

枯草菌 RuBisCO-like protein と光合成 RuBisCO に
保存されたアミノ酸残基の機能解析

中野 寿宏

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座

(横田 明穂 教授)

2010 年 (平成 22 年) 3 月

所属 (主指導教員)	分化・形態形成学講座 (横田 明穂)		
氏名	中野 寿宏	提出	平成 21年 12月 21日
題目	枯草菌 RuBisCO-like protein と光合成 RuBisCO に 保存されたアミノ酸残基の機能解析		
<p>CO₂を固定する ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) は、植物やシアノバクテリア、光合成細菌に広く存在する。これらに加えて、枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i> を含む一部の非光合成細菌は RuBisCO ラージサブユニットのアミノ酸配列と相同性を示す RuBisCO-like protein (RLP) を有する。メチオニン代謝で働く <i>B. subtilis</i> RLP (BsRLP) は、2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate (DK-MTP-1-P) enolase であるが、このエノール化反応は光合成 RuBisCO の CO₂ 固定反応の初発段階である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) のエノール化と類似している。実際、BsRLP は RuBisCO の RuBP エノール化残基である Lys175、Lys201、Asp203、Glu204 を用いて DK-MTP-1-P enolase 反応を触媒することがアミノ酸置換研究から明らかにされている。これらのことから、BsRLP と RuBisCO は、類似の触媒機構を用いた enolase として同じ起源タンパク質から進化してきたと考えられる。そこで、本研究では RLP と RuBisCO をあわせた RuBisCO superfamily に共通する基本構造や触媒発揮機構を明らかにすることを目的とし、BsRLP と光合成細菌 <i>Rhodospirillum rubrum</i> RuBisCO (RrRuBisCO) の構造活性相関の比較解析を行った。</p> <p>(1) Lys134 の機能 RLP と RuBisCO はその一次配列の相同性が約 30%と低いものの、両者の構造は驚くほどよく似ている。このことから、共通に保存された 30%のアミノ酸残基には RuBisCO superfamily としての基本構造確立のための重要な情報が隠されていると予想される。BsRLP やホモダイマー型酵素で高度に保存された Lys134 は、一次配列上だけでなく構造上の位置も保存されていることから重要な機能を担うことが予想された。そこで、RrRuBisCO と BsRLP の K134R、K134M、K134E 変異酵素について酵素学的解析を行った。N 末端、C 末端ドメインの境界に存在する Lys134 への変異導入は構造安定性に影響を与えると考えられたため、最初に native PAGE や熱失活試験により構造安定性を評価した。全ての変異 RuBisCO は機能単位であるダイマーを形成でき、熱失活試験においても野生型と同様の挙動を示した。また、酵素学的パラメータから、RrRuBisCO K134R の k_{cat} は野生型の 61%まで低下し、CO₂ と RuBP に対する K_m はそれぞれ 2、1.9 倍に上昇した。また、RrRuBisCO K134M、K134E は carboxylase 活性が野生型の 0.2、0.8%に低下した。よって、RrRuBisCO の Lys134 変異は基本構造を変化させることなく活性の低下のみをもたらした。一方で、BsRLP K134R は野生型同様ダイマーを形成したが、k_{cat}(野生型の 67%) や</p>			

熱安定性が野生型より低下した。ダイマーを形成できなかった BsRLP K134M、K134E の enolase 活性は検出限界以下であった。よって、BsRLP の Lys134 は主に構造の維持に寄与していることが判明した。

また、立体構造比較から、RrRuBisCO と BsRLP の N 末端ドメインに存在する Lys134 は、C 末端ドメインの Loop 5 の主鎖カルボニル酸素と水素結合し、両ドメイン間を架橋していると考えられた。しかし、Lys134 は両者の触媒発揮機構のために必須であるものの、その機能は異なることが明らかとなった。

(2) His294 の機能 RuBisCO superfamily における enolase 反応の触媒発揮機構を理解するためには、よく知られている RuBisCO の触媒機構に加えて、RLP の触媒機構に興味を持たれる。特に、RuBisCO の carboxylase 反応触媒必須残基である His294 は、carboxylase 反応を触媒できない BsRLP を含む全ての RuBisCO superfamily で保存されていることから、触媒発揮機構を考える上で非常に重要であると予想された。そこで、BsRLP H294Q、H294N、H294A 変異酵素を作製し、その酵素学的解析を行った。RuBisCO の触媒能発揮には CO₂ による Lys201 のカルバメート化 (活性化) が必須であるが、BsRLP の Lys201 も活性化を必要とする。驚くべきことに、全ての His294 変異 BsRLP は、最大活性の発揮に野生型よりも高い CO₂ 濃度を必要とした。また変異 BsRLP は、 k_{cat} が野生型の 2-8% に低下し、 K_m が 2.2-3.0 倍に増加していた。これらの結果と RLP の構造から、His294 側鎖の 3 位窒素はカルバメート Lys201 のカルボキシル酸素と相互作用することでカルバメートを安定化していることが予想された。また、His294 は基質の C3 ケト酸素と水素結合を形成することで基質親和性にも関与していると考えられた。

Lys201 のカルバメート化は、BsRLP だけでなく全ての RuBisCO superfamily が触媒反応を行う前段階として必須の機構である。興味深いことに、立体構造比較から His294 イミダゾール環の 3 位窒素と Lys201 のカルバメート酸素の距離は BsRLP、植物 RuBisCO、RrRuBisCO の順に長くなる (それぞれ 2.84、3.43、4.00 Å)。この距離と各酵素における Lys201 のカルバメート化率には相関が見られ、His294 とカルバメート Lys201 の距離が短いほどカルバメートを安定に保持できる可能性が考えられた。たとえば、大気条件下において、BsRLP はほぼすべての Lys201 がカルバメート化されるのに対し、植物 RuBisCO は約 50% しかカルバメート化されないという違いを生み出す。今回の BsRLP の機能解析を通して、His294 が Lys201 のカルバメート化を安定化する重要な機能を果たす残基であることが明らかになった。

以上のことから、Lys134 や His294 のように RLP と RuBisCO で共通に保存されたアミノ酸残基は、その基本構造の維持や触媒発揮機構において決定的な役割を担うことが証明された。RuBisCO superfamily で保存されたアミノ酸残基の更なる機能解明は、進化の過程でどのように現存する RuBisCO や RLP が形作られたのかを知る手がかりになると期待される。

目次

本論文で用いた略号	6
第1章 緒論	7
第2章 RuBisCO superfamily における Lys134 の機能解析	19
2-1. 序論	
2-2. 材料と方法	
2-3. 結果	
2-4. 考察	
第3章 RuBisCO superfamily における His294 の機能解析	37
3-1. 序論	
3-2. 材料と方法	
3-3. 結果	
3-4. 考察	
第4章 総括	54
謝辞	56
参考文献	57
論文目録	64

本論文で用いた略号

BsRLP; *Bacillus subtilis* RuBisCO-like protein
CABP; 2-carboxyarabinitol-1,5-bisphosphate
CKABP; 2-carboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisphosphate
CTD; C-terminal domain
DK-H-1-P; 2,3-diketohexane-1-phosphate
DK-MTP-1-P; 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate
L; RuBisCO (もしくは RLP) large subunit
NTD; N-terminal domain
PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis
PGA; 3-phosphoglycerate
RLP; RuBisCO-like protein
RrRuBisCO; *Rhodospirillum rubrum* RuBisCO
RuBisCO; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RuBP; ribulose-1,5-bisphosphate
S; RuBisCO small subunit
SDS; sodium dodecyl sulfate

第1章

緒論

生物の生体内活動は非常に多くの生化学反応の集合の結果達成されており、そのほとんどは酵素というすばらしい生体触媒により行われる (Voet et al. 2000)。酵素を解析する学問である酵素学は生化学とともに歩み、DNA 操作技術や X 線結晶解析、NMR などの優れた手法を取り入れつつ今日に至っている。これらの強力なツールは、過去数十年の間に、酵素の構造活性相関に関する新たな知見を与え続けた。その結果、限られたドメイン構造の組み合わせによって多様な反応を触媒する無数の酵素が構築されていることが示唆され、これらは進化的な共通性を示す family に分類できることが明らかとなった。おそらく、最も多くの酵素が利用する構造は、triose-phosphate isomerase に代表される $(\beta/\alpha)_8$ -barrel (もしくは TIM barrel) であろう。実際、 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel タンパク質は構造の知られているすべてのタンパク質のうち約 10%にも のぼる (Sternier and Hocker 2005)。また、 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel は酵素に多様な機能を与え、6 つに分類される酵素反応型のうち 5 つ (oxidoreductase, transferase, hydrolase, lyase, isomerase) を触媒する酵素で利用されている。 $(\beta/\alpha)_8$ -barrel タンパク質はその活性中心を変化させることで実に 18 にもまたがる大きな superfamily を形成し、エネルギー代謝や糖質、アミノ酸、ヌクレオチドの代謝など広く生体内活動に貢献している (Nagano et al. 2002)。

$(\beta/\alpha)_8$ -barrel タンパク質は様々な代謝を担っているが、地球の炭素サイクルの中核を担う酵素は、同じく $(\beta/\alpha)_8$ -barrel を有する ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) に他ならない。CO₂ 固定経路である Calvin-Benson-Bassham 経路で働く RuBisCO は植物葉の可溶性タンパク質の 50%にも及ぶほど多量に存在し、地球上で最も多く存在する酵素であるとされている (Ellis 1979)。よって、RuBisCO は、地球生態系において生物の生命活動に不可欠な物質生産を行う極めて重要な役割を担っている。RuBisCO はそのホモログである RuBisCO-like protein (RLP) とともに同じタンパク質を起源に進化してきたと考えられ、両者を合わせて RuBisCO superfamily を構成する (Fig. 1-1, Tabita et al. 2007)。RuBisCO superfamily は、高等植物や藻類、シアノバクテリアなどに見られるラージサブユニット (L) が 8 個、スモールサブユニットが 8 個から構成される form I RuBisCO、*Rhodospirillum rubrum* などの光合成細菌がもつ L のみから構成される form II RuBisCO、古細菌に見られる L のみから構成される form III RuBisCO、そして carboxylase/oxygenase 反応を触媒できない 4 グループ ($\alpha 1, \alpha 2, \beta, \gamma$) の RLP に分類される

(Fig. 1-1, Hanson and Tabita 2001; Ashida et al. 2008)。Form I、II、III RuBisCO はすべて、ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) に CO₂ を固定し 2 分子の 3-phosphoglycerate (PGA) を生成する carboxylase 反応を行う一方で、O₂ を固定し 1 分子の PGA と 2-phosphoglycolate を与える oxygenase 反応を競合して行う (Fig. 1-2, Tabita 1999; Spreitzer and Salvucci 2002; Tabita et al. 2008)。長年、RLP の機能は未知であったが、本研究室は世界に先駆けて α 1 グループの *Bacillus subtilis* RLP (BsRLP) の機能を同定し、メチオニン再生経路で働く 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate (DK-MTP-1-P) enolase であることを突き止めた (Fig. 1-2, 1-3, Ashida et al. 2003, 2005)。この成果により、多角的な面からの RuBisCO superfamily の進化的・酵素学的な比較解析が可能となった。

RuBisCO superfamily に属する RuBisCO および RLP の立体構造には高い類似性が見られる。RuBisCO superfamily は、N-terminal domain (NTD) と (β/α)₈-barrel を含む C-terminal domain (CTD) で構成される L が 2 つ会合し、触媒の最小単位である L2 ダイマーを構成する (Fig. 1-4, 1-5)。活性中心はひとつのペプチドに由来する NTD ともうひとつのペプチドに由来する CTD の境界に形成される head-to-tail 構造をとることから、L2 ダイマーの境界には 2 つの活性中心が形成される (Fig. 1-5)。このように、RuBisCO superfamily に属する酵素は、進化的に保存された共通の基本構造を利用している。さらに、RuBisCO superfamily に属する RuBisCO と RLP の活性中心には共通のアミノ酸残基が保存されている (Fig. 1-6A)。立体構造が明らかな RuBisCO および RLP は、活性化というプロセスを経て触媒能を発揮できる活性化型になると考えられている (Fig. 1-6B)。両酵素の活性化は、活性中心を不活性化型から活性化型へと変換する 2 つの因子である CO₂ と Mg²⁺ により行われる。植物 RuBisCO における活性化機構の解析から、活性化は 2 段階の可逆的な反応により行われることが知られている。最初に、RuBisCO の Lys201 の ϵ -アミノ基に基質とは異なる CO₂ が結合してカルバメート化 Lys201 を形成する。次に、カルバメート化 Lys201 および近接する Asp203、Glu204 のカルボキシル酸素に Mg²⁺ が配位し、活性化型となる。活性化状態は植物葉緑体の環境を反映しており、葉緑体ストロマの pH や Mg²⁺ 濃度により制御されている。一方で、*B. subtilis* などの細菌、古細菌生体内における、RLP や RuBisCO の活性化調節機構は未だ明らかにされていない。

RuBisCO と BsRLP の触媒する反応は異なるが、化学構造の類似する基質に対してエノール化を行う点で共通している。RuBisCO の carboxylase 反応は、RuBP のエノール化がトリガーとなり、続いてカルボキシル化、水和、炭素-炭素結合の開裂、立体特異的プロトン化という合計 5 つの部分反応からなる (Fig. 1-2, Hartman and Harpel 1994; Cleland et al. 1998)。RuBisCO の carboxylase 反応の最初のステップであるエノー

ル化は、RuBP の C3 のプロトン引き抜きによって開始するが、これはカルバメート化 Lys201 が触媒していると考えられている (Fig. 1-7, Cleland et al. 1998)。このとき、RuBP から *cis-enediol* 型 RuBP を形成するために、Lys175 が触媒する C2 の酸素原子へのプロトンの受け渡しが起こる (King et al. 1998)。生成した *cis-enediol* 型 RuBP は、カルバメート化 Lys201 および Asp203、Glu204 に配位した Mg^{2+} により安定化される (Andersson and Taylor 2003)。一方、BsRLP の触媒する DK-MTP-1-P enolase 反応は、RuBisCO の RuBP エノール化と類似しており、DK-MTP-1-P の C1 のプロトン引き抜きにより開始する (Fig. 1-2, 1-7, Ashida et al 2003, 2005)。BsRLP におけるプロトン引き抜きを触媒する残基は明らかではないが、BsRLP は、RuBisCO と同様にエノール化に必須の Lys175、Lys201、Asp203、Glu204 を完全に保存しており、立体構造解析からこれらの残基の配置が類似していることが知られている (Fig. 1-6A, Tamura et al. 2009)。そして、これら触媒残基のアミノ酸置換により、DK-MTP-1-P enolase 活性が完全に失われることから、BsRLP は RuBisCO と共通の触媒残基を用いた、類似の触媒反応機構を利用していると考えられている (Saito et al. 2009)。

RuBisCO は Calvin-Benson-Bassham 経路の初発反応である *carboxylase* 反応を触媒するが、その k_{cat} は $10 s^{-1}$ 以下と極めて低いため非効率的な生体触媒酵素として知られる。さらに、RuBisCO の同一活性中心で触媒される光呼吸経路の初発反応である *oxygenase* 反応は、*carboxylase* 反応を拮抗的に阻害してしまう。このような酵素としての性質の悪さから、RuBisCO は大気条件下における植物の光合成の律速となっている。これらを克服すべく、RuBisCO の酵素学的特性の改善による光合成の増進が望まれてきた。RuBisCO の *carboxylase* 反応と *oxygenase* 反応の反応特異性の比は、 $[V_{max} (CO_2)/K_m (CO_2)]/[V_{max} (O_2) /K_m (O_2)]$ で定義される CO_2/O_2 specificity により表される (Tcherkez et al. 2006)。 CO_2/O_2 specificity はその値が高いほど *carboxylase* 反応を特異的に行うことを示すため、優良 RuBisCO を評価する指標としても用いられる。 CO_2/O_2 specificity は、スモールサブユニットを欠く form II (10–15) から、form I のシアノバクテリア (40)、緑藻 (60)、植物 RuBisCO (80–100)、さらには最も値を示す高い紅藻 (160–240) にいたるまで多様である (Tcherkez et al. 2006)。そこで、異なる CO_2/O_2 specificity を示す複数種の RuBisCO の比較、あるいはランダム変異の導入による高い CO_2/O_2 specificity を示す RuBisCO への改良、さらに RuBisCO のより深い理解のための研究が数多く行われてきた (Spreitzer et al. 2005; Smith and Tabita 2004; Mueller-Cajar et al. 2007; Mueller-Cajar and Whitney 2008)。このような研究には、現存する RuBisCO を材料に用いることしかできなかった。しかし、RLP 研究の進展により RuBisCO superfamily という進化的視点に立ち、広く RuBisCO を理解するための研究が可能と

なった。

そこで、ともにエノラーゼとしての共通点を持ち、一次配列や触媒反応、立体構造の類似性から同じ起源タンパク質から進化してきたと考えられる RLP と RuBisCO を用いて RuBisCO superfamily に共通する基本構造や触媒発揮機構の解明を試みた。共通の祖先タンパク質から進化してきたと考えられる RLP と RuBisCO には触媒残基を含む多くのアミノ酸残基が共通に保存されている (Fig. 1-8)。RuBisCO superfamily 間において、このように高度に保存されたアミノ酸残基は両酵素の触媒に重要な役割を担うと予想された。よって、RuBisCO superfamily 間で保存されたアミノ酸残基の解析は、RuBisCO superfamily が触媒能を発揮するための機構を同定できるとともに、起源タンパク質からどのように RLP や RuBisCO へと分子進化を果たしていったのかという進化の根底をなす基本的疑問への答えを導くと期待される。本研究では、RuBisCO superfamily の基本構造と触媒発揮機構を明らかにすることを目的とし、BsRLP と光合成 RuBisCO の構造活性相関の比較解析を行った。以降の 2 章と 3 章では RLP と RuBisCO に高度に保存された Lys134 および His294 の機能を酵素学的に解析し、得られた結果から RuBisCO superfamily におけるこれらのアミノ酸残基の機能的な位置付けを考察した。

第 2 章では、RuBisCO superfamily における Lys134 の機能について明らかにした。RLP と RuBisCO はその一次配列の相同性が約 30%と低いものの、両者の構造は驚くほどよく似ている (Fig. 1-4, 1-5)。このことから、共通に保存された 30%のアミノ酸残基には RuBisCO superfamily としての基本構造や触媒発揮機構の確立のための重要な情報が隠されていると予想される (Fig. 1-8)。第 2 章では BsRLP や L2 ダイマー型酵素で高度に保存された Lys134 に着目した。Lys134 は一次配列上だけでなく構造上の位置も保存されていることから重要な機能を担うことが予想された。そこで、form II *R. rubrum* RuBisCO (RrRuBisCO) と $\alpha 1$ グループに属する BsRLP の Lys134 に点変異を導入してその機能を比較解析した。

第 3 章では、RuBisCO superfamily における His294 の機能解析を行った。RuBisCO superfamily における enolase 反応の触媒発揮機構を理解するためには、よく知られている RuBisCO の触媒機構に加えて、RLP の触媒機構の理解が重要であると考えられる。特に、RuBisCO の carboxylase 反応触媒必須残基である His294 は、carboxylase 反応を触媒できない BsRLP を含む全ての RuBisCO superfamily で保存されていることから、触媒能の機構を考える上で非常に重要であると予想された。そこで、第 3 章ではより詳細な BsRLP の触媒発揮機構の解明を目的として His294 の機能を酵素学的に解析した。

