見として、DiRuggiero と Robb が 1995 年、海洋性超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来 NADP 依存性 GDH (Pfu-GDH) を大腸菌で発現させた後、細胞抽出液を調製し、酵素を精製するために加熱処理 (90℃) を行ったところ、総活性が顕著に増大することを見出した³⁾。また、大腸菌の細胞抽出液を加熱処理せずにゲルろ過クロマトグラフィーを行い、各分画液の SDS-PAGE を行ったところ、六量体 (270 kDa) と単量体 (48kDa) に相当する二つの溶出画分に Pfu-GDH のサブユニットの分子質量 (48kDa) に相当するタンパク質バンドが検出された。そして六量体構造の分子種に相当する画分のみ活性が検出でき、この分画を熱処理しても活性の増加はなかった。一方、サブユニットの分子質量に相当する溶出分画には活性が検出されなかったが、その分画を加熱処理すると明確な活性が検出され、その総活性は前出の六量体構造の総活性とほぼ同じであることが見出された。また、この単量体の溶出画分の活性を持たない酵素液を加熱後に再びゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、六量体に相当する位置にのみ活性が検出され、単量体の溶出位置からは加熱しても活性が見つからなかった。さらに、予め加熱処理した酵素を用いて同様にゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、六量体に相当する溶出位置にのみ活性が検出された。なお、培養した超好熱菌体から精製した天然型の Pfu-GDH はゲルろ過クロマトグラフィーより、分子質量約 270kDa の同一のサブユニットからなる六量体構造の酵素のみであった。これらの結果から、彼らは Pfu-GDH が大腸菌体内では不活性な単量体と活性を有する六量体の混合物 (ほぼ 1 : 1 の量比) として生産され、*in*

表 1 種々の好熱菌/超好熱菌由来の大腸菌組換え GDH の活性、及び四次構造と活性化に伴う変化

超好熱菌	四次構造	特徴
<i>Pc. furiosus</i>	不活性型 (単量体) + 活性型 (六量体)	加熱による活性化が多量体化を伴う
<i>T. kodakaraensis</i>	不活性型 (単量体) + 不活性型 (六量体)	加熱による部分的活性化が多量体化を伴う
<i>Pc. horikoshii</i>	不活性型 (単量体) + 不活性型 (六量体)	加熱による活性化が多量体化及び構造変化を伴う
<i>Pb. islandicum</i>	不活性型 (六量体)	不活性単量体の生産は見られず、加熱による活性化が構造変化を伴う

vitro での加熱によって多量体化が起こり、天然型酵素と同様な活性型に変換される特異的な現象であることを明らかにした。これはタンパク質の多量体化がその活性発現に大きな機能を持つことを示した興味深い最初の事例である (表 1)。

ついで、別の海洋性超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来の GDH (Tko-GDH) についても、遺伝子組換え酵素の活性と四次構造の関係に関する研究が報告された^{4,5)}。Tko-GDH は大腸菌を宿主に用いた遺伝子組換え酵素として不活性な単量体および非常に活性の低い六量体の混合物として生産される。組換え低活性型六量体 Tko-GDH は、加熱処理によって活性の上昇が見られるものの、天然型酵素と比較するとその比活性はかなり低い。さらに、低活性型六量体酵素は天然型や加熱処理により活性化した組換え酵素とは大きく異なる円偏光二色性 (CD) スペクトルを示すことから、加熱処理による活性化は大きな構造変化を伴うと考えられた⁴⁾。また、Pfu-GDH と異なる点として、不活性な単量体 Tko-GDH は加熱処理を行っても、その大部分は単量体のままで存在し活性を示さず、ごく一部のみが六量体を形成し活性を示す。このことから不活性単量体 Tko-GDH の活性型六量体への正しい構造変換には、何か付加的な要因の存在が示唆された。Izumikawa らは Tko-GDH の加熱による構造変化を示差走査型熱量計 (DSC) と CD スペクトルを用いて解析し、加熱による活性化は不可逆であり、非加熱酵素が加熱によって安定な活性型に変換されたと報告している⁵⁾。また Wang らは、同様な超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 GDH (Pho-GDH) においても、組換え酵素は不活性な単量体と活性の低い六量体の混合物として生産され、加熱により酵素活性の上昇とともに構造変化が起こることを蛍光や CD スペクトル解析により示した⁶⁾。

