

超好熱始原菌由来新型 Rubisco の構造解析

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻、CREST-JST

跡見晴幸、前田倫広、福居俊昭、今中忠行

1) 地球上には実に多種多様な生物が生息しているが、それらは共通に糖・脂質・核酸・タンパク質等の有機炭素化合物を主構成成分としている。これら有機炭素化合物のほとんどは地球から（非生物的に）供給されるのではなく、生物自身が無機炭素（主に CO_2 ）を還元することによってそれらを合成している。代表的な例は植物、藻類や光合成細菌であり、これらは光のエネルギーを用いて二酸化炭素の還元・同化（炭酸固定）を行っている。独立栄養生物が合成した有機物が地表に存在する全ての従属栄養生物の栄養源となり、異化代謝されることによって再び酸化される（Fig. 1）。

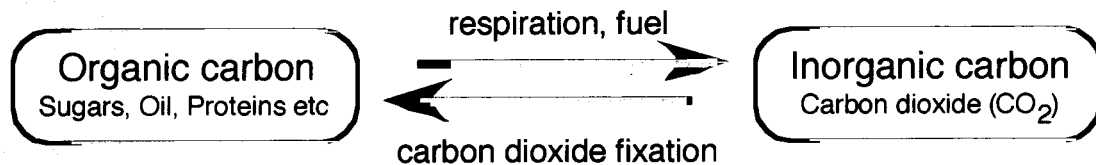


Fig. 1. The carbon cycle on the Earth

2) 光独立栄養生物の炭酸固定のメカニズムは盛んに研究され、そのほとんどは ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (Rubisco) を鍵酵素とする Calvin 回路によって炭酸固定を行っている。Rubisco は ribulose 1,5-bisphosphate と CO_2 から 2 分子の phosphoglycerate (3-PGA) を生成する反応 (carboxylase) を触媒し、光合成暗反応の最も重要な酵素であると考えられている。 CO_2 の代わりに O_2 も基質となり、この際には 1 分子の 3-PGA および 1 分子の 2-phosphoglycolate (2-PG) が生成する (oxygenase)。既存の Rubisco はその立体構造から、大きく二つの type に分類されている。Type I は、主に植物中に見られ、分子量約 55kDa の 8 つの large subunit、および分子量約 15kDa の 8 つの small subunit からなる L8S8 型のヘテロ 16 量体構造を有しているのに対し、Type II は、一部の細菌中に見られ、分子量約 50kDa の large subunit のみからなる Ln 型の構造を持つことが特徴である。それぞれの type 内では、生物種が異なってもアミノ酸配列の相同性が約 70%以上と高いのに対し、Type I-Type II 間では、約 50%以下と低いことが明らかになっている。

我々は超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株のゲノムから、Rubisco の large subunit をコードする遺伝子を同定、解析した。そのアミノ酸配列を spinach を始めとする Type I、光合成細菌の Type II のものとそれぞれ比較を行ったところ、KOD1 株の Rubisco (*Tk*-Rubisco) は既存の Type I、II のどちらにも属さない新規の type を構成し得る可能性が示唆された。組換え型 *Tk*-Rubisco は高度な熱安定性を示し、かつ spinach の Rubisco の 10 倍以上の高い活性を有していた (Fig. 2)。また、従来の Rubisco よりも carboxylase 特異的であることも判明した (1, 2)。

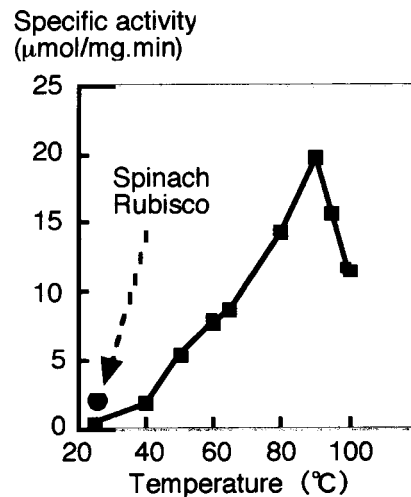


Fig. 2. Temperature profile of *Tk*-Rubisco

3) *Tk*-Rubisco が従来の Rubisco と比較して高い活性、高い carboxylase 特異性を有したことから、我々はその構造に注目した。まず、組換え型酵素に対する抗体を作製し、これを用いて免疫沈降実験を行った。KOD1 株の cell-free extract からは *Tk*-Rubisco に対応するタンパク質のみが検出されたことから、KOD1 株内に存在する *Tk*-Rubisco は Large subunit のみから構成されていることが示唆された。Native-PAGE/Western blot 解析などの結果も Small subunit の存在を否定した (3)。ゲルろ過クロマトグラフィーより *Tk*-Rubisco の分子量を推定したところ、8-10 量体であることがわかった。*Tk*-Rubisco が非常に