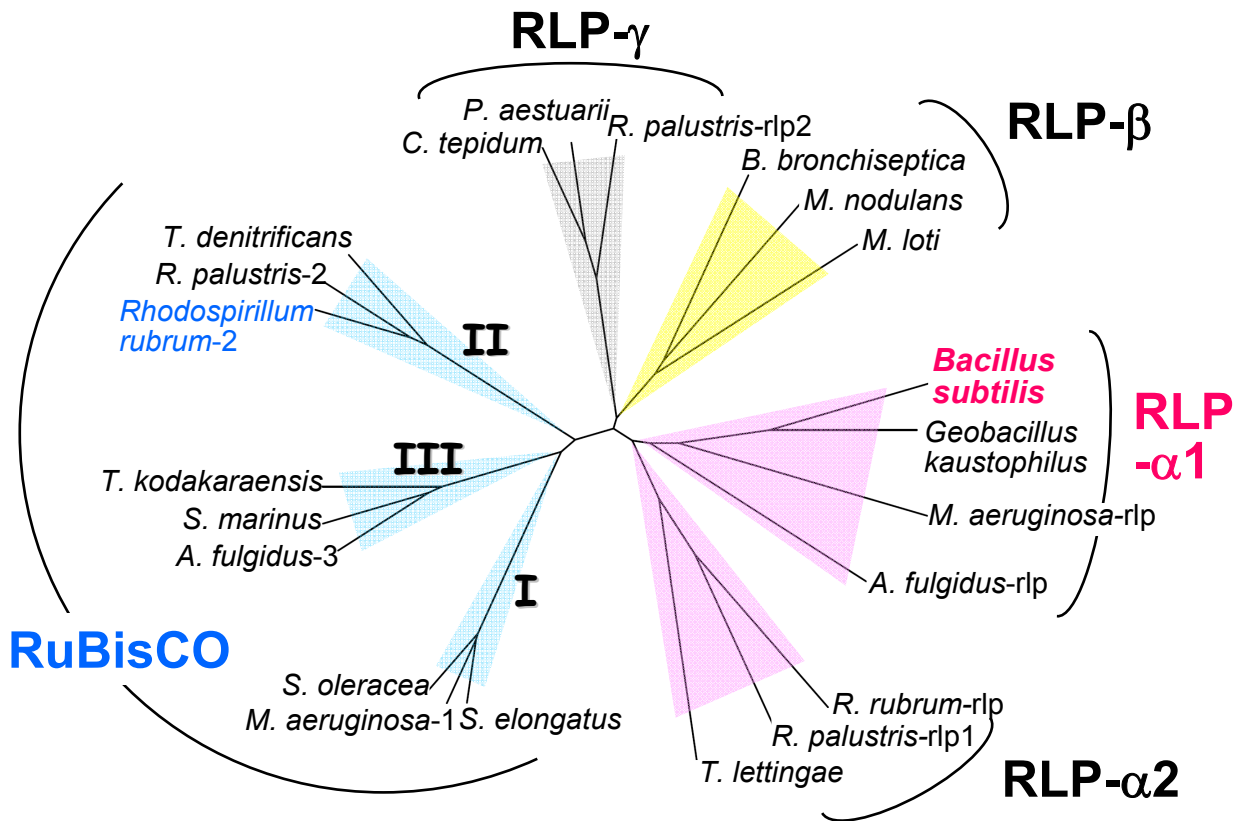
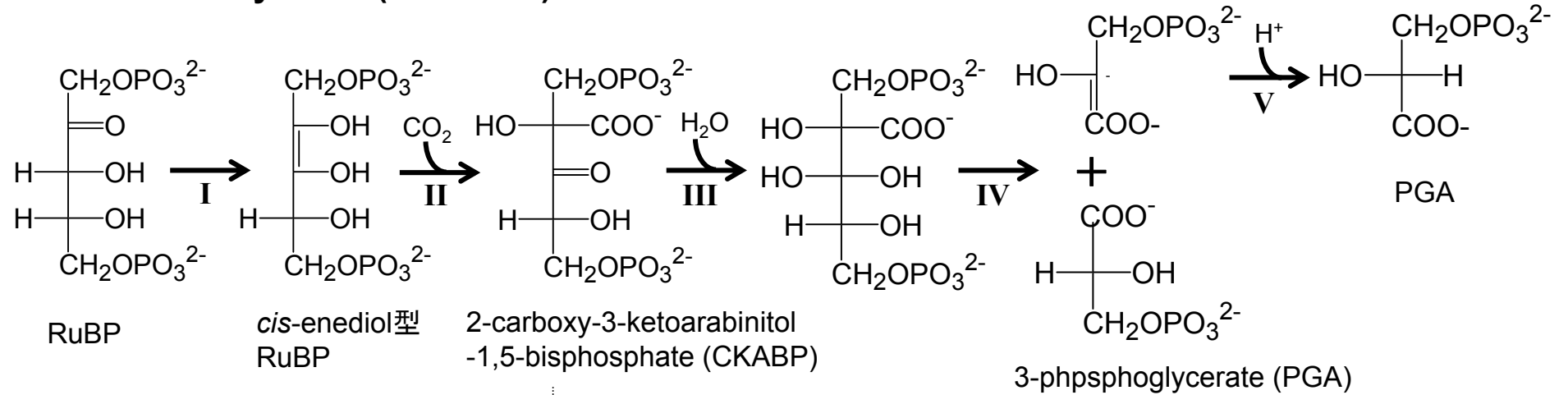


Figure 1-1 アミノ酸配列をもとに作成したRuBisCO superfamilyタンパク質の系統樹

RuBisCOは3つのform (form I, II, III)、RLPは4つのgroup ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ) に分類される。系統樹作成に用いた生物は以下の通り。*S. oleracea*, *Spinacia oleracea*; *S. elongatus*, *Synechococcus elongatus* PCC6301; *M. aeruginosa*, *Microcystis aeruginosa* PCC7806; *R. rubrum*, *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170; *R. palustris*, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009; *T. denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259; *T. kodakaraensis*, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1; *A. fulgidus*; *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304; *S. marinus*, *Staphylothermus marinus* F1; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* str. 168; *G. kaustophilus*, *Geobacillus kaustophilus* HTA426; *B. bronchiseptica*, *Bordetella bronchiseptica* RB50; *M. loti*, *Mesorhizobium loti* MAFF303099; *M. nodulans*; *Methylobacterium nodulans* ORS2060; *C. tepidum*, *Chlorobium tepidum* TLS; *P. aestuarii*; *Prosthecochloris aestuarii* DSM271

RuBP carboxylation (RuBisCO)



DK-MTP-1-P enolization (BsRLP)

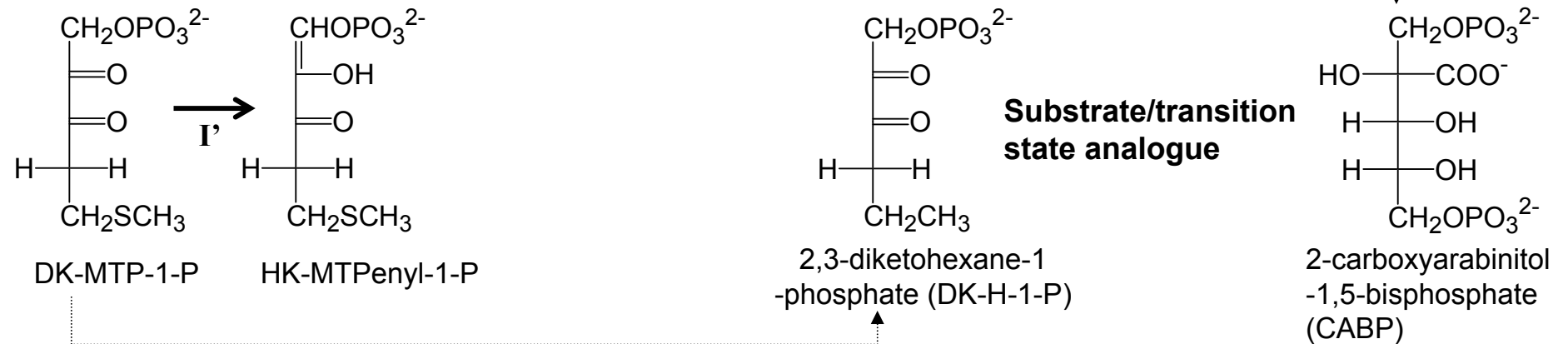


Figure 1-2. RuBisCOのRuBP carboxylase反応 (上段) とBsRLPのDK-MTP-1-P enolase反応 (下段) の比較

RuBisCOの触媒するRuBP carboxylase反応は次の5段階に分けられる。I, RuBP enolization; II, carboxylation; III, hydration; IV, C-C cleavage; V, stereospecific protonation。また、BsRLPにおけるI'はDK-MTP-1-P enolizationを示す。DK-H-1-PはDK-MTP-1-Pの基質アナログ、CABPはCKABPの反応中間体アナログである。

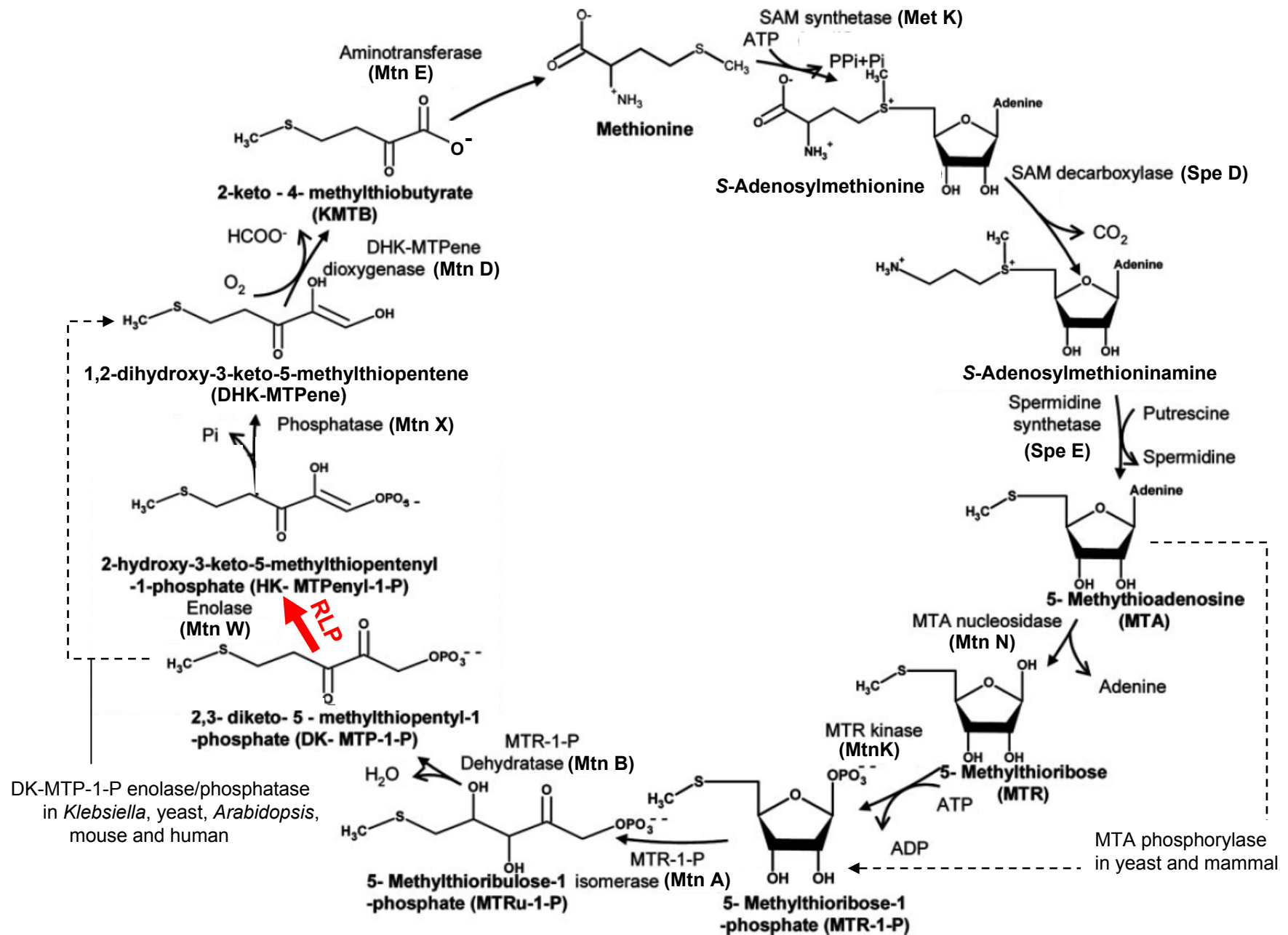


Figure 1-3. 枯草菌 *B. subtilis* のメチオニン再生経路

メチオニン再生経路において、RLPはDK-MTP-1-PからHK-MTPenyl-1-Pを生成するenolase反応を触媒する。

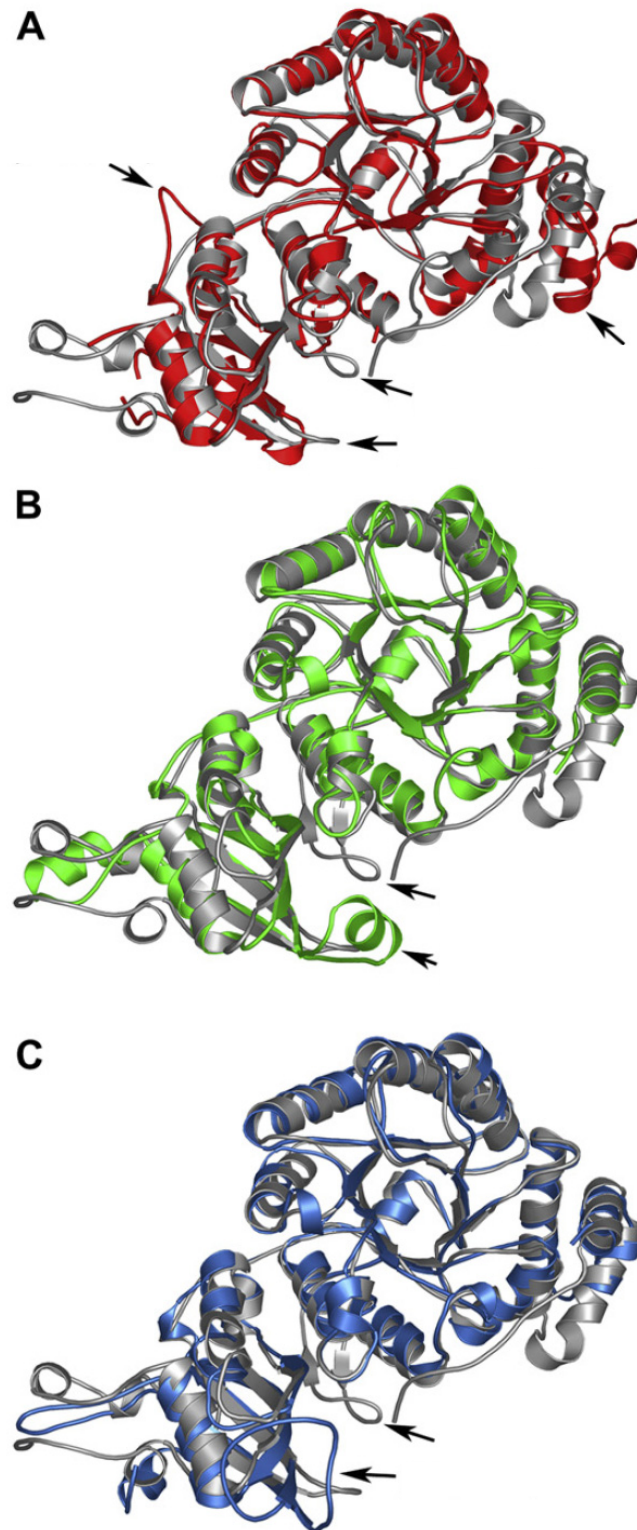


Figure 1-4. ホウレンソウRuBisCOとその他のRuBisCO/RLPのモノマー構造比較
 (Andersson and Backlund 2008より)
 ホウレンソウRuBisCOのL (PDB code 8RUC; グレー) と以下に示すRuBisCOもしくはRLPを重ね合わせた。Aは赤で示すform II *Rhodospirillum rubrum* RuBisCOのL (5RUB)、Bは緑で示す*Geobacillus kaustophilus* RLP- α 1のL (2OEM)、Cは青で示す*Rhodopseudomonas palustris* RLP- γ のL (2QYG) とホウレンソウRuBisCO Lとの重ね合わせを示す。矢印は各々のRuBisCO/RLPに特徴的なloop、helix構造を示す。

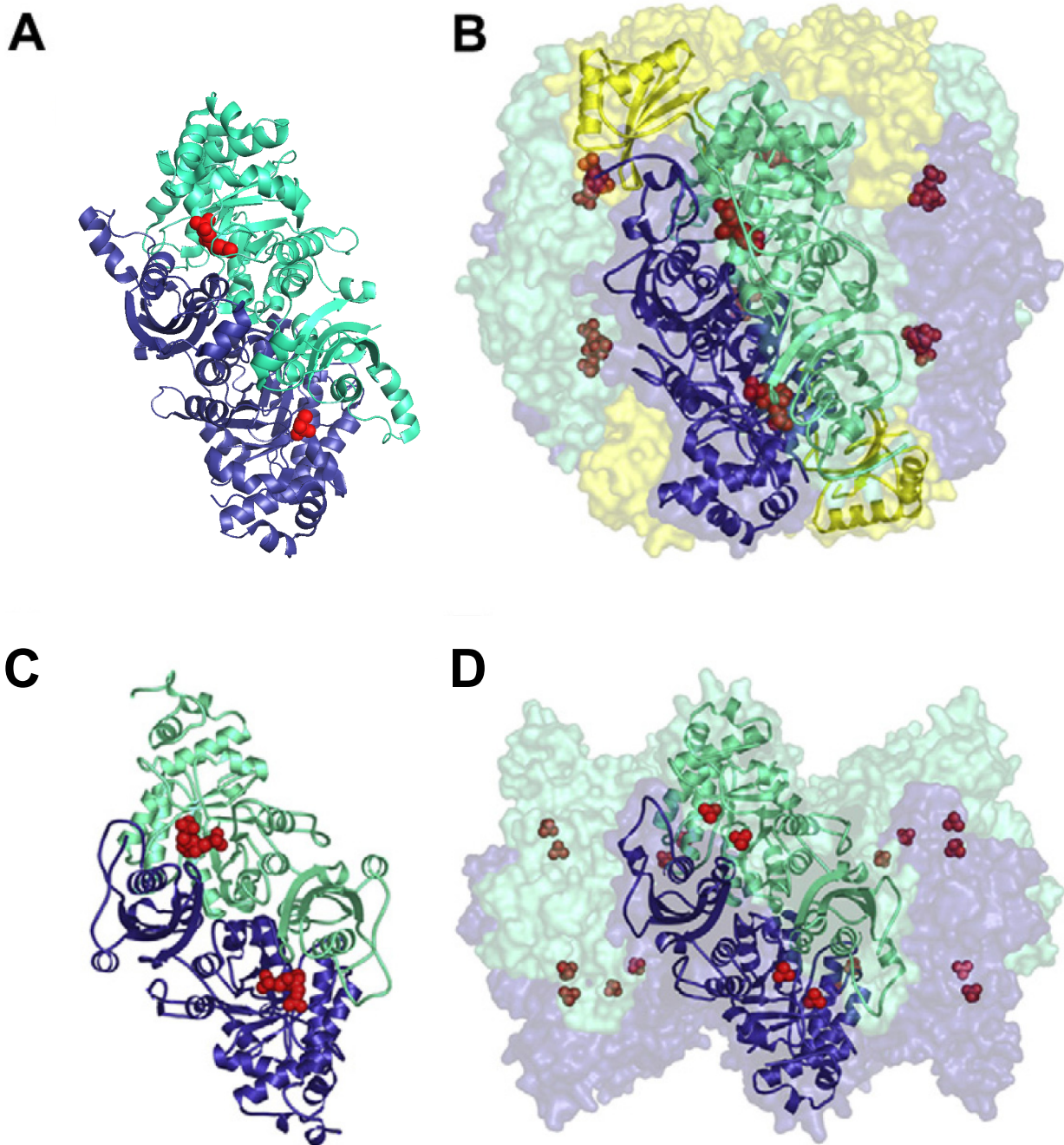
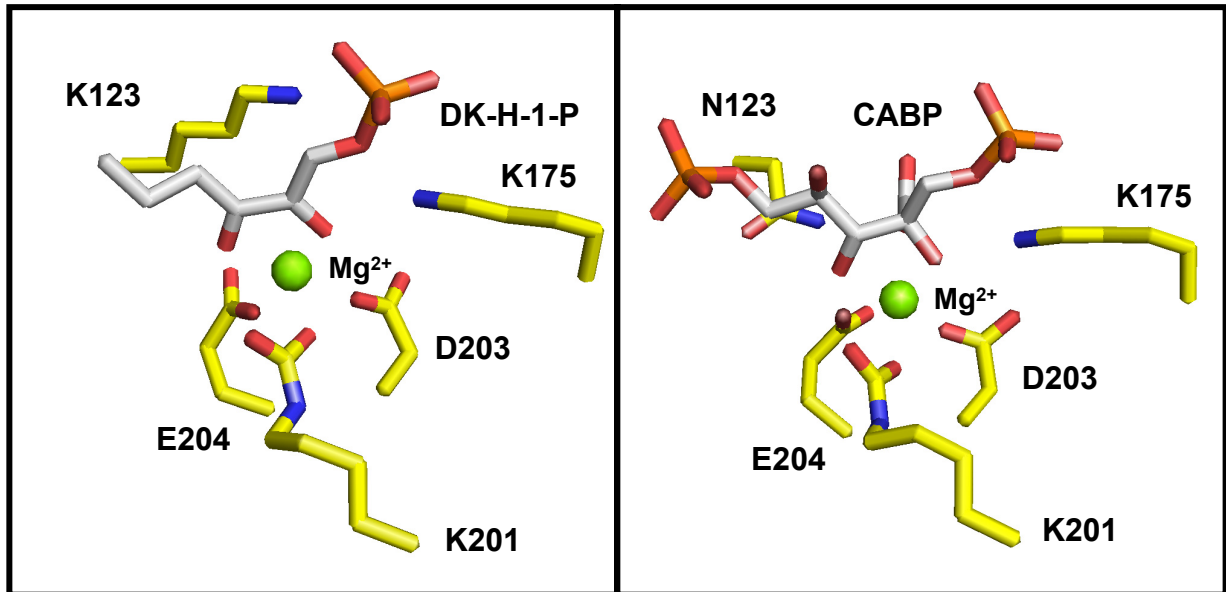