3. *Pyrobaculum islandicum* 由来の組換え GDH

著者らの研究室では、超好熱菌由来の種々の高度耐熱性酵素の機能と構造解明を進めるなかで、海洋性超好熱菌 (*Pc. furiosus*, *Pc. woesei*, *T. litoralis*) の NADP 依存性 GDH に加え、内陸性の超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* に NAD 依存性 GDH (Pis-GDH) を見出した⁷⁾。 *Pb. islandicum* は 100℃ 付近に最適生育温度を持つ内陸性の超好熱アーキアであり、嫌気的環境で生育する。我々は、Pis-GDH が上記 *Pc. furiosus* の NADP 依存性 GDH の場合とは異なり、大腸菌では殆ど活性がない不活性型組換え酵素として生産されるが、生育温度の 90℃ で加熱すると活性型へ容易に変換されることを見出した。加えて、Yips らは Pfu-GDH の高度耐熱性の分子機構を解明するために、その X 線結晶解析から得られた立体構造と、常温菌由来の同酵素のそれと比較して、高度耐熱性 (100℃ でも熱変性しない) は、サブユニット間におけるイオン対ネットワークの大幅な増強が主原因であることを明らかにした⁸⁾。我々は内陸性超好熱菌由来の Pis-GDH の X 線結晶解析に成功し、本酵素が Pfu-GDH とは異なり、サブユニット間の疎水性相互作用の増強が本酵素の高度耐熱性の主な原因であるということを見出した⁹⁾。このように、Pis-GDH は Pfu-GDH と同様に高度耐熱性酵素であるが、立体構造情報から耐熱化の分子戦略は大きく異なっているため、大腸菌で生産される不活性型 Pis-GDH の活性化も、Pfu-GDH とは異なることが予想された。そこで著者らは、X 線小角散乱 (SAXS)、疎水性蛍光プローブであるアニリノナフタレン-8-スルホン酸 (ANS) による蛍光スペクトル、DSC などの分析法によって Pis-GDH の活性化現象を構造面からより詳細に解析した。

3-1 遺伝子組換え Pis-GDH の活性化と四次構造変化

Pb. islandicum の培養はそれほど簡単ではないため、培養菌体からの Pis-GDH の精製の収率は低く、本菌由来の天然型酵素の基礎や応用研究を進めるうえでの障害になっている。そこで著者らは、大腸菌を宿主に用いた遺伝子組換え酵素生産系を確立した。その際、タンパク質生産用大腸菌として BL21 (DE3)-codon plus-RIL を、発現ベクターには pET11a を用いた⁹⁾。生産された組換え型 Pis-GDH の活性測定を大腸菌での生産後そのままの状態で行うと、ほとんど活性を検出することができなかった。しかし、90℃ で 15 分間加熱することによって、*Pb. islandicum* から直接精製した天然型 Pis-GDH と同等の比活性が検出された。ゲルろ過クロマトグラフィーによって分子質量を求めたところ、不活性型及び熱活性化型酵素の両者ともに 280kDa であった。SDS-PAGE から見積られた単量体の分子質量は 47kDa であるため、どちらの分子種も六量体構造を形成し

ていると考えられる。酵素化学的諸性質のパラメータを酸化的脱アミノ反応の速度論的解析から求めると、熱活性化型 Pis-GDH の補酵素 NAD、及び基質グルタミン酸に対する K_m 値は、天然型、組換え型酵素ともにほぼ同じ値を示した。このことから熱処理によって、不活性型組換え Pis-GDH は天然型 Pis-GDH と同じ構造へ変換されたと考えることができる。

3-2 常温環境下での活性化：尿素処理による活性化

天然型の Pis-GDH は尿素溶液中で活性が増大し、6M 尿素溶液中で最大の活性を示すことが報告されている⁷⁾。そこで、不活性な組換え Pis-GDH の活性化におよぼす尿素の影響について検討した。37℃ において尿素の添加濃度、及び処理時間を検討した結果、5M 尿素溶液中で 5 時間処理したときに最も高い比活性が観察され、それは天然型及び熱活性化型 Pis-GDH の比活性と近い値であった。尿素添加による不活性型酵素の活性化の後、透析によって尿素を除いても活性の低下は認められなかったことから、常温での尿素による活性化は不可逆反応であると考えられる。

