

# 論文内容の要旨

申請者氏名 中野 寿宏

一部のバクテリアは光合成  $\text{CO}_2$  固定酵素 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) と相同性を示す RuBisCO-like protein (RLP) を有する。*Bacillus subtilis* RLP (BsRLP) はメチオニン代謝で、RuBisCO carboxylase 反応初発段階の ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) エノール化と類似した 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate のエノール化反応を触媒する。これらのことから、両酵素は同一起源から進化し、類似の触媒機構を用いると考えられることから、RuBisCO superfamily と呼ばれる。本研究では、BsRLP と RuBisCO の保存残基における構造活性相関の比較から、RuBisCO superfamily の触媒発揮機構の共通点・相違点を明らかにし、両酵素の機能進化の解明を目指した。

RuBisCO Superfamily で 134 番目残基は正電荷の lysine もしくは arginine として保存されている。Form I RuBisCO で、Arg134 は C 末端テールとの相互作用を介して触媒ループ固定に関わるが、RLP と form II RuBisCO は C 末端テールを有さない、または触媒に利用しない。そこで、BsRLP と *Rhodospirillum rubrum* form II RuBisCO (RrRuBisCO) を用いて Lys134 の機能解析を行うため、K134R、M、E 変異酵素を作製した。全ての変異 RrRuBisCO は機能単位のダイマーを形成し、熱安定性も野生型と同じであったが、K134M、E の活性はそれぞれ 0.2、0.8% に低下した。一方、BsRLP K134M、E はダイマー形成できず、ダイマー形成した K134R も  $k_{\text{cat}}$  と熱安定性が低下した。これらの結果と立体構造情報から、Lys134 の N-C 末端ドメイン間を架橋する水素結合は、両酵素の触媒発揮に重要であるが、RLP ではダイマー形成に必須のモノマーの最適なフォールディングに、form II RuBisCO では活性中心形成に関与していることが示唆された。

RuBisCO 触媒残基 His294 は、carboxylase 反応の RuBP エノール化、 $\text{CO}_2$  付加、水和と多段階に関与すると予想されているが、RuBisCO superfamily で完全に保存されている。RLP における His294 の機能を明らかにするため、BsRLP の H294Q、N、A 変異酵素を作製した。RuBisCO superfamily の触媒には基質とは異なる  $\text{CO}_2$  による Lys201 の  $\epsilon$ -アミノ基のカルバメート化が必要だが、全ての変異 BsRLP は、最大活性に野生型よりも高  $\text{CO}_2$  濃度を要求したことから、His294 がカルバメート安定化に寄与していることが示唆された。His294 NE2 と Lys201 のカルバメート酸素の距離は BsRLP で 2.8 Å、RuBisCO で約 3.5 Å であることと BsRLP のカルバメート化が RuBisCO の場合よりも低  $\text{CO}_2$  濃度で起こることから、RuBisCO の場合と比較して、BsRLP において His294 はカルバメート化  $\text{CO}_2$  の親和性向上に大きく寄与していることが示唆された。

以上のことから、Lys134 と His294 は共通して RuBisCO superfamily の触媒発揮に必要であるが、これらの残基の機能が酵素によって異なることが示唆された。このような残基機能の違いが酵素特性の変化を生み出していると考えられた。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 中野 寿宏

RuBisCO は光合成  $\text{CO}_2$  固定の鍵酵素であることから、光合成メカニズムの理解のために、本酵素の触媒発揮機構解明を目指し、点変異導入、結晶構造解析、異種生物 RuBisCO 間の比較解析などが盛んに行われてきた。これらの研究結果から、RuBisCO の触媒発揮機構に関して、触媒残基や反応機構が予想されてきたが、未だ明らかでない部分も多い。

この問題の解決策として、本論文では、 $\text{CO}_2$  固定酵素としての能力を獲得するに至った RuBisCO の分子進化過程に注目し、RuBisCO の祖先酵素であり RuBisCO と機能的・進化的関連性の強い RLP と光合成 RuBisCO 間で保存されたアミノ酸残基の構造活性相関の比較を行い、RuBisCO superfamily 全体からの触媒発揮機構の解明を目指している。このような superfamily の進化的観点からの RLP と RuBisCO を用いた構造活性相関の比較研究は新しい研究分野であり、RuBisCO のみの解析では明らかにされえないであろう、新たな触媒発揮機構が明らかになると期待された。実際、本論文研究で、RuBisCO superfamily に共通して触媒発揮に重要な 2 つの残基を同定した。

Lys/Arg134 は、form I RuBisCO では活性中心構造の最適化に、RLP では触媒に必須なダイマー化にそれぞれ必須であることを明らかにした。これらの結果と form I RuBisCO では触媒ループ構造安定化に寄与しているというこれまでの報告から、この残基は RuBisCO superfamily において触媒発揮に共通して重要な機能を果たしているものの、その機能は多様化していることが示唆された。このことから、保存残基が必ずしも同じ機能を果たしている訳ではなく、各酵素の触媒能最適化のためにその機能を変化させる分子進化パターンを見出した。

また、RLP において His294 は触媒発揮に必要な酵素活性化ステップである、活性中心残基 Lys201 の  $\text{CO}_2$  によるカルバメート化の促進に寄与していることを明らかにした。これまで RuBisCO superfamily で活性化促進に働く残基は報告されておらず、新しい触媒発揮機構として重要な発見である。RuBisCO では、この残基は  $\text{CO}_2$  固定反応の触媒残基であることから、RLP から RuBisCO への進化過程において、RLP で活性化促進に利用されていた His294 が RuBisCO の触媒能獲得の際に  $\text{CO}_2$  固定反応に用いられるようになったという進化モデルを提唱した。

以上のように、本論文は RuBisCO superfamily の触媒発揮に共通して重要な残基を同定するとともに、これら残基が関与する RuBisCO 触媒発揮機構を獲得するに至った分子進化モデルを提唱しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。