Figure 1-5. RLPおよびRuBisCOの4次構造比較 (Andersson and Backlund 2008を一部改変)
 (A) *Geobacillus kaustophilus* RLP のL2ダイマー構造 (PDB code 2OEM)。Lを青と緑で示す。(B) 8個のLと8個のスマールサブユニット (S) からなるハウレンソウRuBisCO のL8S8構造 (8RUC)。Sを黄色で示す。また、L2S2をリボンモデルで示す。(C) form II *Rhodospirillum rubrum* RuBisCO (RrRuBisCO) のL2ダイマー構造 (9RUB)。(D) 10個のLが会合した (L2)₅ 構造を形成する form III *Thermococcus kodakaraensis* RuBisCO (1GEH)。A、B、Cそれぞれの活性中心1つにつき2,3-diketo-hexane-1-phosphate (DK-H-1-P)、2-carboxyarabinitol-1,5-bisphosphate (CABP) または RuBP (すべて赤で示す) が1分子ずつ結合している。Dでは、2つのリン酸結合部位からなる1つの活性中心に2分子の硫酸イオンが結合している。

A

G. kaustophilus RLP (2OEM)

Spinach RuBisCO (8RUC)



B

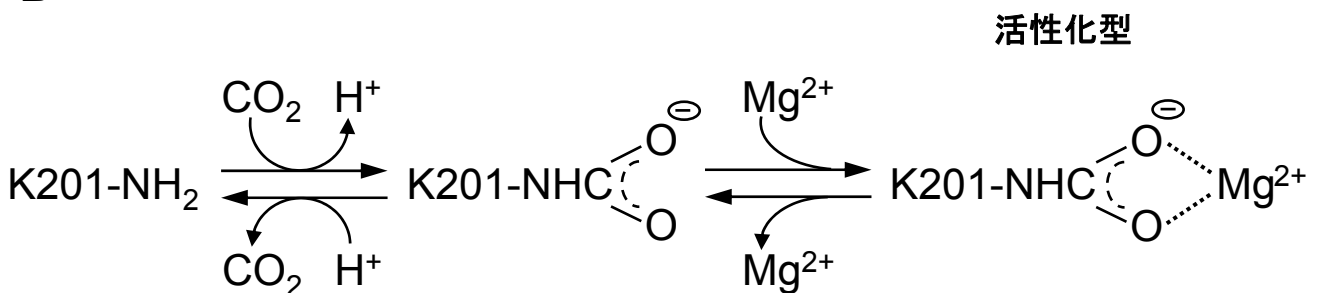
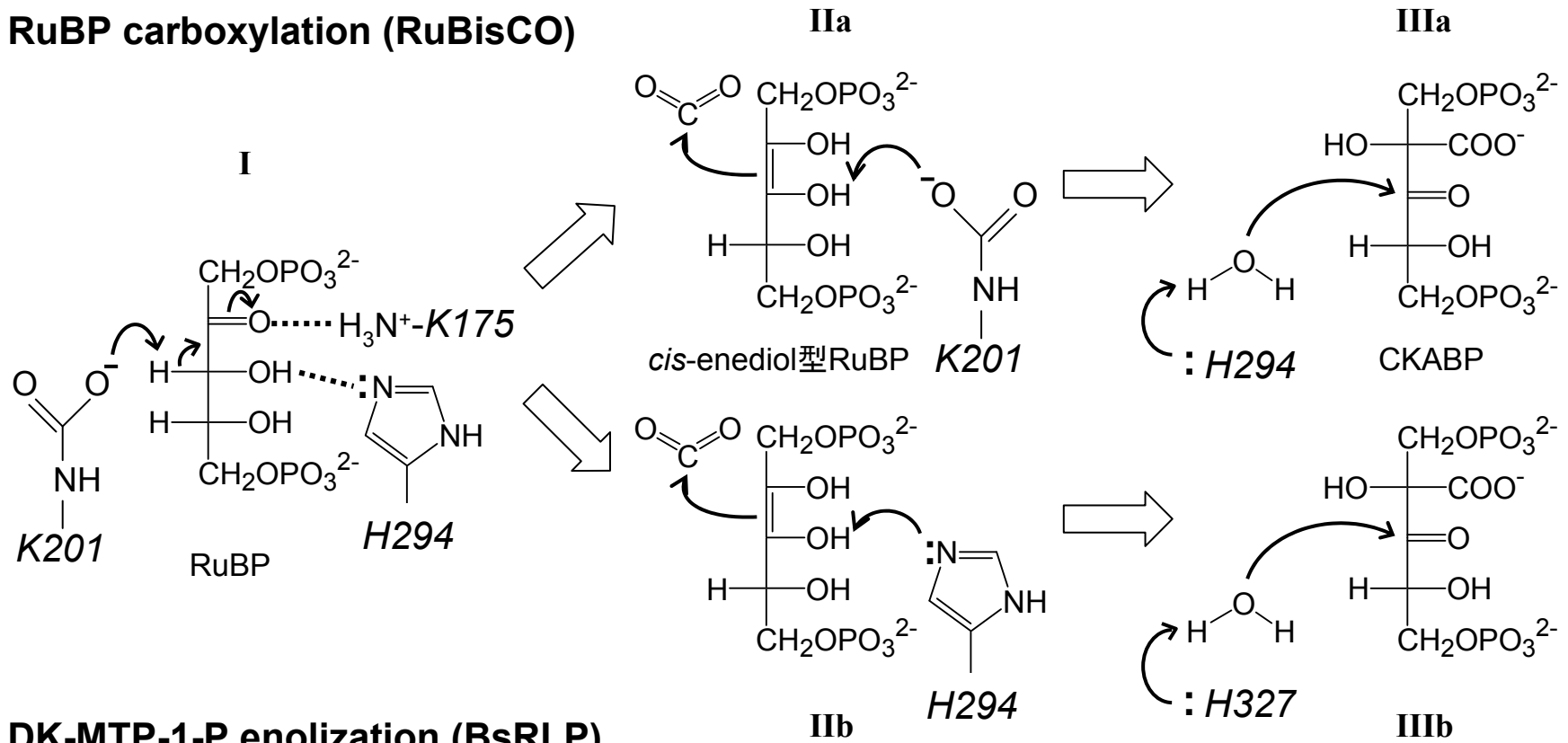


Figure 1-6. RLPとRuBisCOの活性中心および活性化機構

(A) *Geobacillus kaustophilus* RLP (left panel ; PDB code 2OEM)およびホウレンソウRuBisCO (right panel ; PDB code 8RUC) の活性中心。DK-MTP-1-P enolase活性を示す*G. kaustophilus* RLPはBsRLPと約60%の相同性を示す。*G. kaustophilus* RLPは基質アナログの2,3-diketo-5-hydroxypentane-1-phosphate (DK-H-1-P)、ホウレンソウRuBisCOは反応中間体アナログの2-carboxyarabinitol-1,5-bisphosphate (CABP)を活性中心に結合している。活性部位中の炭素および酸素、窒素、リン酸原子はそれぞれ黄、赤、青、オレンジのスティックで、Mg²⁺は緑で示した。両活性中心に存在するアナログの炭素原子はグレーで示した。立体構造はPyMOL, version 0.98 (<http://pymol.sourceforge.net/>)を用いて作製した。*G. kaustophilus* RLPの活性中心残基のアミノ酸番号はホウレンソウRuBisCOラージサブユニットの配列番号にあわせた。(B) RuBisCOおよびRLPの活性化機構。活性中心に存在するLys201のε-アミノ基にCO₂が結合し、カルバメート化Lys201が形成される。次に、カルバメート化Lys201のカルボキシル酸素にMg²⁺が配位し、活性化型となる。

RuBP carboxylation (RuBisCO)



DK-MTP-1-P enolization (BsRLP)

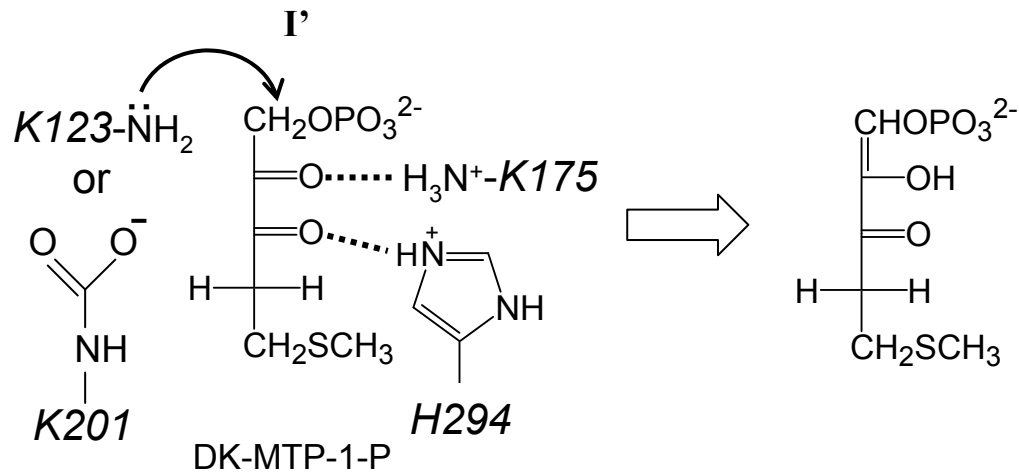
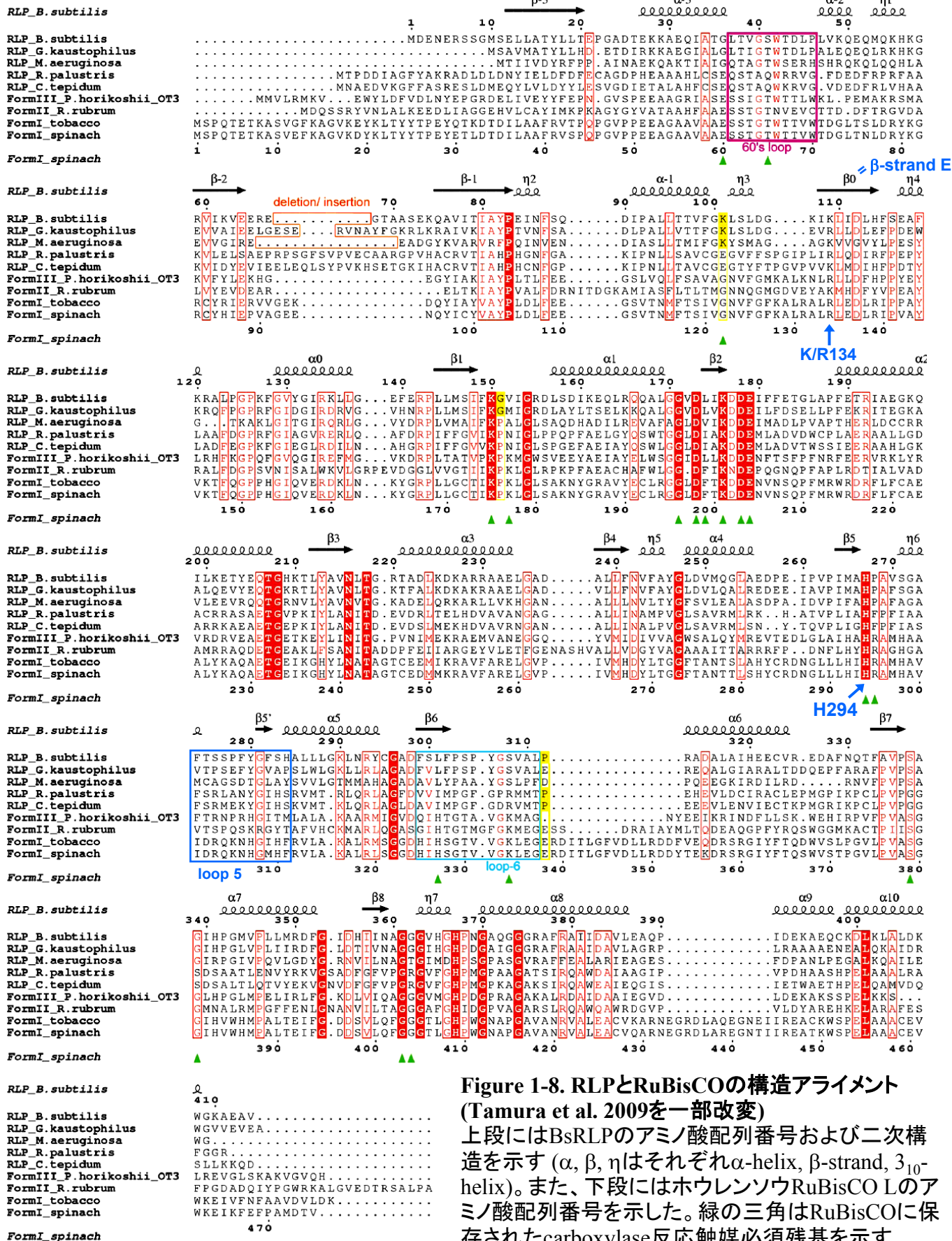


Figure 1-7. RuBisCOのRuBP carboxylase反応 (上段) とBsRLPのDK-MTP-1-P enolase反応 (下段) の触媒機構比較

RuBisCO のRuBP carboxylationを構成する5段階反応のうち最初の3段階であるRuBP enolization (I)、carboxylation (II)、hydration (III)の反応機構を示した。Carboxylationおよびhydrationは2種類の反応機構 (IIa→IIIaもしくはIIb→IIIb)が提唱されている。また、DK-MTP-1-P enolization (I') においてC1のプロトンを引き抜く塩基は同定されていない (Lys123もしくはカルバメート化Lys201)。



第 2 章

RuBisCO superfamily における Lys134 の機能解析

2-1. 序論

これまで、RuBisCO と RLP の比較解析は、両酵素で保存された RuBisCO の触媒残基にのみ焦点が当てられてきた。しかしながら、触媒残基に加えて、RuBisCO superfamily には活性中心から離れているものの高度に保存されているアミノ酸残基が存在する。Fig. 1-8 に示す構造アライメントでは、72 のアミノ酸残基が完全にあるいは高度に保存されている。その 1 つとして、 β -strand E 上に存在する 134 番目のアミノ酸残基は、RuBisCO superfamily 間で正電荷のリジンもしくはアルギニンとして高度に保存されている (Fig. 2-1, 2-2)。Synechocystis PCC6803 由来の form I RuBisCO の解析から、Arg134 は C-terminal tail を捕捉して loop 6 の閉構造を安定化することが報告された (Gutteridge et al. 1993; Satagopan and Spreitzer 2004; Newman and Gutteridge 1993; Marcus et al. 2005)。RuBisCO は RuBP のエノール化や CO₂ 付加反応を安定に進行させるために、loop 6 を閉鎖して活性中心を外界の水分子やイオンによる攻撃から防いでいる (Schreuder et al. 1993)。Loop 6 は carboxylase 反応および oxygenase 反応の遷移状態の安定化に違いを生じさせ、RuBisCO の CO₂/O₂ specificity を決定していると考えられている (Chen and Spreitzer 1992)。このとき、Arg134 は C-terminal tail に存在する Asp473 とのイオン結合などにより C-terminal tail を捕捉する。

Form I とは対照的に、*R. rubrum* RuBisCO (RrRuBisCO) を含む form II RuBisCO や RLP は構造・機能上 C-terminal tail を必要としない触媒を行う (Lundquist and Schneider 1991a, b; Tamura et al. 2009)。しかしながら、これらの酵素は C-terminal tail を捕捉する必要がないにも関わらず、134 番目の残基は正電荷アミノ酸のリジンとして高度に保存されている (Fig. 2-1)。さらに、RrRuBisCO や BsRLP の Lys134 は、form I RuBisCO の Arg134 と同様、NTD と CTD という 2 つのドメインの境界に存在する (Fig. 2-2)。それだけでなく、Lys/Arg134 はそれぞれの酵素の立体構造上ほぼ同じ位置の β -strand E 上に位置することから、構造上も保存されていた。これらのことから、RrRuBisCO や BsRLP では、Lys134 は form I RuBisCO の用いている C-terminal tail の捕捉とは異なる未知の機能を有していることが予想される。

本章では、form II RuBisCO と RLP で高度に保存された Lys134 の機能を RrRuBisCO と BsRLP のアミノ酸置換酵素を用いて解析した。Lys134 が RrRuBisCO と BsRLP の構造安定性や触媒に与える影響を解析したところ、それぞれの役割は両酵素

