

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院生研究
2014年度研究成果報告書

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----|----------------|---------|----|
| 研究科名 | 立教大学大学院 | 理学 | 研究科 | 生命理学 | 専攻 |
| 研究代表者 (2015年3月現在のものを記入) | 在籍研究科・専攻・学年 | | 氏名 | | |
| | 理学研究科生命理学専攻 博士後期課程3年 | | 濱島 裕輝 印 | | |
| 指導教員 | 所属・職名 | | 氏名 | | |
| | 理学部・准教授 | | 山田 康之 印 | | |
| 自然・人文・社会の別 | ○自然・人文・社会 | | 個人・共同の別 | ○個人・共同名 | |
| 研究課題 | 深海生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の高圧適応機構の解明 | | | | |
| 研究組織 (2015年3月現在のものを記入) | 在籍研究科・専攻・学年 | | 氏名 | | |
| | 理学研究科生命理学専攻 博士後期課程3年 | | 濱島 裕輝 | | |
| 研究期間 | 2014年度 | | | | |
| 研究経費 | (支出金額) 499,850円 / (採択金額) 500,000円 | | | | |

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

深海生物の酵素は、その生物の生育環境に適応し、圧力に強く、高圧下で活性が高いことが明らかとなっている。このような、高圧力条件は酵素タンパク質の立体構造に影響を及ぼし、その活性を大きく変化させることが知られている。本研究では、こうした知見に基づき、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を材料に、高圧環境に適応した深海好圧性微生物、高温環境に適応した好熱性微生物、常温・大気圧環境に適応した通常微生物、そして深海生物であるシロウリガイの共生細菌の酵素を材料として、これらの酵素の活性と高圧下での構造変化との相関関係を総合的に比較し、圧力付加に対しどのような構造の変化が酵素活性の安定化をもたらすのか調べた。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[深海生物] [IPMDH] [圧力]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

本酵素の性質をより詳細に明らかにするため、常圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素に S266P、L138N 変異を導入したものを作製した。これらを精製し、耐圧性の測定を行った S266P 変異酵素は耐圧性が野生型よりもわずかに高く、逆に L138N 変異酵素では、若干の耐圧性の低下がみられた。

ストップフロー法にて酵素の律速段階を測定するため、常圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を材料に、測定方法の検討を行った。結果、酵素濃度を 20 μM と高濃度にするだけで、今まで誰も測定することができなかったイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素のバーストを測定することが可能になった。蛍光・吸光を組み合わせてストップフロー法で測定した結果、酵素反応がランダム反応機構で進行することが明らかとなった。本酵素の常圧における律速段階は、酵素に基質と補酵素が結合した後の酵素反応時もしくは酵素からの生産物の解離であることが明らかとなった。

好熱菌 *Thermus thermophilus* のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の熱安定性が野生型と比較して、約 3.4°C 上昇した L134N 変異体では、耐圧性が低下することが明らかとなっている。高圧結晶構造解析に向けた結晶を作製し、名古屋大学にて X 線結晶構造解析を行った結果、L134N 変異酵素の立体構造が明らかとなった。同様の方法で作成した結晶を材料に名古屋大学にて、高圧結晶構造解析に使用可能であるか加圧実験を行った。その結果、550 MPa までは測定が可能だが、それ以上の高圧になると、溶媒に含まれる塩の結晶が析出し、測定が困難になることが明らかとなった。

クローニングすることが不可能とされてきたシロウリガイのオルガネラとして機能する共生イオウ細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を、枯草菌のゲノムにクローニングし、これを培養して、共生イオウ細菌の酵素を精製する予定であったが、クローニングした配列に変異が入っており、枯草菌を使用した方法での酵素の発現は困難であることが明らかとなった。

研究成果の概要 つづき

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文

Yuki Hamajima, Takayuki Nagae, Nobuhisa Watanabe, Eiji Ohmae, Takeo Imai, Yasuyuki Kato-Yamada, Chiaki Kato. Pressure adaptation of 3-Isopropylmalate dehydrogenase from the extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution. (投稿準備中)

④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

学会発表

1. Yuki Hamajima, Takayuki Nagae, Ryu Makino, Nobuhisa Watanabe, Takeo Imai, Yasuyuki Kato-Yamada and Chiaki Kato (Sep., 2014) Cause of the pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from obligatory piezophile is attributed to just one amino acid substitution. 10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia.
2. 濱島裕輝, 永江峰幸, 渡邊信久, 牧野龍, 今井竹夫, 山田康之, 加藤千明 (2014年10月1日) 深海由来好冷好圧細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と律速反応について。特殊環境微生物セミナー2014、名古屋大学、名古屋市。
3. 濱島裕輝、永江峰幸、渡邊信久、牧野龍、今井竹夫、山田康之、加藤千明 (2014年11月2日) 極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性。第15回極限環境生物学会年会、今帰仁村コミュニティーセンター、沖縄県。
4. 濱島 裕輝、永江 峰幸、渡邊 信久、牧野 龍、今井 竹夫、山田 康之、加藤 千明 (2015年3月26日) 極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と熱安定性。日本農芸化学会 2015年度大会、岡山大学津島キャンパス、岡山県。