

1S06 超好熱始原菌由来の耐熱性酵素における分子認識

○今中忠行¹、跡見晴幸¹、高木昌宏²、藤原伸介³(¹京大院・工、²北陸先端大・材料科学、³阪大院・工)

【目的】 超好熱始原菌由来酵素は従来の酵素と比較して、①耐熱性が高い、②基質特異性が低い、などという特徴を有している。この理由を酵素の生化学的性質・立体構造に基づいて解明することを本研究の目的とした。我々は鹿児島県小宝島より超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株を分離しており、既に 80 種類以上のタンパク質に対して生化学的解析を行ってきた。ここでは特に興味深い性質を有する KOD1 株由来の①aspartyl tRNA synthetase (AspRS)、②Rubisco、③DNA ligase および④DNA polymerase について生化学的・構造化学的研究成果を紹介する。

【方法および結果】 ①Aspartyl-tRNA synthetase: KOD1 株の AspRS は N 末端側領域が細菌型酵素と、中央および C 末端側領域は真核生物型のものと類似しており、キメラ構造をとっていた。組換え型酵素 AspRS の結晶化・X 線解析を行い、1.9 Å の分解能で AspRS の立体構造を決定した。結晶に基質をソーキングすることにより、Asp-tRNA の合成過程を追跡することができた。また、生化学的に示されていた始原菌酵素のアンチコドン認識特異性の低さ (Asp と Asn を活性化できること) の理由を構造的に証明できた。②Rubisco: Rubisco は植物や多数の光合成細菌の Calvin-Benson cycle の鍵酵素である。我々は KOD1 株のゲノムに Rubisco 遺伝子が存在することを発見し、その発現産物 (*Tk*-Rubisco) の解析を進めた。*Tk*-Rubisco は一次構造的に既存の酵素と異なる新型 Rubisco であり、また spinach の Rubisco の 10 倍以上の高い活性を有していた。さらに、従来の Rubisco よりも carboxylase 特異的であることも判明した。*Tk*-Rubisco の結晶化・X 線解析を行った結果、本酵素は新規な五角形構造を有していることが判明した。③DNA ligase: DNA ligase は 2 つの DNA 断片の末端を結合させるという遺伝子組換え技術の中で不可欠な酵素である。KOD1 株由来酵素は 30℃ から 100℃ まで高い DNA ligase 活性を有し、また、ATP 依存型酵素としては初めて NAD⁺ を補因子として活性を示した。また DNA nick の 3'-末端側の塩基対形成に対して厳密な基質特異性を示したが、5'-末端に対しては特異性が低いことが判明した。④DNA polymerase: 本酵素は長い DNA 断片を速く、正確に複製することができるという特徴を有している。立体構造を決定することによりこれらの諸特性を説明することができた。例えば、fingers subdomain には塩基性アミノ酸残基が多く、基質である dNTP が静電相互作用により取り込みが促進される。さらに、forked-point には多くの Arg 残基が存在するため、高温でも安定に複製中の DNA を保持することができる。

Molecular recognition of thermostable enzymes from hyperthermophiles

Tadayuki Imanaka¹, Haruyuki Atomi¹, Masahiro Takagi², Shinsuke Fujiwara³¹Kyoto Univ., ²JAIST, ³Osaka Univ.

【Key Words】 Hyperthermophile, molecular recognition, Asp tRNA synthetase, Rubisco, DNA ligase, DNA polymerase