で異なることが示唆された。

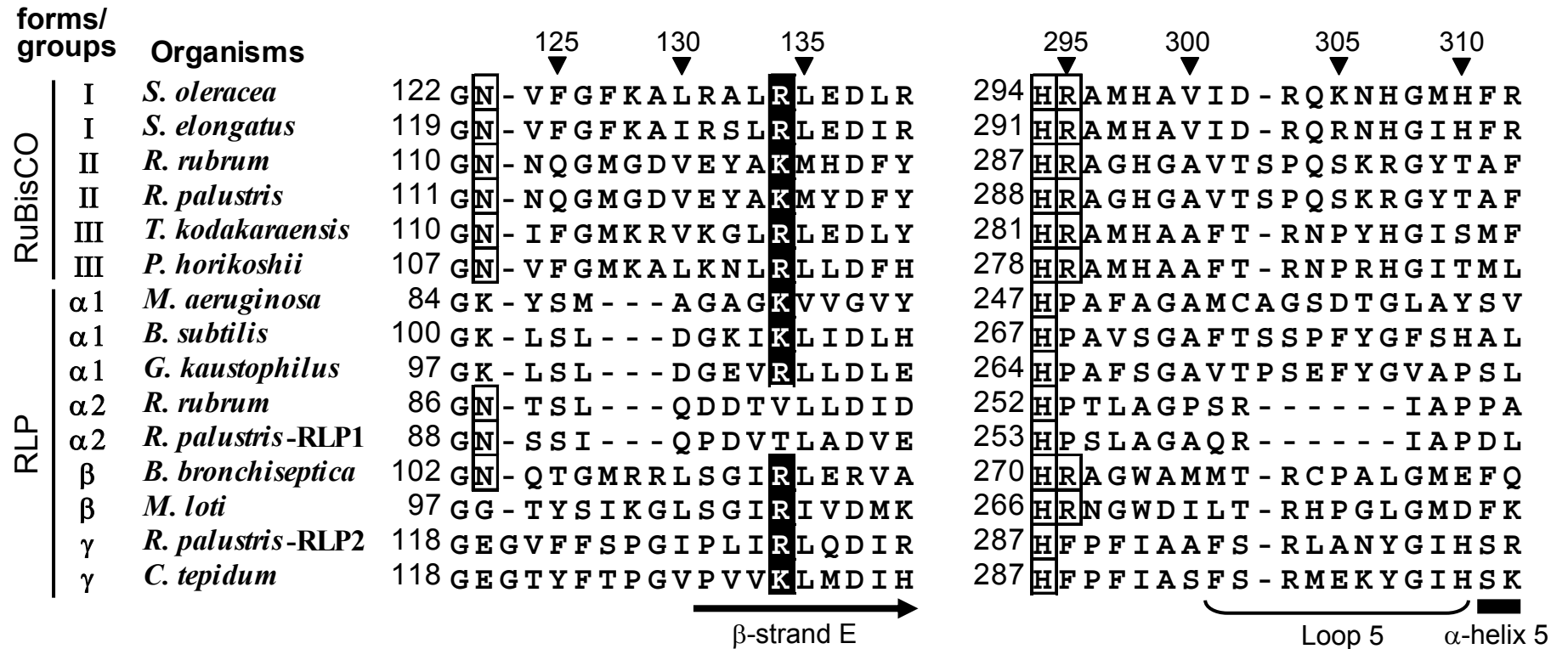


Figure 2-1. Lys134との相互作用に関わるアミノ酸配列の部分アライメント

carboxylase反応の触媒必須残基は白のbox、本章で扱うLys134は黒のハイライトで示した。上段にはホウレンソウRuBisCO Lのアミノ酸配列番号を示し、その他のRuBisCO、RLPのアミノ酸配列番号はform Iに準拠させた。各々の配列の左に示す数字は固有の配列番号を示す。下段には、form II RrRuBisCO (PDB code 5RUB) の2次構造を示した。アライメントは、carboxylase反応触媒必須残基や二次構造をもとにマニュアルで作製した。アライメント作製に用いた遺伝子は以下の通り。*Spinacia oleracea* (NP_054944), *Synechococcus elongatus* PCC6301 (YP_170840), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (YP_427487 for form II; YP_427085 for α 2), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (NP_949975 for form II; NP_947514 for α 2; NP_945615 for γ), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (YP_184703), *Pyrococcus horikoshii* OT3 (NP_142861), *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (CAJ43366), *Bacillus subtilis* str. 168 (NP_389242), *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (YP_146806), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NP_887583), *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (BAB53192), *Chlorobium tepidum* TLS (NP_662651)

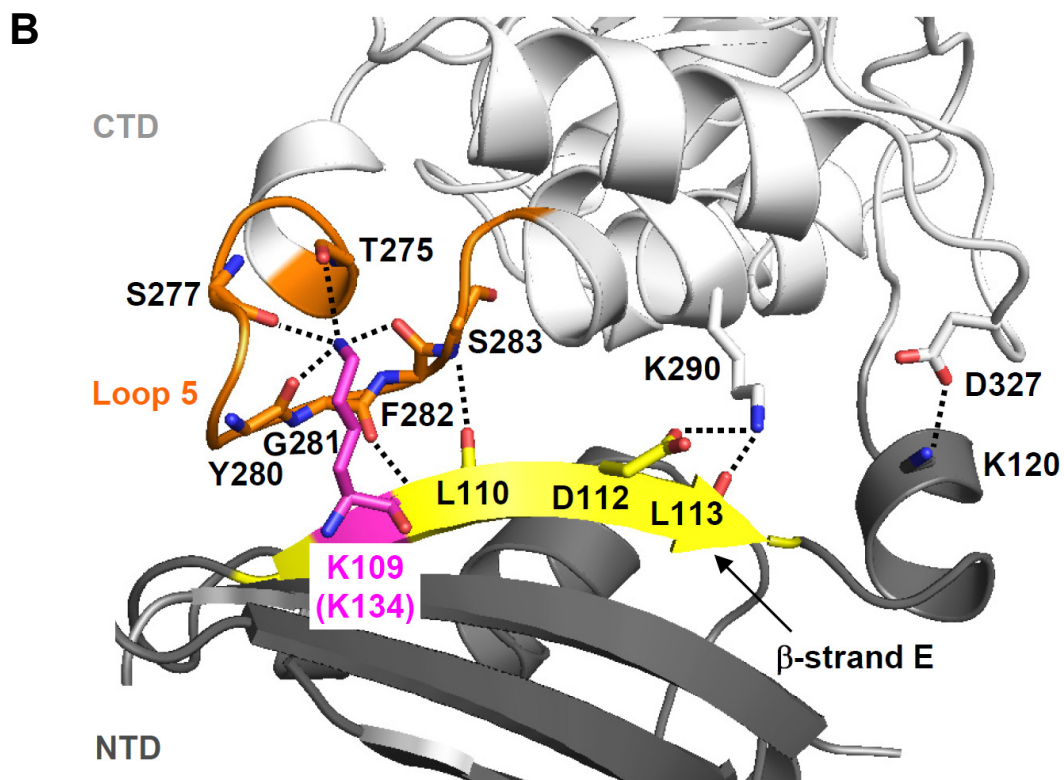
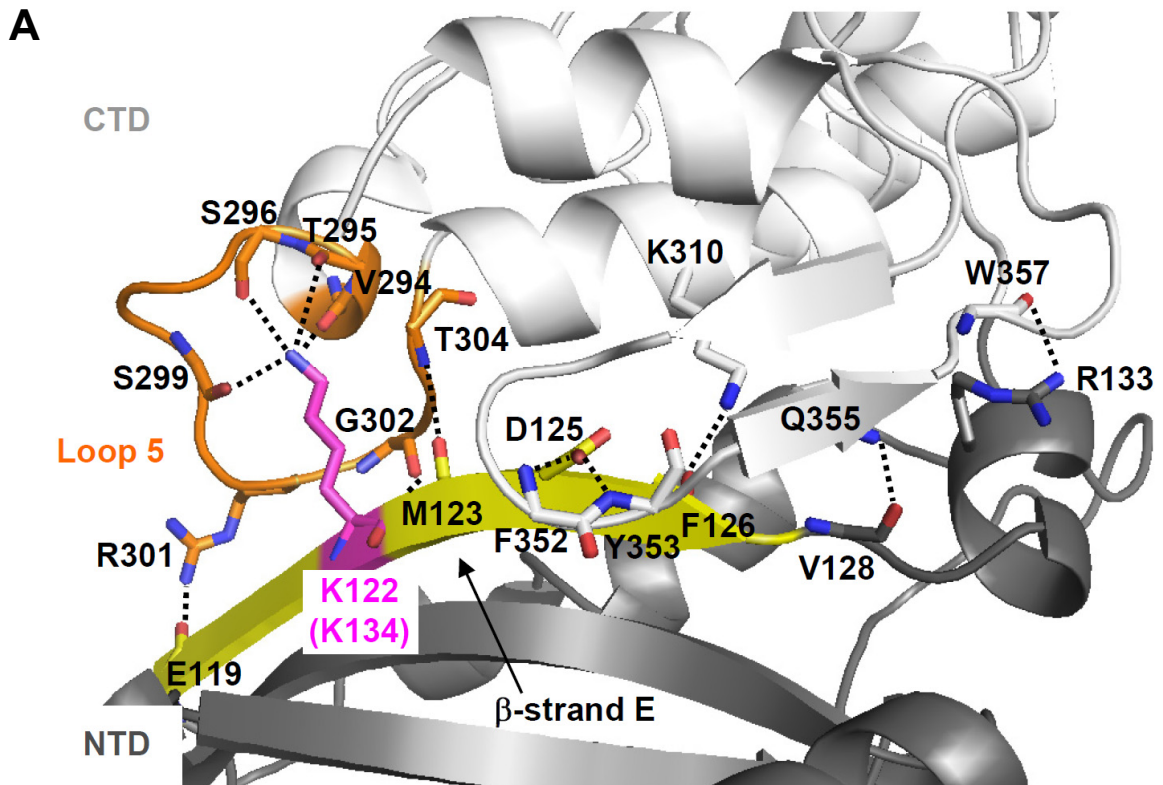


Figure 2-2. RrRuBisCOおよびBsRRLPにおけるドメイン間相互作用の比較

(A) RrRuBisCO (PDB code 5RUB) モノマーのNTD-CTD会合境界。NTD-CTDの会合に関わるアミノ酸残基はスティックで表示した(酸素原子は赤、窒素原子は青)。NTD(アミノ酸残基2-136)、CTD(137-459)、β-strand E(119-127)、loop 5(294-304)は、それぞれグレー、白、黄色、オレンジで示した。また、Lys134は紫色のスティックで示した。(B) BsRRLP (PDB code 2ZVI) モノマーのNTD-CTD境界。NTD(11-123)、CTD(124-410)、β-strand E(108-114)、loop 5(274-284)。立体構造はPyMOLを用いて作製した。

2-2. 材料と方法

点変異の導入

NdeI/BamHI 部位に RrRuBisCO (*cbbM*) もしくは BsRLP (*mtnW*) 遺伝子が挿入された pET15b-*cbbM* もしくは pET15b-*mtnW* は Asdida *et al.* 2003 により作製されている。RrRuBisCO および BsRLP の K134R、K134M、K134E への点変異導入は、pET15b-*cbbM*、pET15b-*mtnW* を鋳型に用いた PCR により行った。PCR は KOD DNA Polymerase plus (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、1 % dimethylsulfoxide が存在する条件で行った。熱サイクルプログラムは以下の通りである：変性は 94 °C で 30 秒、アニーリングは 55 °C で 30 秒、伸長反応は 68 °C で 435 秒を 30 サイクル行った。*cbbM*、*mtnW* に点変異を導入するためのプライマー対をフォワード、リバースの順に記した。

Primer name	Primer sequence (5'-3')
K122R-forward (RrRuBisCO)	GTGGAATACGCCAGGATGCACG
K122R-reverse (RrRuBisCO)	GTCGCCCATAACCCTGGTTGTTTC
K122M-forward (RrRuBisCO)	GTGGAATACGCCATGATGCACGA
K122M-reverse (RrRuBisCO)	GTCGCCCATAACCCTGGTTGTTTC
K122E-forward (RrRuBisCO)	GTGGAATACGCCGAGATGCACG
K122E-reverse (RrRuBisCO)	GTCGCCCATAACCCTGGTTGTTTC
K122R-forward (BsRLP)	CCTGGACGGAAAAATCAGATTAATCGATCT
K122R-reverse (BsRLP)	GACAGCTTGCCAAACACTGTTGTCAG
K122M-forward (BsRLP)	CCTGGACGGAAAAATCATGTTAATCGATCT
K122M-reverse (BsRLP)	GACAGCTTGCCAAACACTGTTGTCAG
K122E-forward (BsRLP)	CCTGGACGGAAAAATCGAATTAATCGATCT
K122E-reverse (BsRLP)	GACAGCTTGCCAAACACTGTTGTCAG

次に、得られた PCR 産物の 5'末端を T4 polynucleotide kinase (Takara, Ohtsu, Shiga, Japan) によりリン酸化した後、Ligation High (TOYOBO, Osaka, Japan) により連結、*Escherichia coli* DH5 α に形質転換し、正しく点変異が導入されたプラスミドを選別した。

大腸菌における RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素の大量発現

His-tag 融合 RrRuBisCO 野生型、K134R、K134M、K134E および BsRLP 野生型、

K134R の発現には *E. coli* BL21 (DE3) を用い、50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin を含む LB 培地において 37 °C で一晩培養したものをを用いた。His-tag 融合 BsRLP K134M および K134E の発現に用いた *E. coli* BL21 (DE3) pLysS は、37 °C、50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin および 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol を含む LB 培地で培養した。次に、培養液の OD₆₀₀ が 0.4–0.6 に達すると培養温度を 25 °C まで下げ、終濃度が 1 mM となるように isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して 5 時間発現誘導を行った。細胞は 5500 g で回収し、-80 °C で保存した。

酵素の精製と PAGE 解析

各リコンビナントタンパク質は添付のプロトコールに従い、His-Bind resin (Novagen, USA) を用いて精製した。精製タンパク質は sodium dodecyl sulfate (SDS) を含まない 10 % acrylamide gel を用いた native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE)、または SDS を含む 15 % acrylamide gel を用いた SDS-PAGE で解析した。PAGE は Laemmli 1970 に従って行った。

酵素活性の測定

RuBisCO の carboxylase 反応を測定する際、活性測定に用いるすべての溶液、酵素、試薬に存在する O₂ と CO₂ を N₂ に置換するために、以下の操作を行った。まず、活性測定に用いる 200 mM Bicine-NaOH、pH 8.0、20 mM MgCl₂ を 30 分以上 N₂ ガス (>99.99%) (Iwatani, Japan) でスパージし、溶存する O₂ と CO₂ を追い出した。次に、1 mg の His-tag 融合 RrRuBisCO に対して 2U の Thrombin protease (Novagen, Madison, WI, USA) を加え、24 °C、3 時間の条件で His-tag を切断した。この反応液を、O₂-、CO₂-free の 200 mM Bicine-NaOH、pH 8.0、20 mM MgCl₂ で平衡化されている Sephadex G-25 (GE Healthcare, USA) を充填した 0.7×30 cm column (Bio-Rad, Tokyo, Japan) に供し、切断された His-tag を除去するとともに、RrRuBisCO 溶液を O₂-、CO₂-free にした。RrRuBisCO の濃度は、280 nm の吸光度から分子吸光係数 1.2 cm⁻¹ (mg mL⁻¹)⁻¹ を用いて算出した (Stinger et al. 1981)。また、嫌気測定に用いる試薬は、20 分以上 N₂ ガスでスパージして O₂-、CO₂-free にした後、N₂ ガスでスパージした 200 mM Bicine-NaOH、pH 8.0、20 mM MgCl₂ に溶解させた。

RuBisCO の carboxylase 活性は、25 °C において、NADH の減少とカップルさせた分光学的手法により測定した (Schloss et al. 1982; Pearce and Andrews 2003 を一部改変)。1 mL の系は以下を含む。200 mM Bicine-NaOH (pH 8.0)、20 mM MgCl₂、0.6–66 mM NaHCO₃、5 mM ATP、20 mM creatine phosphate、0.2 mM NADH、22.5 units/mL of yeast

3-phosphoglycerate kinase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, United States)、20 units/mL of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich)、25 units/mL of creatine phosphate kinase (Oriental yeast, Tokyo, Japan)、0.1 mg/mL of bovine carbonic anhydrase (Sigma-Aldrich)。また、野生型と比較して活性が大きく低下していた RrRuBisCO K134M、K134E 変異タンパク質の carboxylase 活性測定は、上記の coupling enzyme に 55 units/mL triosephosphate isomerase (Sigma-Aldrich)、20 units/mL glycerol-3-phosphate dehydrogenase (TOYOBO, Osaka, Japan) を加えることで、PGA 1 分子当たり 4 分子の NADH 減少を伴う系で検出感度を高めて測定を行った。また、カップリング酵素に含まれる O₂ と CO₂ は RrRuBisCO と同じ方法で N₂ に置換した。N₂ に置換した RrRuBisCO 溶液は、活性化 buffer (200 mM Bicine-NaOH, pH 8.0、20 mM MgCl₂, 40 mM NaHCO₃ を含む) により 25°C、20 分間活性化させた。嫌気における RrRuBisCO 野生型および K134R の carboxylase 活性は、2 mM RuBP (Sigma-Aldrich) の添加により開始させた。また、K_m(RuBP) の測定は、好気、66 mM NaHCO₃ 存在下で行った。反応液中の溶存 CO₂ 濃度は、Yokota and Kitaoka 1985 をもとに算出した。V_{max}(CO₂)、K_m(CO₂)、K_m(RuBP) は、KaleidaGraph、version 3.09a (HULINKS, Tokyo, Japan) により、ミカエリス-メンテンの式にフィットさせて算出した。

また、BsRLP の DK-MTP-1-P enolase 活性測定法は Saito et al. 2009 に従った。活性測定に用いた BsRLP 野生型および K134R は Thrombin による His-tag 切断後、ゲルろ過により精製した (Saito et al. 2009)。BsRLP K134M および K134E は Thrombin 処理により失活するため、His-tag を融合したままの酵素を活性測定に用いた。

熱失活試験

RrRuBisCO 野生型および K134R は、濃度 0.5 μg/μL となるように 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM MgCl₂、15% glycerol に希釈した。そのうち 50 μL を 50–75°C で 20 分間熱処理した後、5 分間氷冷した。次に、熱処理した変異酵素を 40 mM NaHCO₃ 存在下で 25°C、20 分活性化させ、残存 carboxylase 活性を測定した。70 および 75°C で熱処理したサンプルは、氷冷した後、さらに 6000 g、5 分間遠心した後の上清を用いた。

同様に、BsRLP 野生型および K134R を濃度 0.5 μg/μL となるように 50 mM Tris-HCl (pH 8.2)、1 mM MgCl₂、15% glycerol に希釈した。そのうち 50 μL を 30–50°C で 20 分間熱処理した後、5 分間氷冷し、残存 enolase 活性を 25°C で測定した。25°C で処理した RrRuBisCO、BsRLP の carboxylase および DK-MTP-1-P enolase 活性を 100 とした。

2-3. 結果

RrRuBisCO および BsRLP のモノマー構造比較

RrRuBisCO および BsRLP の Lys134 は NTD の β -strand E 上に存在し、CTD に面している (Fig. 2-2)。Lys134 側鎖の ϵ -アミノ基は、loop 5 に囲まれるように loop 5 上のいくつかの残基のバックボーンカルボニル酸素と水素結合を形成している。モノマー分子内の NTD-CTD 相互作用を網羅的に調べた結果、NTD-CTD 間に存在する相互作用の総数は、BsRLP より RrRuBisCO の方が多いことが明らかとなった (Table 2-1, 2-2)。

Table 2-1. RrRuBisCO の L (PDB code 5RUB)における NTD-CTD 相互作用

NTD	CTD
Glu119 O	Arg301 NH2
Lys122 NZ	Val294 O
Lys122 NZ	Val295 O
Lys122 NZ	Ser296 O
Lys122 NZ	Ser299 O
Met123 N	Gly302 O
Met123 O	Thr304 N
Asp125 OD1	Phe352 N
Asp125 OD2	Tyr353 N
Phe126 O	Lys310 NZ
Val128 O	Gln355 NE2
Arg133 NH1	Trp366 O

NTD と CTD 間に存在するすべての極性相互作用候補(<3.5 Å)を示す。

Table 2-2. BsRLP の L (PDB code 2ZVI)における NTD-CTD 相互作用

NTD	CTD
Lys109 NZ	Thr275 O
Lys109 NZ	Ser277 O
Lys109 NZ	Tyr280 O
Lys109 NZ	Phe282 O
Leu110 O	Ser283 N
Leu110 N	Gly281 O
Asp112 OD2	Lys290 NZ
Leu113 O	Lys290 NZ
Lys120 NZ	Asp327 OD1