3-3 蛍光スペクトルによる酵素表面の疎水性領域の変動解析

ANS はタンパク質の疎水性アミノ酸残基と特異的に相互作用して蛍光を出すプローブとして用いられる試薬である。我々は、Pis-GDH の表面の疎水性領域の変化をこのプローブを利用して追跡した。すなわち、酵素へ ANS を添加し、その蛍光の発光スペクトルからタンパク質表面の疎水性残基の溶媒への露出度を測定した。不活性型 Pis-GDH を ANS とともにインキュベートし、350nm の波長で励起すると、446nm 付近にピークを持つ大きな蛍光スペクトルが得られた。対照的に、天然型酵素、熱活性化型あるいは尿素活性化型 Pis-GDH では、同様に励起しても蛍光スペクトルにピークは認められなかった。この結果により、不活性型 Pis-GDH ではその分子表面に疎水性残基が露出しており、それら疎水性残基を含む領域が熱や尿素処理によって分子内部に取り込まれるような構造変化が起きたと考えられる。

3-4 不活性型 Pis-GDH の活性化における熱量変化解析

不活性型 Pis-GDH の熱活性化及び熱変性時における熱力学的パラメータを DSC によって求めた。不活性型酵素の過熱熱容量曲線には温度上昇に伴う二つのピークが 70.2℃ と 110.3℃ に認められた。予め 90℃ 15 分間の熱活性化処理をした酵素では、二つのピークのうち 70.2℃ のピークは認められず、110.3℃ のみにピークが検出された。それ故、70.2℃ のピークが熱活性化、110.3℃ のそれが熱変性に伴うものであると考えられる。また、熱変性温

度以上に加熱した酵素を冷却後、再び加熱を行っても過剰熱容量曲線には、それら二つのピークが共に観察されなかったことから、熱活性化、熱変性ともに不可逆反応であると考えられる。それぞれの温度におけるエンタルピー変化は 15.5kJ/mol (70.2°C)、及び 1880kJ/mol (110.3°C) と算出され、熱活性化のエンタルピー変化は小さく、熱変性のその約120分の1であった。疎水性プローブANSによる解析の結果は、活性化に伴って不活性型酵素の表面に露出している疎水性残基が内部に折りたたまれることを示しており、また、結晶構造解析は活性型 Pis-GDH の高い耐熱性が分子間の疎水性相互作用を主原因としていることを示している。これらのことより、活性化はエントロピー（疎水性相互作用形成）駆動型であるといえる。タバコモザイクウイルスのコートタンパク質の温度ジャンプによる SAXS 測定における知見においても、ほとんど同様なことが認められている^{10,11)}。

3-5 不活性型 Pis-GDH の溶液状態での活性化による構造変化の解析

SAXS は、X 線を非結晶質の物質に照射すると生じる散乱の中でも散乱角が 10° 以下の回折・散乱を利用して物質の構造やその変化等に関する情報を得る方法である¹²⁾。SAXS は、溶液状態で測定が可能のため、タンパク質の結晶化操作が不要であり、動的構造変化の情報が得られる。また、溶液状態で構造解析が行える核磁気共鳴法と比較して、SAXS はより高分子量のタンパク質試料でも測定が容易に行える。SAXS によって分子の大きさや形状、分子量に関する経時的情報を得ることができるが、X 線結晶解析法や核磁気共鳴法のように原子レベルでの精緻な構造情報を求めることは困難である。著者らは Pis-GDH の活性化における構造変化を溶液状態で観察するため、不活性型、熱活性型、及び尿素活性型 Pis-GDH の SAXS 測定を高エネルギー加速器研究機構 BL-10C (つくば市) にて行った。SAXS からは、酵素分子の回転半径 (ギニエ半径ともいう: R_g) と最大長 (D_{max})、散乱角 0 での散乱強度 ($J(0)$) を酵素濃度 (C) で割った値 ($J(0)/C$) からの平均分子量、クラツキープロットからの酵素の四次構造形成に関する情報等が得られる。酵素分子の平均回転半径 ($R_{g,z}$) は、SAXS 測定で得られた散乱曲線からギニエプロットを作成し、そのプロットの直線部分の傾きが $R_{g,z}^2$ に比例することから算出できる (図 1a)。その結果、不活性型、熱活性型、及び尿素活性型 Pis-GDH の $R_{g,z}$ 値は、それぞれ 54.6 、 46.5 、 46.9\AA と算出できた (表 2)。熱活性型と尿素活性型の Pis-GDH のギニエ、及びクラツキープロットのパターンは、全てほぼ同じであった (データ省略)。不活性型酵素の $R_{g,z}$ 値 (54.6\AA) は熱や尿素処理による活性化によって約 8\AA 小さくなり、活性化によって全体の構造がよ