大きな酵素であることから、透過電子顕微鏡による観察を試みた。意外なことに、*Tk*-Rubisco は従来酵素と全く異なる五角形構造を有していることが判明した (Fig. 3)。分子量を考慮すると本酵素は L2 dimer を基本単位とした(L2)₅ 構造をとっていることが示唆された。

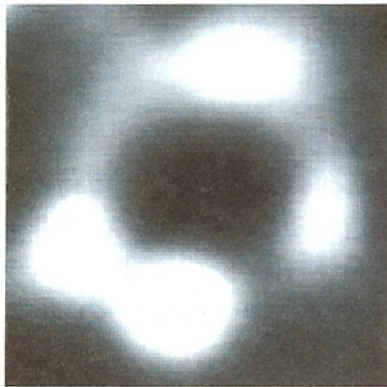


Fig. 3. Pentagonal structure of *Tk*-Rubisco

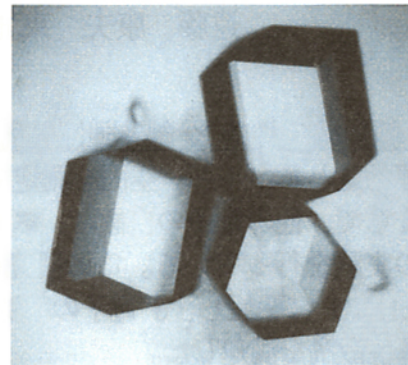


Fig. 4 Crystals of *Tk*-Rubisco

4) *Tk*-Rubisco が新規な構造を有することから我々は本酵素の結晶化および X 線構造解析を行った。硫酸を沈殿剤に用いた場合に良質の結晶が得られ (Fig. 4)、2.8Å の分解能で *Tk*-Rubisco の構造を決定することができた (Fig. 5)。本酵素は L2 dimer を構成単位にもつ直径約 150Å の平面的な pentagonal decamer 構造をとっていることが明らかとなった (4)。L2 dimer 内には 2 つの活性中心が存在し、それらの周辺の立体構造は Type I、Type II Rubisco のものとよく似ていた。これに対して、*Tk*-Rubisco の L2 dimer 間の相互作用領域は既存の酵素のものとは全く異なっており、Glu-63, Arg-66, Asp-69 を中心としたイオン結合ネットワークが観察された。Subunit 間のイオン結合性相互作用のメカニズムを生化学的に解明するために、これら 3 つのアミノ酸を一つずつ Ser に置換した変異体 (E63S、R66S、D69S)、3 つを同時に置換した変異体 (E63S-R66S-D69S) を作製し、精製を行った。その結果 30°C において、D69S は野生型と同じ 10 量体、E63S、R66S は 10 量体と 2 量体の混合物、E63S-R66S-D69S は 2 量体となることが明らかとなった。80°C では、E63S、R66S は解離し、2 量体構造をとっていたが、D69S は 10 量体構造を維持していた。各々のタンパク質の変性温度を解析した結果、野生型および D69S の熱変性温度は 110-115°C であるのに対して、E63S-R66S-D69S、E63S、R66S は 90-95°C の間で熱変性した。つまり、*Tk*-Rubisco の 2 量体構造自身の変性温度は 95°C 付近であり、10 量体構造をとることにより変性温度が 110°C まで上昇することが示唆された。*T. kodakaraensis* KOD1 株の生育温度が 65-100°C であることを考慮すると、KOD1 株内で安定に機能を維持するためには *Tk*-Rubisco は 10 量体構造をとる必要があることが明らかとなった。

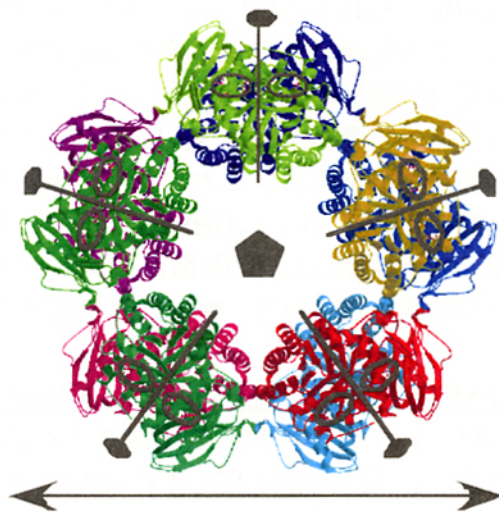


Fig. 5. Structure of *Tk*-Rubisco

- 1) Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H. & Imanaka, T. *J. Biol. Chem.*, **1999** 274, 5078-5082.
- 2) Atomi, H., Ezaki, S. & Imanaka, T. *Methods Enzymol.*, **2001** 331, 353-365.
- 3) Maeda, N., Kitano, K., Fukui, T., Ezaki, S., Atomi, H., Miki, K. & Imanaka, T. *J. Mol. Biol.*, **1999** 293, 57-66.
- 4) Kitano, K., Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. *Structure*, **2001** 9, 473-481.