NTD と CTD 間に存在するすべての極性相互作用候補(<3.5 Å)を示す。

大腸菌内における RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素の発現

RrRuBisCO および BsRLP における Lys134 の機能を解析するため、両リジン残基を同じ正電荷のアルギニン、電荷を持たないメチオニン、負電荷のグルタミン酸に置換し、それら変異酵素を大腸菌で発現させた。大腸菌での RrRuBisCO または BsRLP 野生型と変異酵素の発現は、37°C もしくは 25°C で行った。大腸菌より抽出したトータルタンパク質および可溶性タンパク質画分を用いて、SDS-PAGE により RrRuBisCO、BsRLP 野生型と変異酵素の蓄積量を解析した。その結果、すべての RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素について、可溶性画分に発現させることができた (Fig. 2-3)。トータル画分に存在する RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素の蓄積量は、それぞれの野生型とほぼ同レベルであったことから (Fig. 2-3)、変異酵素の翻訳量は野生型と同じであると考えられた。RrRuBisCO において、可溶性タンパク質画分に存在する K134R、K134M、K134E の蓄積量は、37、25°C どちらの温度で発現させても、野生型とほとんど同レベルであった (Fig. 2-3A)。一方で、可溶性タンパク質画分に存在する BsRLP K134M、K134E の蓄積量は、37°C で発現誘導を行うと野生型 BsRLP より減少し、25°C 発現ではその蓄積量はやや回復するものの野生型と比較して低いレベルであった (Fig. 2-3B)。よって、BsRLP 変異酵素の可溶性画分における蓄積量は、培養温度の影響を受けることが明らかとなった。一般に、大腸菌で発現させたターゲットタンパク質は、熱安定性や構造安定性を低下させる変異が導入されると、不溶性の封入体の形

成が促進されることが知られている (Sambrook and Russell 2001)。よって、BsRLP への変異導入は、熱に対しての安定性を低下させる要因となったため可溶性タンパク質画分に存在する BsRLP 変異酵素の蓄積量が減少したと予想される。一方で、点変異の導入は RrRuBisCO の安定性にはほとんど影響しなかったことから、RrRuBisCO と BsRLP で異なる結果が観察された。

精製した変異酵素のダイマー形成能

RrRuBisCO および BsRLP は L2 ダイマーとして機能することが知られている (Andersson and Backlund 2008; Imker et al. 2007; Tamura et al. 2009; Schneider et al. 1990)。そこで、変異が触媒構造の形成に与える影響を調べるため、native-PAGE を行った。BsRLP K134M および K134E は His-tag 切断に要する短時間の処理で速やかに失活するため、PAGE 解析にはすべての酵素について His-tag を融合した酵素を用いた。Ni affinity クロマトグラフィーにより大腸菌粗酵素液から野生型および変異型 RrRuBisCO と BsRLP を精製し、SDS-PAGE を行ったところ、目的の位置に単一バンドとして精製できたことを確認した (Fig. 2-4 下段)。Native-PAGE において、すべての RrRuBisCO 変異酵素は野生型と同じく L2 ダイマーの分子量を示したことから、ダイマーを形成できることが明らかとなった (Fig. 2-4A)。野生型と比較して、K134M、K134E における移動度の微妙な変化は、リジン側鎖の電荷の消失、もしくは負電荷アミノ酸への置換が原因であると考えられた。また、リジンをアルギニンに置換した BsRLP K134R は野生型と同じく L2 ダイマーを形成できた。

興味深いことに、native-PAGE における BsRLP K134M および K134E は、ダイマーの位置にバンドが検出されず、L2 ダイマーより高分子側にスミアーに検出された (Fig. 2-4B)。これらの変異酵素は L2 ダイマーより小さい分子量の領域にも検出されなかったことから、モノマー単独でも存在しないことが示唆された。この結果から、これらの変異タンパク質は可溶化しているものの、正常なモノマー構造を形成できず、特定の構造をとらないことが予想された。よって、BsRLP K134M と K134E の変異は、モノマーの形成を阻害し、結果として触媒の単位であるダイマーの形成ができないほど大きな影響を与えた。このことから、Lys134 の正電荷は BsRLP におけるモノマーや L2 ダイマーの形成に極めて重要であることが明らかになった。

以上の結果から、Lys134 のアミノ酸置換は RrRuBisCO の構造維持には影響を与えなかったが、BsRLP のモノマーおよびダイマーの形成に大きな影響を与えたため、両者において変異の影響が異なることが明らかとなった。

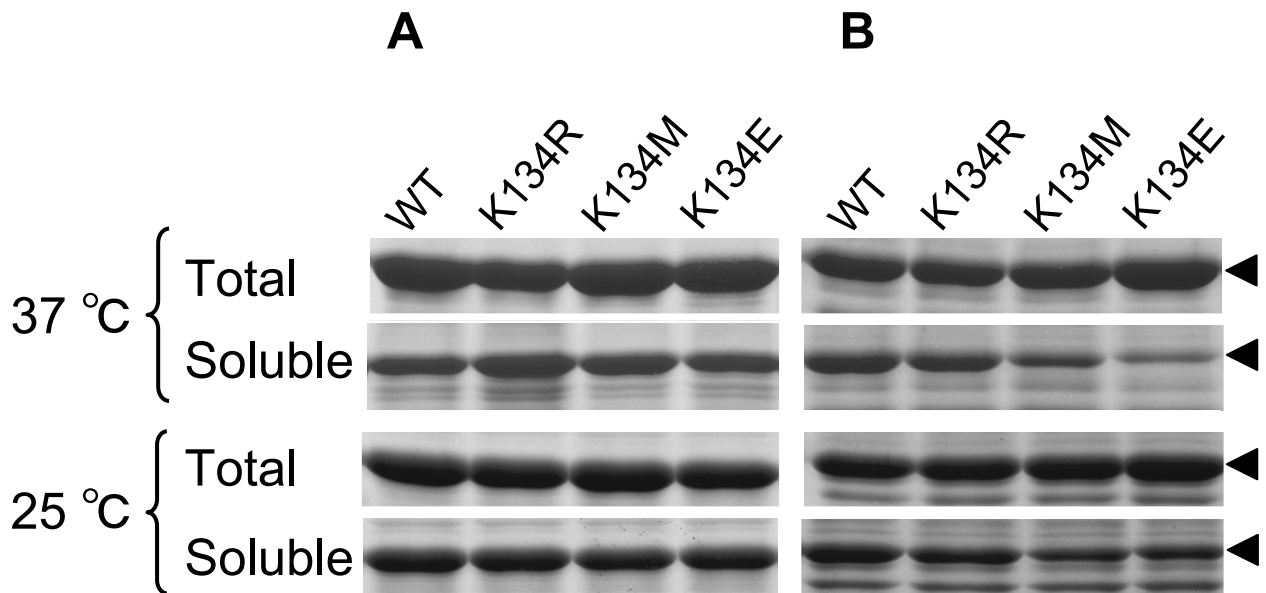


Figure 2-3. 大腸菌*E. coli* BL21 (DE3) pLysSにおけるRrRuBisCOおよびBsRLPの発現
 RrRuBisCO (A) もしくはBsRLP (B) について、1 mM IPTG存在下、37 °Cで3時間もしくは25 °Cで5時間発現誘導を行った。大腸菌抽出液のうち8 μ gのトータルおよび可溶性画分をSDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル) に供し、発現量を解析した。矢印はHis-tag融合RrRuBisCO (52.6 kDa) およびBsRLP (46.0 kDa) を示す。ゲルはCoomassie brilliant blue R-250により染色した。

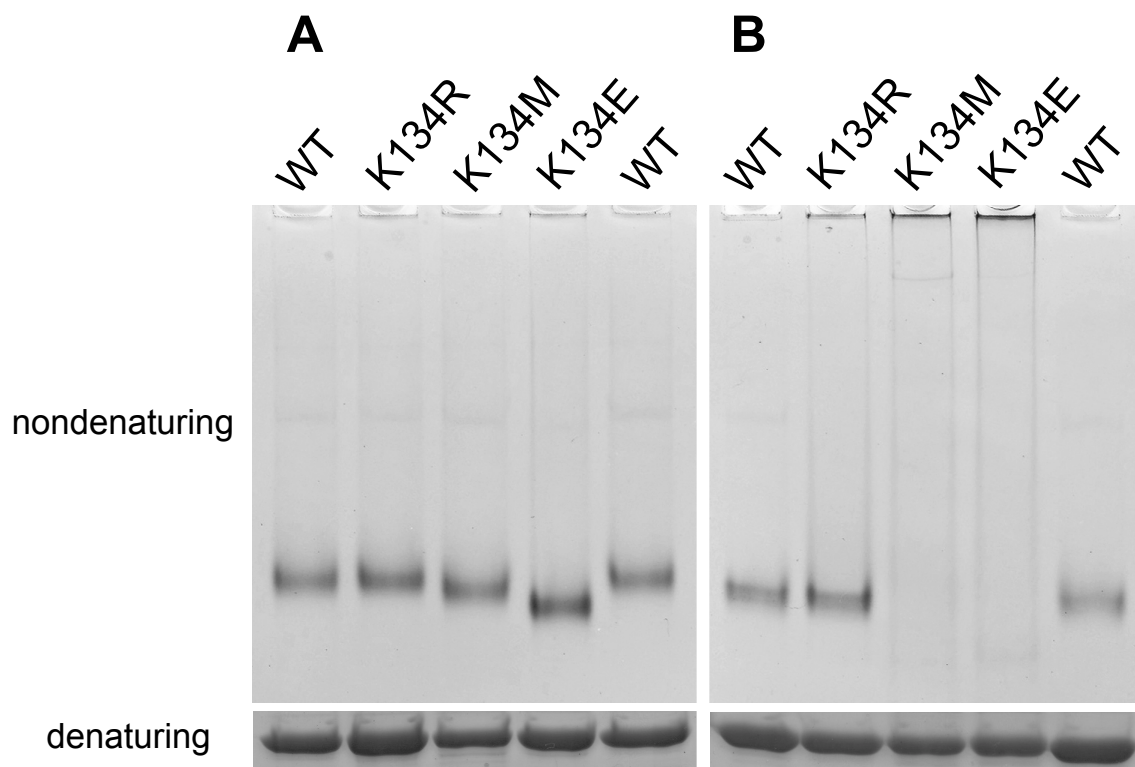


Figure 2-4. 精製した野生型およびLys134変異酵素のnative-およびSDS-PAGE解析
 His-tag融合RrRuBisCO (A) およびBsRLP (B) それぞれをHis-bind resinにより精製し、
 native- (上段, 10%アクリルアミドゲル, 1 μ g/lane) もしくはSDS-PAGE (下段, 15%アクリ
 ルアミドゲル, 3 μ g/lane)に供した。ゲルはCoomassie brilliant blue R-250により染色し
 た。

RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素の熱安定性および酵素学的特性

Lys134 の構造安定性への影響を詳細に解析するため、RrRuBisCO および BsRLP 変異酵素の熱失活試験により熱安定性を評価した (Fig. 2-5)。熱処理を行う前に His-tag を切除した RrRuBisCO K134R、K134M、K134E の carboxylase 活性を測定すると、それぞれ野生型の 69%、0.2%、0.8%であった (Table 2-3)。これらの変異タンパク質は熱失活試験において野生型とよく似た挙動を示したことから (Fig. 2-5)、RrRuBisCO の Lys134 は熱安定性ではなく適切な活性中心の形成に関与していることが示唆された。一方、BsRLP K134R は野生型の 68%の enolase 活性を示したが、K134M および K134E の活性は検出限界以下であった (Table 2-4)。この結果に加えて、RrRuBisCO を含む RuBisCO やその他の RLP はダイマー境界に 2 つの活性中心を形成することから (Andersson and Backlund 2008; Li et al. 2005; Tabita et al. 2007; Imker et al. 2007; Schneider et al. 1990)、BsRLP におけるダイマー化は活性中心の形成に必須であることが示された。BsRLP 野生型は 40°Cでの熱処理に対して失活が見られず、45°Cにおいて約 80%の残存活性を示した (Fig. 2-5)。野生型と対照的に、K134R は 40°Cで完全に失活したことから、BsRLP の Lys134 はダイマー構造の維持や熱安定性に大きく寄与することが示唆された。

次に、野生型と Lys134 変異酵素の酵素学的特性を解析した (Table 2-3, 2-4)。RrRuBisCO 野生型の k_{cat} 、 $K_m(\text{CO}_2)$ 、 $K_m(\text{RuBP})$ 、 $k_{cat}/K_m(\text{CO}_2)$ 、 $k_{cat}/K_m(\text{RuBP})$ はこれまでに報告されている値とほぼ一致した (Harpel et al. 1991)。K134R の k_{cat} は野生型と比較して 40%低下し、 $K_m(\text{CO}_2)$ 、 $K_m(\text{RuBP})$ はそれぞれ 2 倍、1.9 倍に上昇した (Table 2-3)。K134R にみられたこれらのパラメーター変化は、reaction specificity を表す $k_{cat}/K_m(\text{CO}_2)$ 、 $k_{cat}/K_m(\text{RuBP})$ の低下を引き起こした。一方、BsRLP 野生型の k_{cat} 、DK-MTP-1-P に対する K_m および k_{cat}/K_m は我々の過去の報告とほぼ同じ値を示した (Saito et al. 2009)。野生型と比較して、BsRLP K134R は k_{cat} が 32%低下したものの、 K_m はほとんど変化しなかった (Table 2-4)。K134R のパラメーター変化は、 k_{cat}/K_m で示される reaction specificity の 38%の低下を引き起こした。

Table 2-3. 野生型および Lys134 変異 RrRuBisCO の酵素学的特性

Enzymes	activity ^a (%)	$K_m(\text{CO}_2)^b$ (μM)	$K_m(\text{RuBP})^b$ (μM)	k_{cat}^c (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_m(\text{CO}_2)$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_m(\text{RuBP})$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Wild-type	100	128 ± 23	30 ± 4	5.0	3.9 × 10 ⁴	1.6 × 10 ⁵
K134R	69	256 ± 109	56 ± 7	3.0	1.2 × 10 ⁴	5.4 × 10 ⁴
K134M	0.2	-	-	-	-	-
K134E	0.8	-	-	-	-	-

^a % activity は大気条件下で測定した。

^b それぞれの値は独立した 3 回の実験の平均値 ± SD を示す。

^c k_{cat} は、野生型および K134R の $V_{\text{max}}(\text{CO}_2)$ (5.9 ± 0.4, 3.6 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) を元に算出した。

Table 2-4. 野生型および Lys134 変異 BsRLP の酵素学的特性

Enzymes	activity (%)	K_m^a (μM)	k_{cat}^b (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Wild-type	100	12 ± 3	83	7.1 × 10 ⁶
K134R	68	13 ± 3	56	4.4 × 10 ⁶
K134M	<0.5 ^c	-	-	-
K134E	<0.5 ^c	-	-	-

^a それぞれの値は独立した 3 回の実験の平均値 ± SD を示す。

^b k_{cat} は、野生型および K134R の V_{max} (113 ± 9, 76 ± 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) を元に算出した。

^c Not detectable (<0.5%).

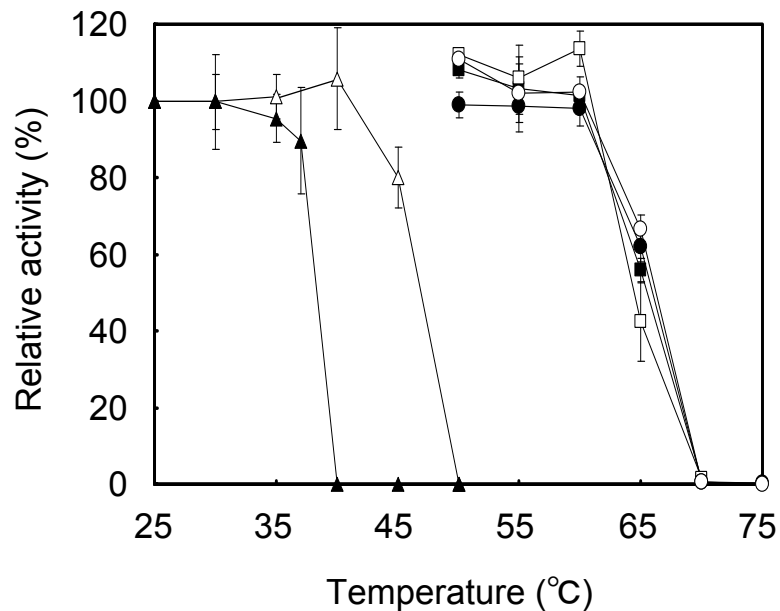


Figure 2-5. 熱失活解析

25 μg の精製酵素を様々な温度で20分間熱処理した。次に、サンプルを氷冷した後、好気条件下、25°Cで残存carboxylase活性もしくはenolase活性を測定した。RrRuBisCOは活性を測定する前に40 mM NaHCO_3 存在下で活性化した。残存活性は25°Cで熱処理したときの活性を基準とした。RrRuBisCOは野生型 (circles)、K134R (filled circles)、K134M (squares)、K134E (filled squares)で示し、BsRLPは野生型 (triangles)、K134R (filled triangles)で示した。それぞれの点は独立した3回の実験の平均値 \pm SDを示す。

2-4. 考察

RuBisCO superfamily における Lys/Arg134 の保存性

Lys134 は、*R. rubrum* と同じ α プロテオバクテリアである *Rhodospseudomonas palustris* や *Rhodobacter sphaeroides* だけでなく、 β 、 γ -プロテオバクテリア由来の form II RuBisCO に至るまで高度に保存されている (Fig. 2-1)。また、BsRLP が属し、DK-MTP-1-P enolase として機能する RLP α 1 グループでは、*B. licheniformis*、*B. cereus* などほぼすべての *Bacillus* 属に加えて、シアノバクテリアである *Microcystis aeruginosa* の RLP において Lys134 が保存されている。*Bacillus* 属の近縁である *G. kaustophilus* RLP は、134 番目のアミノ酸がアルギニンに置換されているものの、リジンと同じく正電荷のアミノ酸を保持している。そして、form I および III RuBisCO および機能が未知の β および γ グループの RLP においても、134 番目のアミノ酸残基はリジンもしくはアルギニンとして保存されている。唯一の例外として、 α 2 グループの RLP では 134 番目の残基が正電荷以外のアミノ酸に置換されており、*R. rubrum* RLP ではバリン、*R. palustris* RLP ではトレオニンに置換されている (Fig. 2-1)。 α 2 グループの *R. rubrum* RLP は新規の硫黄代謝において 5-methylthioribulose-1-phosphate の異性化反応を触媒することが報告されている (Imker et al. 2008)。おそらくこれらの RLP は正電荷アミノ酸が保存されているその他の RLP や RuBisCO とはやや異なる触媒・構造維持機構を備えていると考えられる。

本論文では、form II RrRuBisCO と α 1 グループ BsRLP における Lys134 の機能の重要性を明らかにした。これらの結果と正電荷アミノ酸残基の保存性から、Lys134 (Arg134) は RuBisCO superfamily の分子進化の過程で保存され続け、現存する RuBisCO superfamily の触媒能発揮や構造維持機構に重要な機能を果たしていると予想された。

RrRuBisCO と BsRLP における Lys134 の機能的相違

RrRuBisCO や BsRLP と同様、立体構造が明らかにされているすべての RLP と RuBisCO は、Lys134 (もしくは Arg134) と loop 5 主鎖のカルボニル酸素の間に水素結合ネットワークを有する (Li et al. 2005; Imker et al. 2007; Tabita et al. 2007; Andersson and Backlund 2008; Tamura et al. 2009)。本章では RrRuBisCO と BsRLP における Lys134 の機能を解析したが、興味深いことに Lys134 の機能は両者で著しく異なることが明らかとなった。Lys134 の正電荷の消失は、それぞれの構造に異なる影響を与えた。BsRLP の K134M および K134E は L2 ダイマーを形成できなかった (Fig. 2-4B)。これ

らの変異は NTD-CTD の cross-bridge に重要な Lys134 と loop 5 との相互作用を妨げ、正確なモノマーの形成を阻害することで L2 ダイマーの形成をも阻害したと予想される。一方、RrRuBisCO における K134M および K134E は触媒に必須の L2 ダイマー構造を維持していたが、ほぼ不活性に近い劇的な活性の低下が観察された (Table 2-3)。よって、RrRuBisCO の Lys134 は、活性中心から 15 Å 以上も離れた位置から carboxylase 反応の触媒に影響を与えることが示唆された。実際、Lys134 と相互作用する loop 5 は α -helix 5 や β -strand 6 を隔てて loop 6 を含む活性中心につながっている。それゆえ、RrRuBisCO の Lys134 は、loop 5 との相互作用を介して loop 6 の機能に大きな影響を与えると予想される。RuBisCO の carboxylase 反応は RuBP のエノール化、次に loop 6 の閉鎖により進行するガス基質の固定反応からなる。対照的に、BsRLP は loop 6 の閉鎖を必要としないエノール化反応しか行わない。これらのことから、Lys134 は loop 6 の運動をともなう RrRuBisCO の触媒に大きく貢献し、逆に loop 6 の運動をともなわない BsRLP の触媒への貢献は小さいことが示唆された。