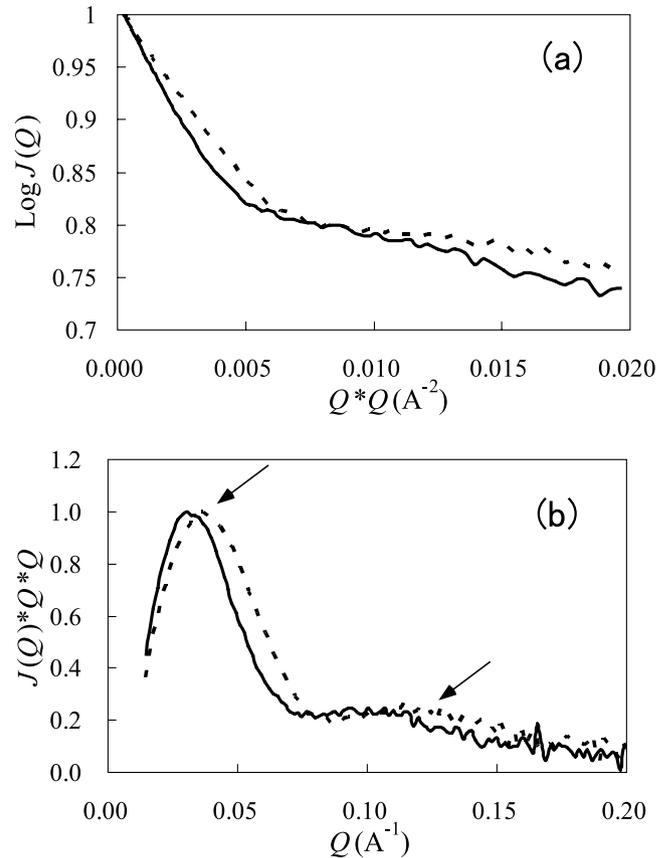


図 1 X 線小角散乱法による不活性型 Pis-GDH の溶液構造に対する加熱処理の影響

(a) ギニエプロット：直線の傾きが分子の平均回転半径 ($R_{g,z}$) の 2 乗に比例する、(b) クラツキープロット：四次構造を形成しているタンパク質に特徴的な二つのピークが観察されている。実線：不活性型 Pis-GDH、点線：活性型 Pis-GDH。

表 2 X 線小角散乱 (SAXS) によって求められた不活性型、熱活性型、尿素活性型 Pis-GDH の構造学的パラメータ

組換え酵素 Pis-GDH の状態	$R_{g,z}$ (\AA)	$M_{w,w}$ (k)	D_{max} (\AA)
不活性型	54.6 ± 0.1	280 ± 26	145 ± 3
熱活性型	46.5 ± 0.1	299 ± 14	124 ± 3
尿素活性型	46.9 ± 0.1	337 ± 34	120 ± 3

りコンパクトになることが明らかになった。同様に酵素分子の最大長 (D_{max}) も 145\AA から 124\AA (熱活性型)、 120\AA (尿素活性型) へと顕著に小さくなった。熱活性型、尿素活性型、及び天然型の酵素において、酵素化学的パラメータ、及び構造学的パラメータに大きな違いが見られないことから、それらは類似の構造をとると考えられる。一方、 $J(0)/C$ から求めた分子質量は不活性型を含めた 3 分子種の間で大差はなく、それらは全て六量体構造 (約 270 kDa) をとっていることがわかった。また、クラツキープロットから酵素の四次構造のアレンジメントの変化を見ると (図 1b)、不活性型、熱活性型、及び尿素活性型酵素の