RrRuBisCO の Lys134 への変異は触媒にのみ影響し、構造維持にほとんど影響が見られなかった原因として、NTD と CTD 間に存在する相互作用の数が多いことがあげられる。実際、RrRuBisCO の NTD-CTD 境界には 12 もの相互作用が存在し、2 つのドメインを強固に会合させていると考えられる (Table 2-1, Fig. 2-2A)。一方、BsRLP の NTD-CTD 境界には RrRuBisCO よりも相互作用の数が少なく、9 しか存在しない (Table 2-2, Fig. 2-2B)。そのため、Lys134 が NTD-CTD 相互作用に占める相対的な強さは、RrRuBisCO よりも BsRLP の方が強いと予想される。そのため、Lys134 のメチオニンやグルタミン酸への置換は、RrRuBisCO と BsRLP の構造維持に異なる影響を与える結果となった (Fig. 2-4)。RrRuBisCO は 12 ある NTD-CTD 相互作用のうち Lys134 の関わる 4 を失っても安定なコンフォメーションを維持できる一方で、BsRLP は合計 9 ある相互作用のうち Lys134 の関わる 4 を失うとコンフォメーションを維持できなかったと考えることができる。

RrRuBisCO と BsRLP の熱安定性には顕著な差が見られた (Fig. 2-5)。BsRLP K134R は野生型より熱安定性が低下したのに対し、すべての RrRuBisCO Lys134 変異酵素は野生型とほぼ同じ挙動を示した。よって、K134R の熱に対する不安定性から、Lys134 は BsRLP における構造への重要性が示唆された。

本章において、触媒残基以外に保存されている機能未知のアミノ酸残基の解析を行い、あらためてその重要性を再認識するような結果を示した。しかしながら、アミノ酸置換によるモノマー/ダイマー構造形成能や熱安定性、触媒への影響の違いから、form II RuBisCO と RLP における Lys134 の構造維持や触媒能発揮への寄与は酵素によ

り異なることが示唆された。BsRLP の Lys134 は主に構造安定に寄与していることが明らかとなった。一方で、RrRuBisCO の Lys134 は構造維持にはほとんど関与せず、carboxylase 反応の促進に大きく寄与していることが明らかとなった。これらの結果から、Lys134 の機能は両酵素で多様に進化していることが明らかとなった。

第3章

RuBisCO superfamily における His294 の機能解析

3-1. 序論

BsRRLP (および *G. kaustophilus* RLP) は Lys175、Lys201、Asp203、Glu204 を活性中心に保持するだけでなく、Lys201 のカルバメート化や Mg^{2+} を補因子に用いるなど、RuBisCO と極めてよく似た活性中心を有する (Table 3-1, Fig. 3-1, Tamura et al. 2009)。さらに、アミノ酸置換から、BsRRLP のこれらの触媒残基が DK-MTP-1-P のエノール化反応の触媒に必須であることが示唆された (Imker et al. 2007; Saito et al. 2009)。これらのことから、BsRRLP のエノール化反応は RuBisCO の RuBP エノール化の触媒機構に類似していると予想される。RuBisCO の反応機構はよく研究されており、RuBP エノール化はカルバメート化 Lys201 による C3 のプロトン引き抜きにより開始されると考えられている。このとき、His294 側鎖の 3 位窒素は Lys201 のプロトン化したカルバメートと相互作用することでカルバメートの塩基性を向上させていると考えられている (Harpel et al. 1998)。RuBP のエノール化反応は可逆であるため、Lys201 のカルバメートが引き抜いたプロトンが再び RuBP の C3 に戻らないように His294 により安定化していると予想されている。一方で、BsRRLP は DK-MTP-1-P の C1 プロトンを引き抜くことでエノール化反応を触媒するが (Ashida et al 2003, 2005)、その詳細な反応機構は明らかにされていない。

エノール化反応しか行わない BsRRLP に対し、RuBisCO は *cis*-enediol 型 RuBP にガス基質である CO_2 を付加できる (Fig. 1-2, 1-7)。さらに、 CO_2 を *cis*-enediol 型 RuBP の C2 に選択的に付加するには、C3 ヒドロキシル基を脱プロトン化する必要がある (Fig. 1-7, Lu et al. 1992)。この脱プロトン化を触媒する塩基としてカルバメート化 Lys201 (Fig. 1-7 の IIa→IIIa, Cleland et al. 1998; Harpel et al. 1998) と His294 (Fig. 1-7 の IIb→IIIb, Taylor and Andersson 1997; Roy and Andrews 2002) の 2 つの残基候補が挙げられている。RuBisCO の CO_2 固定機構は不明な点が多いが、上記の脱プロトン化を触媒する塩基候補 (Lys201 のカルバメート酸素もしくは His294 のイミダゾール窒素) を取り込んだ CO_2 固定反応機構が 2 つ提唱されている。(1) カルバメート化 Lys201–His294 仮説 (Cleland et al. 1998; Harpel et al. 1998) では、カルバメート化 Lys201 が *cis*-enediol 型 RuBP の C3 ヒドロキシル基を脱プロトン化した後、C2 に CO_2 が付加される。これとほぼ同時に、His294 の塩基触媒により水分子が C2 を求核攻撃し、水和反応が起こる。一方、(2) His294–His327 仮説 (Taylor and Andersson 1997; Roy and

Andrews 2002) では、(1)と比較して *cis-enediol* 型 RuBP の C3 ヒドロキシル基の脱プロトン化を His294、水和反応を His327 が行う。(1)(2)どちらが正しいにせよ、His294 は *cis-enediol* 型 RuBP の C3 ヒドロキシル基もしくは水分子の脱プロトン化を触媒する塩基として、CO₂ 固定反応を正の方向に促進する働きが予想されている。このようにカルボキシル化により生成した中間体である 2-carboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisphosphate (CKABP) は、水和、炭素-炭素結合の開裂、立体特異的プロトン化を経て 2 分子の PGA に変換される。

興味深いことに、RuBisCO における RuBP のエノール化および CO₂ 固定に必須の触媒残基である His294 は、これらの反応を行わない BsRLP や *G. kaustophilus* RLP にも保存されていた (Table 3-1, Fig. 3-1, Tamura et al. 2009)。このことから、His294 の BsRLP における機能に興味を持たれた。

Table 3-1. RuBisCO superfamily における RuBisCO carboxylase 反応触媒必須残基の部分アライメント

		Active site residues						
	Organisms	123	175	201	203	204	294	327
α 1	<i>B. subtilis</i>	K101	K150	K176	D178	E179	H267	H301
α 1	<i>G. kaustophilus</i>	K98	K147	K173	D175	E176	H264	L298
α 1	<i>M. aeruginosa</i>	N85	K131	K157	D159	E160	H248	L282
α 2	<i>R. rubrum</i>	N87	K137	K162	D164	H165	H252	I280
β	<i>M. loti</i>	G98	K150	K176	D178	E179	H266	Q299
γ	<i>C. tepidum</i>	E119	K172	K198	D200	E201	H287	I320
I	<i>S. oleracea</i>	N123	K175	K201	D203	E204	H294	H327
II	<i>R. rubrum</i>	N111	K166	K191	D193	E194	H287	H321
III	<i>T. kodakaraensis</i>	N111	K163	K189	D191	E192	H281	H315

最上段にはハウレンソウ RuBisCO L のアミノ酸配列番号を示した。その他の RuBisCO や RLP は固有のアミノ酸配列番号を示している。アライメント作製に用いたアミノ酸配列の推定に用いた遺伝子は以下の通り。*Bacillus subtilis* str. 168 (NP_389242), *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (YP_146806), *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (CAJ43366), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (form II, YP_427487 ; RLP- α 2, YP_427085), *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (BAB53192), *Chlorobium tepidum* TLS (NP_662651), *Spinacia oleracea* (NP_054944), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (YP_184703)。

G. kaustophilus RLP (2OEM)

Spinach RuBisCO (8RUC)

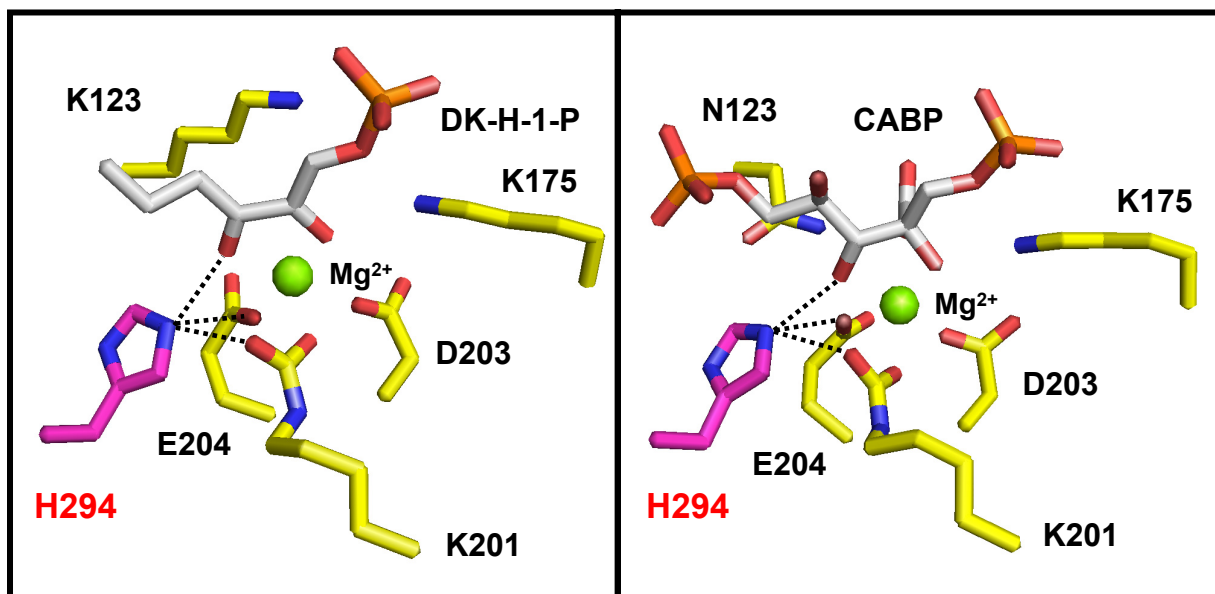


Figure 3-1. RLPとRuBisCOの活性中心におけるHis294に関する相互作用の比較

G. kaustophilus RLP (left panel)およびホウレンソウRuBisCO (right panel) の活性中心。原則として両活性中心の表記はFig. 1-6に従った。本章で扱うHis294は紫のスティックで示した。活性中心に示した破線は水素結合候補を示す。ただし、ホウレンソウRuBisCO中のHis294とLys201カルバメート酸素間には水素結合を形成できる距離にない (>3.5 Å) が破線を描いた。

3-2. 材料と方法

※ 特に断りがない限り、実験操作は第 2 章 2-2 に従って行った

点変異の導入

PCR 法を用いた His294 への点変異導入および選抜法は第 2 章 2-2 に従った。ただし、PCR の熱サイクルプログラムのうち伸長反応 (68 °C) を 7 分間に変更した。点変異を導入するためのプライマーセットをフォワード、リバースの順に記した:

Primer name	Primer sequence (5'-3')
H294Q-forward (BsRLP)	GATTATGGCGCAACCAGCAGTGAG
H294Q-reverse (BsRLP)	GGAAGTGGGATTTTCAGGATCTTCTGC
H294N-forward (BsRLP)	GATTATGGCGAATCCAGCAGTGAG
H294N-reverse (BsRLP)	GGAAGTGGGATTTTCAGGATCTTCTGC
H294A-forward (BsRLP)	GATTATGGCGGCTCCAGCAGTGAG
H294A-reverse (BsRLP)	GGAAGTGGGATTTTCAGGATCTTCTGC

BsRLP の発現および精製、PAGE 解析

BsRLP 野生型、H294Q、H294N、H294A は *E. coli* BL21 (DE3)を用い、ampicillin を含む LB 培地において 25 °C で培養したものを用いた。すべての BsRLP の精製および PAGE 解析は第 2 章 2-2 に従った。

酵素活性の測定-

BsRLP の DK-MTP-1-P enolase 活性測定は、第 2 章 2-2 と同じく Saito et al. 2009 に従って行った。ただし、活性化における Mg^{2+} および CO_2 要求性は、50 mM Tris-HCl (pH 8.2) に $MgCl_2$ (20 mM もしくは 1 mM) および $NaHCO_3$ (25 mM もしくは非添加) を加えた溶液を用いて解析した。 Mg^{2+} および CO_2 濃度の組み合わせは以下の通り; Condition A (20 mM Mg^{2+} , 25 mM $NaHCO_3$ (197 μ M CO_2), Full activation)、Condition B (1 mM Mg^{2+} , 25 mM $NaHCO_3$ (235 μ M CO_2))、Condition C (20 mM Mg^{2+} , no $NaHCO_3$ added)、Condition D (1 mM Mg^{2+} , no $NaHCO_3$ added)。すべての BsRLP を condition A-D いずれかの条件で 25 °C、20 分間プレインキュベーションした後、35 °C、プレインキュベーションと同じ $MgCl_2$ および $NaHCO_3$ 濃度で enolase 活性を測定した。また、酵素学的パラメータ (Table 3-3) は、BsRLP を condition A で 25 °C、20 分間プレインキュベーションさせた後、35 °C で測定した。

3-3. 結果

RLP と RuBisCO における活性中心の比較

RLP において、His294 と相互作用するアミノ酸残基候補を探索した。活性化型 BsRLP の立体構造は明らかでないため、活性化型および基質アナログである 2,3-diketo-5-hydroxypentane-1-phosphate (DK-H-1-P) を結合した活性化型 *G. kaustophilus* RLP の構造を用いた。その結果、His294 イミダゾール環の 3 位窒素は Lys201 のカルバメート酸素、Glu204 側鎖のカルボキシル酸素、および DK-H-1-P の C3 ケト酸素と水素結合を形成しうることを示唆された (Fig. 3-1, Table 3-2)。同様に、form I ホウレンソウ RuBisCO についても検討したところ、His294 は Glu204 側鎖のカルボキシル酸素および CABP (もしくは RuBP) の C3 ヒドロキシル基と水素結合することが示唆された。しかし、ホウレンソウ RuBisCO における His294 とカルバメート化 Lys201 の距離は *G. kaustophilus* RLP の場合よりも遠く ($>3.4 \text{ \AA}$)、その相互作用は比較的弱いと予想された (Table 3-2)。

予想される 3 本の水素結合から、BsRLP における His294 の 3 つの役割が予想された。(1) Lys201 のカルバメート酸素を安定化する。(2) His294 はカルバメート化 Lys201 と Glu204 との相互作用を用いて Mg^{2+} 配位部位を形作るとともにその静電バランスを維持している。(3) His294 は基質である DK-MTP-1-P と水素結合を形成し基質親和性を高めている。そこで、以降の実験において、BsRLP の His294 の変異酵素を用いて酵素学的解析および活性化について検証した。

BsRLP 野生型および His294 変異酵素の精製と PAGE 解析

BsRLP における His294 の機能を解析するため、ヒスチジン残基のイミダゾール窒素と同じく水素結合能を有するグルタミンおよびアスパラギン、さらに水素結合能を欠く無極性のアラニンを 294 番目に導入した変異酵素をデザインした。Ni affinity クロマトグラフィー、His-tag の切断およびゲルろ過クロマトグラフィーにより、大腸菌抽出液から野生型および変異 RLP の精製を行った。SDS-PAGE により全ての変異 BsRLP が単一バンド(約 46.0kDa)として確認できたことから、変異 BsRLP は野生型と同じく全長の翻訳が行われタンパク質分解を受けていないことが示唆された (Fig. 3-2 下段)。また、native-PAGE においてすべての変異 BsRLP は野生型とほぼ同等の移動度を示したことから、安定なホモダイマーを形成していることがわかった (Fig. 3-2 上段)。他の RLP と比較して、H294Q の移動度がやや異なるのは、変異による側鎖の特性変化が原因であると予想される。

Table 3-2. His294 と活性中心残基、2 価金属イオンとの距離

Distance (Å) ^a from imidazol NE2 to		K201	K201	E204	ligand	Mg ²⁺	
		OX	NZ	OE	C3 O	(Ca ²⁺)	
	Organisms	PDB code (ligand) ^b					
α1	<i>G. kaustophilus</i>	2OEK (—)	2.84	4.12	3.18	-	4.63
α1	<i>G. kaustophilus</i>	2OEM (DK-H-1-P)	3.25	4.62	2.96	2.77	3.83
I	<i>S. oleracea</i>	1AUS (—)	3.43	3.97	3.04	-	4.08
I	<i>S. oleracea</i>	1RXO (Ca ²⁺ , RuBP)	3.75	4.25	3.07	3.08	4.21
I	<i>S. oleracea</i>	8RUC (CABP)	3.56	4.86	2.97	2.93	4.00
II	<i>R. rubrum</i>	2RUS (—)	4.00	5.13	3.24	-	4.67

^a2OEK および 1AUS、1RXO、8RUC、2RUS について、それぞれ 2、4、4、4、2 つのサブユニットの平均距離を示した。ただし、2OEM は基質アナログの結合しているサブユニット A のみを用いた。

^bすべての RLP および RuBisCO は活性中心にカルバメート化リジンと Mg²⁺を有する活性化型である。ただし、1RXO は Mg²⁺の代わりに Ca²⁺を配位している。2OEM および 1RXO、8RUC はそれぞれ DK-H-1-P、RuBP、CABP を結合している。

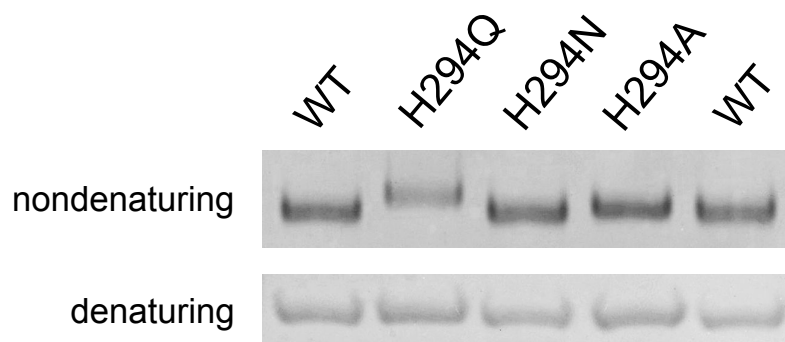


Figure 3-2. 精製した野生型およびHis294変異BsRLPのnative-およびSDS-PAGE解析

それぞれのBsRLPをnative- (上段, 10%アクリルアミドゲル, 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) もしくはSDS-PAGE (下段, 12.5%アクリルアミドゲル, 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) に供した。ゲルはCoomassie brilliant blue R-250により染色した。

BsRRLP の活性化における CO₂、Mg²⁺の要求性

RuBisCO 同様、BsRRLP は、CO₂ による Lys201 のカルバメート化と Mg²⁺ の配位により活性化することで最大の活性を發揮できる (Imker et al. 2007; Saito et al. 2009)。RRLP の立体構造解析から、His294 は Lys201 のカルバメート酸素および Glu204 のカルボキシル酸素と水素結合を形成することが示唆されたため (Fig. 3-1, Table 3-2)、His294 変異酵素は活性化に必要とする CO₂ や Mg²⁺ の要求性が変化している可能性が考えられた。そこで、プレインキュベーションする CO₂ および Mg²⁺ 濃度を変化させたときの DK-MTP-1-P enoalase 活性を調べた (Fig. 3-3)。MgCl₂ 濃度を 20 mM に固定したとき、H294N 変異酵素の活性は 25 mM NaHCO₃ でプレインキュベートすると最大を示した (data not shown)。以降の実験は、最大の活性を發揮できる 25 mM NaHCO₃、20 mM MgCl₂ (condition A) で野生型および His294 変異酵素を活性化 (full activation) させたときの活性を基準とした。野生型 BsRRLP は、condition A と比較して、Mg²⁺ 限定条件 (condition B) および CO₂ 非添加条件 (Condition C, D) でもほとんど活性の増減が見られなかった (Fig. 3-3)。このことは、野生型 BsRRLP が通常大気と平衡の溶液中の溶存 CO₂ 濃度 (約 10 μM) でほぼ全ての酵素が活性化されることを示している。驚くべきことに、Mg²⁺ 限定条件 (condition B) において、全ての His294 変異酵素の活性はそれぞれの最大活性の 57–89% まで低下した (Fig. 3-3)。また、この傾向は CO₂ 非添加条件 (Condition C, D) で顕著に現れ、His294 変異酵素の活性は condition A を基準とした 22–9% まで劇的に低下した。これらの結果から、His294 変異酵素の活性發揮には、野生型よりも高濃度の CO₂ および Mg²⁺ を必要とすることが明らかとなった。