全ての場合に、異なる二つのピークを持つ曲線が認められ、全て四次構造、つまり六量体を形成していると考えられた。しかし、そのピークの位置は活性型では不活性型に対してより高角側にシフトしており、四次構造のアレンジメントが異なることが示された。以上のことから、活性化に伴い四次構造には変化がないものの、そのアレンジメントが変化し、酵素分子全体のコンパクト化が起これると考えられる。

我々は熱活性型酵素の立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにしているが、不活性型の立体構造は良好な結晶が得られないことから未だに不明である⁹⁾。そこで、SAXS データを用いて *ab initio* 法¹³⁾による低分解能の構造モデリング解析を行った。構造モデリングは、ランダムな酵素の構造を初期構造として設定し、複数回の計算を行って酵素構造モデルを構築した。プログラムには構造の点群対称を指定して計算を行うことができるプログラム DAMMIN を用いた¹³⁾。熱活性型酵素は結晶構造解析から P32 の点群対称を持つことが分かっているので、その対称性を考慮して計算で得たモデル構造を SAXS のデータより構築したところ、結晶解析から得られている立体構造と非常に良く一致した (図 2a, 2b)。一方、不活性型の立体構造は

点群対称性を持つかどうか不明であることから、P32 点群対称性と点群対称性なし (P1) の 2 条件を設定して計算を行ったところ、両方で立体構造のモデルが全く異なった。これは、不活性型酵素の最も取りうる立体構造が、対称性のない P1 構造であることを示している (図 2c)。ここで得られた不活性型 GDH の低分解能構造モデルは、熱活性型酵素の構造と比べて二つの異なる点が認められた。一つは酵素分子の点群対称性の消滅である。熱活性型酵素は P32 の点群対称性を持ち、分子を形成する二つの三量体が向き合って六量体構造を形成している (図 2a, b)。一方、不活性型酵素は熱活性型酵素で観察される 3 回対称軸がねじれた構造をとり、対称性が失われている (図 2c)。二つ目の構造上の相違は、不活性型酵素がシリンダー状の構造をとるのではなく、分子の表面で特に広がった構造をとっている点である。不活性型酵素では表面の電子密度が、活性型酵素の場合よりも低くなっている。これは、不活性型酵素が部分的に変性状態に近い状態であることを推定させる (図 2c)。また、酵素活性の発現には、多量体構造の形成だけが必要であるのではなく、多量体化に伴う適切な四次構造の形成が重要であることを意味している。

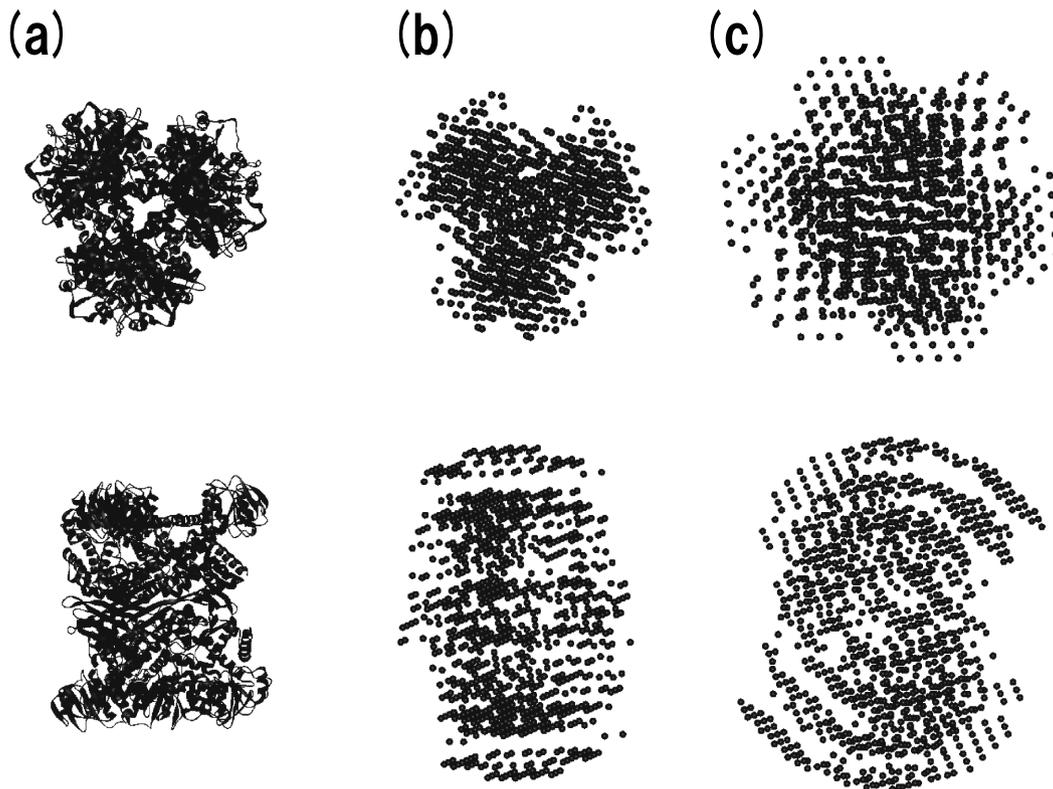


図 2 結晶構造と X 線小角散乱 (SAXS) による低分解能構造の比較

(a) 熱活性型 Pis-GDH の結晶構造 (リボン図), (b) 熱活性型 Pis-GDH の SAXS からのモデル構造 (球), (c) 不活性型 Pis-GDH の SAXS からのモデル構造 (P1 対称性なし, 球). 上段は六量体構造を 3 回対称軸を中心とした方向から見た図. 下段は 2 回対称軸を左右にした方向から見た図.

4. 四次構造の正確なアレンジメント形成が 酵素活性発現に重要である

組換え Pfu-GDH では、上述のように不活性な単量体と活性な六量体の二つの分子種の混合状態で生産され、加熱により前者は後者へ変換され、天然由来のものと同等の活性を有する。また、組換え Tko-GDH と Pho-GDH では、不活性な単量体と不活性な六量体の2分子種で生産され、加熱により両分子が活性化される(表1)。このような海洋性超好熱菌の GDH の場合とは異なり、内陸性の Pis-GDH では不活性な六量体構造の GDH の状態で得られ、加熱や尿素添加が駆動力となり、コンパクトな六量体構造の活性型へ変化することを、我々はここで初めて示した。

これらの現象は、超好熱菌由来の酵素を常温菌である大腸菌体内で生産した場合で見られるものである。なぜなら、本来の菌体は 100℃ 近くで生育しているため、培養温度が活性型へ変換される 70.2℃ より高く、不活性型として産生されることはない。一方、大腸菌の培養温度の 37℃ は 70.2℃ よりかなり低く、活性型への変換速度が極めて小さいため不活性型となる。そのため、超好熱菌由来 GDH を遺伝子組換え酵素として常温で生産することは、同じアミノ酸配列を持つタンパク質が異なる立体構造を形成することが観察できる特殊なケースと言える。しかし、この特殊なケースが、これまで不分明であった酵素の多量体構造の形成機構についての一般的な情報を与えるものとして、極めて有用であると考えられる。

結晶構造の比較により、細胞内のイオン濃度が高い海洋性菌からの Pfu-GDH はイオン対ネットワークの増強により高度耐熱性を有するのに対し、イオン濃度が低いと予想される内陸性菌からの Pis-GDH では主にサブユニット間の疎水性結合の増強に起因して高度耐熱性を示すと予想されている。これらのことは、リボソームで生産された単量体酵素が、熱やシャペロンなどにより活性型の多量体酵素へ成熟する過程で高次構造のアレンジメントが起こる機構は、それぞれの酵素の持つ機能や熱に対する安定性の獲得の様式、細胞内環境などの違いを反映して多様であるということを示している。特に、組換え Pis-GDH の熱や尿素による活性化に伴う構造変化の解析は、酵素活性の発現には正しい四次構造のアレンジメントが必要であることを示す最初の例として大きな意味を持っている。