活性化した野生型および His294 変異 BsRRLP の酵素学的パラメータ

次に、25 mM NaHCO₃、20 mM MgCl₂ で full activation させた野生型および His294 変異酵素について酵素学的パラメータを解析した (Table 3-3)。H294 変異酵素の k_{cat} は野生型の 2–8% まで低下した。この原因として、導入したアミノ酸側鎖の静電的特性よりも側鎖の長さが大きな影響を与えたと考えられた。特に、側鎖の大きい H294Q の k_{cat} は野生型の 2% という劇的な低下をもたらした。これに対して、側鎖の小さい H294N や H294A は、野生型の 8% 程度の k_{cat} を示した。一方、His294 変異酵素の DK-MTP-1-P に対する K_m は、野生型と比較して劇的な変化は見られなかったものの、側鎖の特性が顕著に現れた。イミダゾール窒素と同じく水素結合能を有する H294N、H294Q はそれぞれ野生型の 2.2 倍、2.6 倍の K_m 上昇が見られた。また、DK-MTP-1-P の C3 ケト酸素との水素結合能を失った H294A は、 K_m 値が野生型の 3 倍まで増加し、3 つの His294 変異酵素のなかで最も基質親和性が低下した。

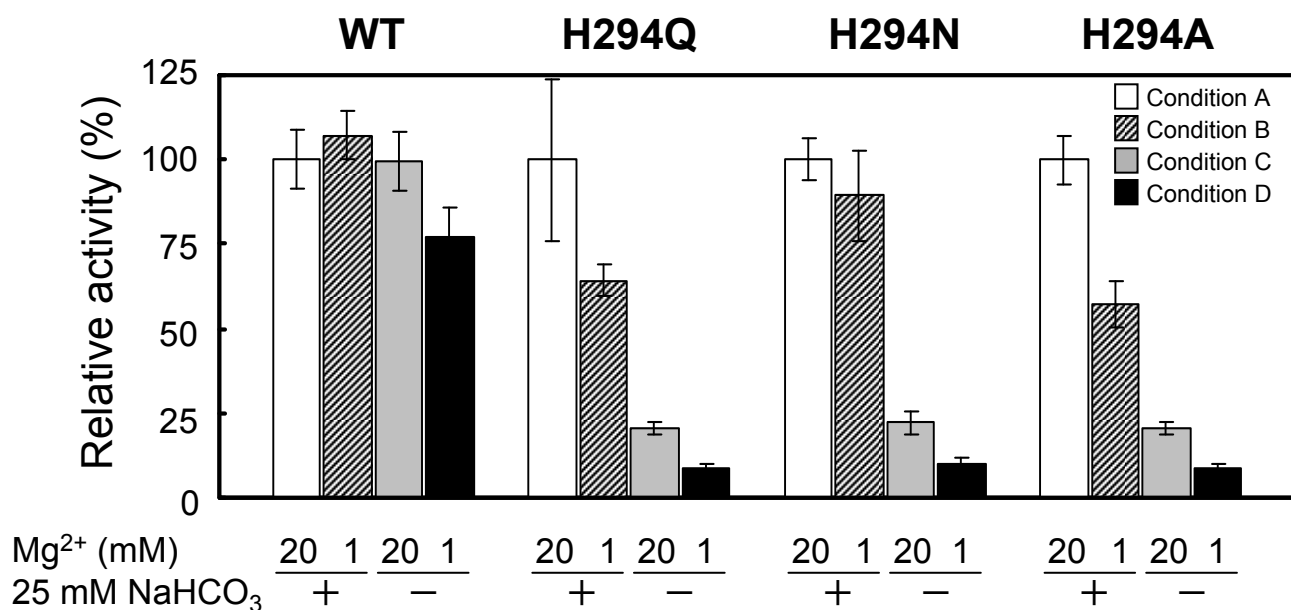


Figure 3-3. CO₂、Mg²⁺濃度がHis294変異酵素のエノール化活性に与える影響

Condition A (20 mM Mg²⁺, 25 mM NaHCO₃ (197 μM CO₂), Full activation)、Condition B (1 mM Mg²⁺, 25 mM NaHCO₃ (235 μM CO₂))、Condition C (20 mM Mg²⁺, no NaHCO₃ added)、Condition D (1 mM Mg²⁺, no NaHCO₃ added)。酵素をCondition A-Dに示す条件で25°C、20分プレインキュベーションした。その後、プレインキュベーションした酵素の活性を35°Cで測定した。Condition Aで活性化した野生型、H294Q、H294N、H294Aのエノラーゼ活性 (それぞれ102, 1.6, 6.3, 6.0 μmol/min/mg protein)を基準とした。

Table 3-3. 野生型および His294 変異 BsRLP の酵素学的パラメータ

Enzyme	K_m^a (μM)	k_{cat}^b (s^{-1})	k_{cat}/K_m^b ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Wild type	16 ± 4	78	4.9×10^6
H294Q	42 ± 8	1.7	4.0×10^4
H294N	35 ± 6	6.3	1.8×10^5
H294A	48 ± 6	5.8	1.2×10^5

^a それぞれの値は独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD を示す。

^b k_{cat} は、野生型および H294Q、H294N、H294A の V_{max} (105 ± 10 , 2.3 ± 0.2 , 8.5 ± 0.4 , $7.9 \pm 0.4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) を元に算出した。

3-4. 考察

His294 は Lys201 のカルバメートの安定化に寄与

これまでに本研究室において、野生型 BsRLP のエノラーゼ活性は CO₂ とのプレインキュベーションにより上昇することを報告した (Saito et al. 2009)。しかし、CO₂ 濃度を 1.8 μM から 80 μM まで上昇させても 20% 程度の活性上昇にとどまったことから、BsRLP における Lys201 のカルバメート化とエノラーゼ活性の関係には議論の余地が残されていた。しかし今回の結果から、BsRLP の His294 変異は活性化過程における CO₂ や Mg²⁺ の要求性に劇的な変化をもたらすことが明らかとなった。特に、Mg²⁺ 限定条件 (1 mM) である condition D とこの条件に 25 mM NaHCO₃ (235 μM CO₂) が加わった condition B を比較した B/D を算出すると、BsRLP H294Q/N/A の活性が 6.7–8.9 倍に上昇していることがわかる (Fig. 3-3)。これに対し、野生型の B/D では 1.4 倍の活性上昇にとどまった。このことから、CO₂ 濃度の上昇は His294 変異酵素のエノラーゼ活性の劇的な上昇に重要であることが明らかとなった。

次に、CO₂ と同じく活性化の重要な因子である Mg²⁺ 濃度の増加にともなうエノラーゼ活性の変化を評価した (Fig. 3-3)。NaHCO₃ 無添加条件 (CO₂ 濃度は約 10 μM) において Mg²⁺ 濃度を 1 mM (condition D) から 20 mM (condition C) に変化させたときの C/D を算出すると、His294 変異酵素では 2.2–2.4 を示した。このことは、Mg²⁺ 濃度が 1 から 20 mM になると、His294 変異酵素の活性が約 2 倍になることを示す。また、野生型では 1.3 倍の上昇にとどまった。C/D の活性上昇は B/D よりもやや小さかったことから、His294 は Mg²⁺ よりも主にカルバメート化 Lys201 の安定化に関与すると予想される。

同様に、20 mM という飽和 Mg²⁺ 条件における NaHCO₃ 添加の有無を比較した A/C の値は、野生型でほとんど変化が見られなかったのに対し、His294 変異酵素の活性のみ 4.5–4.9 倍に上昇した (Fig. 3-3)。以上のことから、His294 は Lys201 のカルバメート化状態を安定化している可能性が考えられた。*G. kaustophilus* RLP の立体構造から予測されるように、BsRLP の His294 はカルバメート化 Lys201 のカルボキシ基と水素結合を形成できると予想される (Fig. 3-1, Table 3-2)。そして、変異導入により His294 が本来形成するはずのカルバメート化 Lys201 との相互作用が妨げられ、活性化における CO₂ 要求性が変化したと考えられる。

Mg²⁺ 結合部位の静電バランスの維持

G. kaustophilus RLP の His294 イミダゾール環は Glu204 のカルボキシ基と相互

作用を形成しうる 3.3 Å 以内に存在する (Table 3-2)。His294 と Glu204 側鎖との距離は、RLP だけでなく form I および II RuBisCO においても 3.3 Å 以内にあることから、相互作用が存在すると予想される。また、リガンド結合の有無に関わらず His294 と Glu204 の距離はほぼ一定にあることから、常に存在する相互作用であると予想される (Table 3-2)。Glu204 はカルバメート Lys201 および Asp203 と RuBisCO motif と呼ばれる Mg^{2+} 結合部位を形成することで、触媒に必須の 2 価金属イオンの配位に重要な役割を担っている。これらのことから、His294 は RuBisCO motif を構成するカルバメート Lys201 や Glu204 と相互作用を形成することで Mg^{2+} 結合部位の安定な形成に寄与していることが示唆された。実際、 Mg^{2+} 濃度が 1 mM から 20 mM に増加したときの A/B および C/D を算出すると、His294 変異酵素のエノラーゼ活性は 1.1–2.4 倍の上昇が見られたことから、His294 は活性化における Mg^{2+} の親和性にも少なからず関与することが示唆された。RuBisCO の His294 は Lys201 のカルバメート酸素および Glu204 側鎖のカルボキシ酸素と相互作用することで、 Mg^{2+} 結合のための静電バランスの維持に大きく貢献すると予想されている (Lu et al. 1992; Harpel et al. 1998)。そして、RuBisCO よりも強い His294 とカルバメート Lys201 の相互作用をもつと思われる RLP の場合においても Mg^{2+} 結合のための静電バランスの維持に関わるとと思われる。ただし、高濃度の Mg^{2+} は活性化に必要な CO_2 に対する K_m 値を低下させることが報告されている (Lorimer et al. 1976)。よって、Fig. 3-3 condition A および B において Mg^{2+} 濃度の増加にともなう活性上昇が観察されたが、この知見を考慮すると His294 の Mg^{2+} 親和性への関与を完全に証明できたわけではない。実際に His294 が Mg^{2+} の親和性に関与することを証明するには、His294 変異酵素の Mg^{2+} に対する K_m を野生型と比較するという更なる解析が必要である。

RLP および form I、II RuBisCO における His294 の機能的差異

活性化に要する CO_2 濃度は、個々の RLP や RuBisCO によって多様であり、相当の差異が見られる。野生型 BsRLP は Lys201 のカルバメート化に必要な CO_2 濃度が低く、1.8 μM CO_2 において、完全に活性化されていると考えられる 80 μM CO_2 下での活性の約 80%を示す (Mg^{2+} が飽和している 1 mM 条件) (Saito et al. 2009)。このことから、BsRLP Lys201 のカルバメート化に要する CO_2 濃度は、ホウレンソウ RuBisCO と比べて格段に低い (Lorimer et al. 1976)。実際、ホウレンソウ RuBisCO を葉緑体内の CO_2 濃度 (8 μM) に近い 7 μM CO_2 で 20 分活性化させたとき (Mg^{2+} が飽和している 20 mM 条件)、1/2 以下の酵素しかカルバメート化することができない。ではなぜ BsRLP とホウレンソウ RuBisCO は Lys201 のカルバメート化のための CO_2 親和性が異なるのだら

うか？ 答えは両者の His294 イミダゾール窒素とカルバメート化 Lys201 のカルボキシル酸素の距離の違いで説明することができる。RLP と RuBisCO の基質 (アナログ) 結合型の活性中心を比較すると、活性化において高い CO₂ 親和性を示す RLP は His294 側鎖とカルバメート化 Lys201 の距離が 3.25 Å である。一方、ホウレンソウ由来活性化型 RuBisCO の RuBP、CABP 結合型は、それぞれ 3.75、3.56 Å と距離が長いことから、RLP の場合よりも弱い相互作用しか持たないと予想される (Table 3-2)。さらに、His294 とカルバメート化 Lys201 の距離は、リガンドが結合していない活性化型 RLP と RuBisCO で顕著な差が表れる。RLP の His294 とカルバメート化 Lys201 は 2.84 Å にあるのに対し、ホウレンソウ RuBisCO では 3.43 Å となり、両者の差は 0.59 Å にまで広がった。このように、His294 側鎖と Lys201 のカルバメート酸素の距離は RLP とホウレンソウ RuBisCO 間で 0.31–0.59 Å の差が見られたため、この距離の違いがカルバメートの安定化に多大な影響を与えていると予想された。植物 RuBisCO においてカルバメート安定化のための His294 の寄与が考えられるが、両者の距離は RLP と比べて遠い。これらのことから、植物 RuBisCO の His294 がカルバメート安定化に与える影響は小さいと予想される。

植物 RuBisCO の活性化状態は光により制御されることが知られている。光照射によるチラコイド内腔へのプロトン流入と協調して、チラコイド内腔の Mg²⁺がストロマに排出される。このときストロマの Mg²⁺濃度が 1~3 mM から 3~6 mM に上昇することで、RuBisCO の活性化が促進される。このように、植物 RuBisCO は葉緑体内の環境により活性化状態が厳密に制御されている。また、植物 RuBisCO は通常大気平衡下の葉緑体内の低 CO₂ 濃度下において、RuBisCO の活性化に RuBisCO activase を必要とする (Spreitzer and Salvicci 2002; Portis 2003; Hartman and Harpel 1994)。アラビドプシス RuBisCO activase 欠損株は、通常大気条件下では光合成を行うことができず枯死に至ることから、RuBisCO activase は植物の生存にとって必須である。一度 RuBP や PGA などの各種糖リン酸が非活性化型 RuBisCO に結合するとデッドエンドの不活性化型となる。RuBisCO activase は、ATP のエネルギーを用いて非活性化型 RuBisCO に結合した糖リン酸を解離させることで、再度 RuBisCO を活性化のサイクルに戻すことができる。このように、植物葉緑体は RuBisCO activase を用いた RuBisCO の活性化状態を制御する機構を備えている。一方で、ゲノム上に RuBisCO activase のような活性化タンパク質をコードする遺伝子をもたない *B. subtilis* は、活性化における CO₂ 親和性を向上させることで非活性化型の RLP 量をできるだけ減らして、糖リン酸による活性阻害を防いでいると考えられる。*B. subtilis* 生体内の CO₂ 濃度が 10 μM であると仮定すると、少なくとも 80%以上の RLP が活性化状態にあると予想されるため

(Saito et al. 2009)、生体内に存在する不活性化型酵素は極めて少ないと予想される。

RLP や form I RuBisCO とは対照的に、form II 活性化型 RrRuBisCO の His294 側鎖はカルバメート Lys201 とは 4 Å も離れて位置することから、両者の相互作用は非常に弱いと予想される (Table 3-2, Lundqvist and Schneider 1991)。また、RrRuBisCO の活性化に必要な CO₂ の K_m 値は植物 RuBisCO と比較して高いことが知られている (Christeller and Laing 1978)。つまり、RrRuBisCO は Lys201 のカルバメートを安定化するための His294 との相互作用が弱いために、カルバメート化のための CO₂ に対する親和性が低く、Lys201 のカルバメート化に高濃度の CO₂ を必要とすると考えられる。活性化に必要とする CO₂ の K_m を考慮すると、form II RuBisCO の活性化状態は His294 とカルバメート化 Lys201 の距離論によって説明できる。ただし、この距離論と異なる報告として、RrRuBisCO の H294N 変異は活性化にほとんど影響を与えないことが知られている (Lorimer et al. 1987; Gutteridge et al. 1988)。しかし、この実験は高濃度の CO₂ および Mg²⁺ 存在下での活性化状態を示しているのみで、より正確に活性化状態を評価できる低 CO₂ (もしくは Mg²⁺) 濃度での解析は行っていない。このように、form II RuBisCO の活性化に関する知見はとぼしいため、議論の余地が残っている。

エノール化反応における His294 の役割

His294 が活性化にのみ寄与しているのであれば、完全活性化状態と考えられる高 CO₂、Mg²⁺ 濃度下において、His294 変異酵素は野生型とほぼ同等のパラメータを示すはずである。しかし、野生型と比較して、変異酵素の *k*_{cat} は 92–98% の劇的な低下が観察された (Table 3-3)。それでは、BsRLP の His294 は DK-MTP-1-P エノラーゼ反応の触媒にどのように関わっているのだろうか？

His294 の機能は RuBisCO でよく研究されている。RuBisCO において His294 は RuBP の C3 プロトンを直接引き抜く塩基ではない。しかし、His294 は C3 プロトンを引き抜いたカルバメート Lys201 との相互作用を介してカルバメートの塩基性を高め、プロトンが再び RuBP の C3 へ戻らないように安定化していると考えられている (Harpel et al. 1998)。この仮説を裏付ける実験として、form II RrRuBisCO の His294 変異酵素を用いた解析がなされている (Lorimer et al. 1987; Gutteridge et al. 1988; Harpel et al. 1998)。RrRuBisCO His294Q や H294N は、野生型と比較すると carboxylase の初発段階である RuBP のエノール化活性が 0.1% まで低下する。この活性低下は、おそらく His294 への変異によりカルバメート Lys201 の塩基性が低下し、RuBP の C3 プロトンの引き抜きもしくはその後のカルバメートの脱プロトン化が阻害された結果であると予想される。これらのことから、RuBisCO の His294 はカルバメート化 Lys201 の塩

基性を向上させることで、RuBP の C3 プロトン引き抜きに貢献していると予想される。

一方、BsRLP の DK-MTP-1-P エノラーゼ反応における C1 プロトンを引き抜く触媒塩基は同定されておらず、その候補としてカルバメート化 Lys201 もしくは Lys123 の働きが示唆されるものの、その反応機構の全体像は明らかではない。立体構造からも、RLP の His294 は、基質である DK-MTP-1-P の C1 炭素および C2 酸素までそれぞれ 6.46、5.19 Å の距離があり、直接 C1 プロトンの引き抜きや C2 酸素へのプロトン受け渡しを触媒する塩基として働くとは考えにくい。BsRLP の His294 変異により DK-MTP-1-P エノラーゼ活性が低下した原因として 2 つの可能性が考えられる。第一に、BsRLP の His294 は C1 プロトンを引き抜いた後のカルバメート化 Lys201 と相互作用する可能性が考えられた。RuBisCO と類似するこの機構では、カルバメート化 Lys201 が引き抜いた C1 プロトンが再び基質の C1 に移動しないように、His294 がプロトンを引き寄せると予想される。仮にこれが正しいとするならば、BsRLP His294Q および His294N は、RrRuBisCO の H294N のようにエノール化活性が 1/1000 程度まで低下するはずである。しかし、BsRLP の H294Q や H294N は野生型の 2–8% のエノラーゼ活性を保持していることから (Table 3-3)、C1 プロトンの引き抜きにカルバメート化 Lys201 が関与している可能性は低いと考えられる。第二に、His294 の変異が活性中心の静電バランスやひずみを引き起こした可能性が考えられる。His294 はカルバメート化 Lys201 および Glu204 と相互作用することで、Mg²⁺配位に必須の RuBisCO motif の形成に貢献すると予想される。そして、His294 への変異はカルバメート化 Lys201 および Glu204 との相互作用を部分的に妨げ、Mg²⁺結合部位を含む活性中心の静電バランスが崩れたと予想される。