これまで、著者らの研究を除き、超好熱菌の不活性な組換え酵素の熱による活性化の現象を構造学的な面から解析した例は見あたらない。特に我々が SAXS の解析結果から見出した、熱や尿素による不活性型から活性型酵素への変化の過程で、分子質量は変化せず、分子サイズが劇的に小さくなる現象や、この変化が6個のサブユニットの再アレンジメントによって起こりうることは、今後、多量体酵

素の形成機構と活性発現機構の関係を解明する上で大きなインパクトを持つと考えられる。

5. 総 括

大腸菌で生産された超好熱菌由来の不活性型 Pis-GDH を用いた著者らの研究は、加熱による活性化の発見と構造解析により多量体酵素の機能発現の過程を初めて構造から見ることができた点、及び機能の発現には多量体化のみならず適切な四次構造のアレンジメントが必要であることを示した点で、酵素の多量体化と活性発現に関する全く新規な知見を提供でき、大きな成果であると言える。しかし、超好熱菌由来の GDH が大腸菌内で不活性型として生産される理由が、培養温度が低いだけでなく、超好熱菌 GDH に特異的な分子シャペロンが大腸菌ではないことによるのか、など興味深い問題も残されている。

これまでに酵素活性の発現に四次構造形成を必要とする他の酵素例として、異なるサブユニットが活性部位を形成するアラニンラセマーゼの場合などがある¹⁴⁾。しかし、本稿で紹介した Pis-GDH では、その結晶構造解析から活性残基の存在する部位と他のサブユニットと接触している四次構造形成部位が互いに離れていることが示されている⁹⁾。さらに、不活性型 Pis-GDH は六量体が形成されているものの、不正確なアレンジメントのために活性が発現しない。このことは四次構造の形成に寄与する部位が正しい立体構造を形成していなければ、離れた位置にある活性部位にも影響を与えているということを示唆している。著者らの構造学的解析から、断片的にはあるが、四次構造形成の酵素活性に与える影響の解明が進んだが、多量体化が持つ生物学的な意義とは何かについては全くわかっていない。四次構造形成の多様性と酵素機能・安定性との関係、生理的意義や分子進化との関係など、今後さらに精緻な実験によって解明すべき課題は数多く残されている。得られる知見を生かして病気の治療や産業的応用につなげていくことが大いに期待される。

文 献

- 1) Goda, S., Kojima, M., Nishikawa, Y., Kujo, C., Kawakami, R., Kuramitsu, S., Sakuraba, H., Hiragi, Y., & Ohshima, T. (2005) *Biochemistry*, 44, 15304–15313.
- 2) Ohshima, T. & Soda, K. (2000) *Stereoselective Biocatalysis* (R.N. Patel ed.), pp. 877–902, Marcel Dekker Inc., New York.
- 3) DiRuggiero, J. & Robb, F.T. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 159–164.
- 4) Abd Rahman, R.N., Fujiwara, S., Takagi, M., Kanaya, S., & Imanaka, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241, 646–652.
- 5) Izumikawa, N., Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S., Imanaka, T., & Takagi, M. (2004) *J. Biosci. Bioen.*, 97, 305–309.

- 6) Wang, S., Feng, Y., Zhang, Z., Zheng, B., Li, N., Cao, S., Matsui, I., & Kosugi, Y. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **411**, 56–62.
 - 7) Kujo, C. & Ohshima, T. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2152–2157.
 - 8) Yip, K.S., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova, S.E., Engel, P.C., Pasquo, A., Chiaraluce, R., & Consalvi, V. (1995) *Structure*, **3**, 1147–1158.
 - 9) Bhuiya, M.W., Sakuraba, H., Ohshima, T., Imagawa, T., Katunuma, N., & Tsuge, H. (2005) *J. Mol. Biol.*, **345**, 325–337.
 - 10) Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwara, K., Ueki, T., Kataoka, M., Tagawa, H., Izumi, Y., Muroga, Y., & Amemiya, Y. (1988) *J. Mol. Biol.*, **204**, 129–140.
 - 11) Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwara, K., Ueki, T., & Nakatani, H. (1990) *J. Mol. Biol.*, **213**, 495–502.
 - 12) Guinier, A. & Fournet, G. (1955) *Small-angle Scattering of X-rays*, Chapman & Hall, New York.
 - 13) Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 2879–2886.
 - 14) 大西浩平 (2007) *生物物理*, **271**, 194–198.
-