His294 と基質親和性

エノール化反応を促進する以外に BsRLP の His294 はどのような役割を担っているのだろうか？ 立体構造から、エノール化以外の機能として、His294 は基質である DK-MTP-1-P の結合に関わると示唆される。Table 3-2 に示すように、*G. kaustophilus* RLP の His294 は基質アナログである DK-H-1-P の C3 ケト酸素と 2.77 Å の距離にあり、基質との間に水素結合を形成することが可能である。実際に His294 に変異を導入すると、基質との水素結合形成能を完全に失った H294A は K_m 値が野生型の 3 倍まで上昇した (Table 3-3)。加えて、水素結合形成能を部分的に保持している H294N や H294Q は、野生型に劣るものの H294A より基質親和性が向上した。よって、His294 への変異は、カルバメート化 Lys201 や Glu204 との相互作用だけでなく、基質である

DK-MTP-1-P との水素結合も妨げていると考えられる。

一方、form I RuBisCO の His294 も CABP (もしくは RuBP) の C3 ヒドロキシ酸素に近接する (<3.1 Å) ことから、RuBP の基質親和性および遷移状態の安定化への関与が示唆された (Table 3-2, Andersson 1996; Taylor and Andersson 1997)。このことから、RLP および RuBisCO の His294 は共通して基質親和性の向上に寄与していると予想される。

TIM barrel ファミリータンパク質の活性中心に存在するカルバメートリジン残基とヒスチジン残基の保存性

RuBisCO や RLP は活性中心にカルバメート化リジンを有するユニークな酵素である。His294 は、BsRLP の属する RLP グループ $\alpha 1$ や form I, II RuBisCO だけでなく、form III RuBisCO や残りの RLP グループ ($\alpha 2$, β , および γ) で一次配列上完全に保存されていた (Table 3-1, Tabita et al. 2007; Ashida et al. 2008)。また、His294 のイミダゾール窒素と相互作用する相手残基である Lys201 や Glu204 もほぼ完全に保存されている。唯一、新規のメチオニン代謝で働く RLP グループ $\alpha 2$ (*R. rubrum* RLP など) は 204 番目のアミノ酸残基がヒスチジンに置換していた (Imker et al. 2008)。また、一次配列だけではなく、立体構造が明らかにされているすべての RuBisCO や RLP は、活性中心に His294 および Lys201、Glu204 を保持していた (Andersson and Backlund 2008; Tabita et al. 2007; Kitano et al. 2001; Li, 2005)。これらのことから、His294 は RuBisCO superfamily で配列・構造上ほぼ完全に保存されていることがわかった。このように保存された His294 は、各々の生体内環境に応じて近接する Lys201 のカルバメート状態を制御していると予想される。

カルバメートリジンに近接するヒスチジン残基の存在は、RuBisCO や RLP に限られた話ではない。RuBisCO superfamily は $(\beta/\alpha)_8$ -barrel 構造を有する TIM barrel ファミリーに属するが、このファミリーには他にもカルバメート化リジンを利用する酵素が存在する。カルバメート化リジンを用いて活性中心を形成する酵素として urease や phosphotriesterase が知られている (Nagano et al. 2002; Sterner and Hocker 2005)。両酵素の活性中心はカルバメート化リジンと 4 つのヒスチジンで構成され、これら 5 アミノ酸残基の側鎖に 2 価金属イオン (Ni^{2+} もしくは Zn^{2+}) を結合することで活性化型となる (Ha et al. 2001; Benning et al. 1995)。興味深いことに、urease および phosphotriesterase のヒスチジン側鎖はリジンのカーバメート酸素と水素結合を形成できる位置に存在した (Sterner and Hocker 2005)。これらのことから、ヒスチジン側鎖を用いたカーバメート化リジンの安定化機構は、RuBisCO superfamily だけではなく、urease や

phosphotriesterase など TIM barrel ファミリーの一部の酵素に普遍的に存在することが予想された。そして、自然は生体内の環境に合わせてカルバメートの安定性や状態を制御することで、酵素に必要な活性を与えていると予想される。

第4章 総括

近年のゲノム・メタゲノム解析の爆発的な進展により、RuBisCO ラージサブユニットのアミノ酸配列に相同性を示す RLP が多数報告されてきた。しかしその一方で RLP の構造や機能に関する知見は乏しく、2003 年に蘆田らが BsRLP の機能を同定するまでその機能の手がかりを待たなければならなかった。続いて 2005 年には、初めて RLP の構造解析に成功し、グループ γ に属する緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* RLP の立体構造が明らかとなった (Li et al. 2005)。驚くべきことに、*C. tepidum* RLP の構造は RuBisCO のそれと極めてよく似ていたことから、両者の構造、機能、進化的な関連性が強く示唆された。翌 2006 年から 2007 年には RLP の機能が次々と同定され、*B. subtilis* と近縁の *G. kaustophilus* やシアノバクテリアの一種である *M. aeruginosa* の RLP、は、BsRLP と同じエノール化反応を触媒することが明らかとなった (Carre-Mlouka et al. 2006; Imker et al. 2007)。

そして、2009 年、転機を迎えることになる BsRLP に関する 2 つの報告がなされた。一つ目に、BsRLP の触媒反応機構に関する知見が報告された (Saito et al. 2009)。これによれば、BsRLP は RuBisCO にも保存されている触媒残基を用いて自身のエノール化反応を触媒していることが示唆された。そして二つ目に、長年謎であった BsRLP の立体構造が紐解かれ、その活性中心は RuBisCO と極めてよく似ていることが明らかとなった (Tamura et al. 2009)。この 2 つの知見により、BsRLP の構造・機能両面からの解析が可能となっただけでなく、RuBisCO との比較により RuBisCO superfamily を総括した進化的なアプローチが可能となった。しなしながら、RLP と RuBisCO の構造-活性相関の比較研究は始まったばかりであり、まだまだ不明な点が多いのが現状である。

本研究では、BsRLP と form II RuBisCO に高度に保存されている 2 つのアミノ酸残基に着目し、その機能を酵素学的に解析し、両者の機能を比較した。第 2 章では、活性中心から離れているが一次配列および構造上保存された Lys134 に着目した。既知の立体構造によると、両酵素の Lys134 はモノマー分子内の NTD と CTD の境界に位置することから、モノマーもしくはダイマー構造の維持に重要な役割を担うことが予想された。しかし、両酵素における Lys134 の機能は立体構造から予想される結果とは必ずしも一致しなかった。BsRLP の Lys134 は主に構造維持に寄与する一方で、RrRuBisCO の Lys134 は構造維持にはほとんど関与せず、主に触媒反応関与することが明らかとなった。興味深いことに、それぞれの酵素における Lys134 の構造的な機能

は異なることが示唆された。これらのことから、Lys134 は RuBisCO superfamily において必須であるものの、進化の過程でその機能は多様化し、現在に至ったと予想される。

第3章では、RLP と RuBisCO の触媒発揮機構に焦点を当て、RuBisCO superfamily の活性中心に完全に保存された His294 の機能的な位置付けを考察した。BsRLP はエノール化しか行わないのに対し、RuBisCO はエノール化以降に CO₂ を付加できる。RuBisCO の His294 は、RuBP エノール化に加えて、carboxylase 反応を正に進ませるために必須の役割を担うと予想されている。興味深いことに、BsRLP は RuBP エノール化や CO₂ 固定を行わないにもかかわらず、活性中心に His294 を保持していた。これに加えて BsRLP のエノール化機構における His294 の機能も明らかでなかったことから、なぜ BsRLP が His294 を保持しているのかはまったく不明であった。しかし実験結果から、BsRLP の His294 への点変異は、最大活性の発揮に必須である Lys201 のカルバメート化や Mg²⁺ 親和性に大きく影響するという驚きの結果を与えた。この結果は立体構造の知見とも一致し、His294 のイミダゾール環は Lys201 のカルバメート酸素や金属配位に必須の Glu204 側鎖とも水素結合を形成しうることが示唆された。また、His294 とカルバメート化 Lys201 の距離は BsRLP や form I 植物 RuBisCO、form II RuBisCO によって異なり、生体内に応じた活性中心のカルバメート化環境を作っていることが示唆された。よって、His294 は RuBisCO superfamily で保存されているものの、それぞれの酵素活性を最適化するために役割を多様化していることが予想される。

以上のことから、Lys134 や His294 のように RLP と RuBisCO で共通に保存されたアミノ酸残基は、その基本構造の維持や触媒発揮機構において決定的な役割を担うことが証明された。同時に、これらのアミノ酸残基は酵素ごとに異なる機能を有することも示唆された。RuBisCO superfamily には本研究で取り上げた Lys134 や His294 以外にも多くのアミノ酸残基が保存されている。これらのアミノ酸残基の更なる機能解明は、進化の過程でどのように現存する RuBisCO や RLP が形作られたのかを知る手がかりになると期待される。

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科に入学して以来、多くの方に支えられながら、5年間の研究生活を送ることができました。博士前期・後期課程において、熱心なご指導をいただいた分化・形態形成学講座 横田明穂 教授に感謝いたします。また、同講座の明石欣也 助教、宗景ゆり 助教には、研究の助言にとどまらず日常生活についてもお世話になりました。感謝いたします。

同講座の蘆田弘樹 助教は、入学から卒業にいたるまで常に暖かく見守ってくださり、ご指導いただきました。兄のいない私にとって、本当の兄のように接していただきました。重ねて御礼を申し上げます。また、同講座の卒業生であり、現在地球環境産業技術研究機構 (RITE) でご活躍されている齋藤洋太郎博士は、分子生物学実験を行ったことのない私に根気強く研究のいろはを教えてくださいました。齋藤博士からは現在に至るまで私の研究について有益なアドバイスをいただき、非常に感謝しております。そして忘れることができないのが、お世話いただいた卒業生、在学生の皆様、スタッフ (博士研究員、技官、秘書) の皆様です。特に、同じ RuBisCO チームの小川太郎博士、西村健司氏、二宮奈々氏、榊谷優輔氏、山下宣容氏、松本俊平氏には大変お世話になりました。皆様のおかげで、実り多い研究生活を送ることができました。深く御礼申し上げます。

また、大阪大学大学院工学研究科応用科学専攻の松村浩由 准教授、溝端栄一 助教、田村はるか博士には、博士論文研究に欠かすことのできない酵素の立体構造に関するご助言をいただきました。

最後に、両親である中野憲一、陽子には博士号取得までの5年間研究に従事できる環境を与えてくれましたことに心から感謝いたします。また、弟の貴司には化学・材料科学の知見から有益なアドバイスをいただきました。皆様、本当にありがとうございます。ありがとうございました。

参考文献

- Andersson, I. (1996) Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **259**, 160-174.
- Andersson, I., Backlund, A. (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 275-291.
- Andersson, I., Taylor, T. C. (2003) Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 130-140.
- Ashida, H., Danchin, A., Yokota, A. (2005) Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? *Res. Microbiol.* **156**, 611-618.
- Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Yokota, A. (2003) A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO, *Science* **302**, 286-290.
- Ashida, H., Saito, Y., Nakano, T., de Marsac, N.T., Sekowska, A., Danchin, A., Yokota, A. (2008) RuBisCO-like proteins as the enolase enzyme in the methionine salvage pathway: functional and evolutionary relationships between RuBisCO-like proteins and photosynthetic RuBisCO. *J. Exp. Bot.* **59**, 1543-1554.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M., Holden, H.M. (1995) Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* **34**, 7973-7978
- Carré-Mlouka, A., Méjean, A., Quillardet, P., Ashida, H., Saito, Y., Yokota, A., Callebaut, I., Sekowska, A., Dittmann, E., Bouchier, C., de Marsac, N.T. (2006) A new Rubisco-like protein coexists with a photosynthetic rubisco in the planktonic cyanobacteria *Microcystis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 24462-71.

Chen, Z., Spreitzer, R.J. (1992) How various factors influence the CO₂/O₂ specificity of ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynth. Res.* **31**, 157-164

Christeller, J. T., Laing, W. A. (1978) A kinetic study of ribulose bisphosphate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J* **173**, 467-473.

Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., Lorimer, G.H. (1998) Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base. *Chem. Rev.* **98**, 549-561.

Ellis, R.J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 241-244

Gutteridge, S., Lorimer, G.H., Pierce, J. (1988) Details of the reactions catalyzed by mutant forms of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 675-682

Gutteridge, S., Rhoades, D.F., Herrmann, C. (1993) Site-specific mutations in a loop region of the C-terminal domain of the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase that influence substrate partitioning. *J. Biol. Chem.* **268**, 7818-7824.

Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 505-509.

Hanson, T.E., Tabita, F.R. (2001) A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4397-4402.

Harpel, M.R., Larimer, F.W., Hartman, F.C.(1991) Functional analysis of the putative catalytic bases His-321 and Ser-368 of *Rhodospirillum rubrum* ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 24734–24740.

Harpel, M.R., Larimer, F.W., Hartman, F.C. (1998) Multiple catalytic roles of His 287 of *Rhodospirillum rubrum* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Protein Sci.* **7**, 730-738.

Hartman, F.C., Harpel, M.R. (1994) Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197-234.

Imker, H.J., Fedorov, A.A., Fedorov, E.V., Almo, S.C., Gerlt, J.A. (2007) Mechanistic diversity in the RuBisCO superfamily: the "enolase" in the methionine salvage pathway in *Geobacillus kaustophilus*. *Biochemistry* **46**, 4077-4089.

Imker, H.J., Singh, J., Warlick, B.P., Tabita, F.R., Gerlt, J.A. (2008) Mechanistic diversity in the RuBisCO superfamily: a novel isomerization reaction catalyzed by the RuBisCO-like protein from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **47**, 11171-11173

King, W.A., Gready, J.E., Andrews, T.J. (1998) Quantum chemical analysis of the enolization of ribulose bisphosphate: the first hurdle in the fixation of CO₂ by Rubisco. *Biochemistry* **37**, 15414-15422.

Kitano, K., Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., Miki, K. (2001) Crystal structure of a novel-type archaeal Rubisco with pentagonal symmetry. *Structure* **9** 473-481.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Li, H., Sawaya, M.R., Tabita, F.R., Eisenberg, D. (2005) Crystal structure of a RuBisCO-like protein from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Structure* **13**, 779-789

Lorimer, G.H., Badger, M.R., Andrews, T.J. (1976) The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* **15**, 529-536.

Lorimer, G.H., Gutteridge S, Madden M.W. (1987) Partial reactions of ribulose bisphosphate carboxylase: Their utility in the study of mutant enzymes. *Plant molecular biology*, van Wettstein, D., Chua, N.H., eds. (Plenum Press, New York, US), pp. 21-31.

Lu, G., Lindqvist, Y., Schneider, G. (1992) Electrostatic fields at the active site of

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **12**, 117-127.

Lundquist, T., Schneider, G. (1991a) Crystal structure of the ternary complex of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, Mg(II), and activator CO₂ at 2.3-Å resolution. *Biochemistry* **30**, 904-908.

Lundquist, T., Schneider, G. (1991b) Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **266**, 12604-12611.

Marcus, Y., Altman-Gueta, H., Finkler, A., Gurevitz, M. (2005) Mutagenesis at two distinct phosphate-binding sites unravels their differential roles in regulation of Rubisco activation and catalysis. *J. Bacteriol.* **187**, 4222-4228.

Mueller-Cajar, O., Morell, M., Whitney, S.M. (2007) Directed evolution of rubisco in *Escherichia coli* reveals a specificity-determining hydrogen bond in the form II enzyme. *Biochemistry* **46**, 14067-14074.

Mueller-Cajar, O., Whitney, S.M. (2008) Evolving improved *Synechococcus* Rubisco functional expression in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **414**, 205-214.

Nagano, N., Orengo, C.A., Thornton, J.M. (2002) One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* **321**, 741-765.

Newman, J., Gutteridge, S. (1993) The X-ray structure of *Synechococcus* ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase-activated quaternary complex at 2.2-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **268**, 25876-25886

Pearce, F.G., Andrews, T.J. (2003) The relationship between side reactions and slow inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a Loop 6 mutant of the tobacco enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 32526-32536.

Portis, A.R., Jr. (2003) Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res.* **75**, 11-27.

Roy, H., Andrews, T. J. (2000) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, vol. 9, Leegood, R. C., Sharkey, T. D., von Caemmerer, S. eds. (Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands), pp53-83.

Saito, Y., Ashida, H., Sakiyama, T., de Marsac, N.T., Danchin, A., Sekowska, A., Yokota, A. (2009) Structural and functional similarities between a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)-like protein from *Bacillus subtilis* and photosynthetic RuBisCO. *J. Biol. Chem.* **284**, 13256-13264.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning*, third ed., Vol. 3. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, US.)

Satagopan, S., Spreitzer, R.J. (2004) Substitutions at the Asp-473 latch residue of chlamydomonas ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase cause decreases in carboxylation efficiency and CO₂/O₂ specificity. *J. Biol. Chem.* **279**, 14240-14244.

Schloss, J.V., Phares, E.F., Long, M.V., Norton, I.L., Stringer, C.D., Hartman, F.C. (1982) Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Methods Enzymol.* **90**, 522-528.

Schneider, G., Lindqvist, Y., Lindqvist, T. (1990) Crystallographic refinement and structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **211**, 989-1008.

Schreuder, H.A., Knight, S., Curmi, P.M., Andersson, I., Cascio, D., Brändén, C.I., Eisenberg, D. (1993) Formation of the active site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by a disorder-order transition from the unactivated to the activated form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9968-9972.

Smith SA, Tabita FR. (2004) Glycine 176 affects catalytic properties and stability of the

Synechococcus sp. strain PCC6301 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 25632-25637.

Spreitzer, R.J., Peddi, S.R., Satagopan, S. (2005) Phylogenetic engineering at an interface between large and small subunits imparts land-plant kinetic properties to algal Rubisco. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17225-17230.

Spreitzer, R.J., Salvucci, M.E. (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**, 449–475.

Sterner, R., Hocker, B. (2005) Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)₈-barrel enzyme fold. *Chem. Rev.* **105**, 4038-4055.

Stringer, C.D., Norton, I.L., Hartman, F.C. (1981) Sequences of tryptic peptides containing five cysteinyl residues of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 495-501.

Tabita, F.R. (1999) Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. *Photosynth. Res.* **60**, 1-28.

Tabita, F.R., Hanson, T.E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J., Chan, S. (2007) Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* **71**, 576–599.

Tabita, F.R., Satagopan, S., Hanson, T.E., Kreel, N.E., Scott, S.S. (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J. Exp. Bot.* **59**, 1515–1524

Tamura, H., Saito, Y., Ashida, H., Kai, Y., Inoue, T., Yokota, A., Matsumura, H. (2009) Structure of the apo decarbamylated form of 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase from *Bacillus subtilis*. *Acta. Crystallogr. Sect. D* **65**, 942-951.

Taylor, T. C., Andersson, I. (1997) The structure of the complex between rubisco and its

natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **265**, 432-444

Tcherkez, G.G., Farquhar, G.D., Andrews, T.J. (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7246-7251.

Yokota, A., Kitaoka, S. (1985) Correct pK values for dissociation constant of carbonic acid lower the reported Km values of ribulose bisphosphate carboxylase to half. Presentation of a nomograph and an equation for determining the pK values. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 1075-1079.

[和文]

Voet, D., Voet, J.G., Pratt C.W. (田宮信雄、松村正実、八木達彦、遠藤斗志也訳) ヴォー
ト基礎生化学 (2000)

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

『An evolutionally conserved Lys122 is essential for function in *Rhodospirillum rubrum* bona fide RuBisCO and *Bacillus subtilis* RuBisCO-like protein』 Nakano, T., Ashida, H., Mizohata, E., Matsumura, H., Yokota, A. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 212-216

参考論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

『RuBisCO-like proteins as the enolase enzyme in the methionine salvage pathway : Functional and evolutionary relationships between RuBisCO-like proteins and photosynthetic RuBisCO』 Ashida, H., Saito, Y., Nakano, T., de Marsac, N.T., Sekowska, A., Danchin, A., Yokota, A. (2008) *J. Exp. Bot.* **59**, 1543-1554.