

Purification and characterization of homo- and hetero-dimeric acetate kinases from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris*

著者	余 玲
発行年	2001-03-26
その他の言語のタイトル	硫酸還元菌 <i>Desulfovibrio vulgaris</i> からのホモ及びヘテロ2量体型酢酸キナーゼの精製とその性状解析 リュウサン カンゲンキン <i>Desulfovibrio vulgaris</i> カラノ ホモ オヨビ ヘテロ 2リョウタイガタ サク サン キナーゼ ノ セイセイ ト ソノ セイジヨウ カイセキ
URL	http://hdl.handle.net/10422/2741

氏名・(本籍)	余 玲 (中国)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第378号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位論文題目	Purification and Characterization of Homo- and Hetero-dimeric Acetate Kinases from the Sulfate-Reducing Bacterium <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (硫酸還元菌 <i>Desulfovibrio vulgaris</i> からのホモ及びヘテロ 2量体型酢酸キナーゼの精製とその性状解析)
	審査委員 主査 教授 大久保 岩 男 副査 教授 佐 伯 行 一 副査 教授 堀 池 喜八郎

論文内容の要旨

【目的】

硫酸還元菌は、土壌、河川や海洋の汚泥、深海の熱水噴出口だけでなくヒトを含む動物の腸管や海草の根部にもその存在が知られるようになってきている。また、最近、本菌がこれまで知られていない経路でポルフィリンを生合成することがわかるなど、自然界の硫黄サイクルや下水施設の腐食に果たす役割だけでなく、進化学的にも注目を集めている。本菌は乳酸などの有機物を酸化し硫酸イオンを硫化水素に還元して ATP を生合成するが、そのエネルギー代謝の解明は重要である。そこで、本研究では、エネルギー代謝に重要な酵素である酢酸キナーゼ (AK) を本菌から初めて精製し、その性状を詳しく調べた。

【方法】

(1) *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株を Postgate の C 培地で嫌氣的に大量培養した。(2) 得られた菌 39g を緩衝液中で超音波処理し、その可溶性画分から AK を DEAE-Toyopearl カラム、Q-Sepharose カラム、TSKgel G3000SWXL カラム、Mono-Q カラム、TSKgel SuperSW3000 カラムを順次用いて精製した。(3) 酵素精製のための AK 活性の測定は、酢酸と ATP を基質として、酵素反応で生成するアセチルリン酸をヒドロキサム酸法で定量した。(4) 精製酵素の反応動力学を行うために、正反応ではその生成物である ADP を、逆反応ではその生成物である ATP を Mono-Q カラムを用いる HPLC で直接定量した。(5) AK の分子量はゲルろ過と組み合わせた低角レーザー光散乱法で、サブユニットの分子量は MALDI TOF 質量分析でそれぞれ測定した。(6) SDS-PAGE は、10% ゲルを用い、Laemmli 法に従って行った。AK の N 末端アミノ酸配列分析は、分離タンパク質を PVDF 膜にドライプロットし、クーマシーブルーで染色した後、タンパク質バンドを切り出し、それを直接ペプチドシーケンサーで分析した。

【結果】

(1) 本菌には可溶性の 2 つの AK が存在し、両者は陰イオン交換樹脂で分離した。先に溶出する酵素を AK-I、遅れて溶出する酵素を AK-II とした。(2) AK-I はホモ 2 量体、AK-II はヘテロ 2 量体であった。(3) AK-I のサブユニットと AK-II の二つのサブユニットはすべて同一の N 末端アミノ酸配列を示した。(4) AK-I と AK-II の酵素反応は高速平衡ランダム Bi Bi 機構に従った。アセチルリン酸は正反応の基質である酢酸と ATP の両方に対して拮抗阻害した。両酵素の反応動力学定数は比較的によく似た値を示した。

【考察】

(1) 単一の遺伝子産物から翻訳後修飾により 2 つの AK が産生されていることが強く示唆された。SDS-PAGE で AK-II の 2 つのサブユニットに約 1.5kDa の質量差が認められたが、質量分析では質量差が検出できず、ペプチドの C 末端側の加水分解ではなく、アミノ酸残基のなんらかの化学

修飾が関与していると考えられる。(2)本研究で初めてすべての反応動力学定数を定常状態の反応実験から求めることができた。これは、酵素反応で生成する ATP や ADP を複数の酵素を用いるカップリング法ではなく、直接定量する HPLC による方法を用いたことで、容易にかつ迅速に大量の正確な測定が可能になったため、本方法は酢酸キナーゼの反応機構を立体構造と酵素反応の両面から解明する研究に役立つ。(3)本菌に認められた酢酸キナーゼの翻訳後修飾が本菌に特有の現象であるのかどうか明らかにする必要がある。

【結 論】

硫酸還元菌で翻訳後修飾により 2 つの酢酸キナーゼが産生される。今後、この翻訳後修飾の実体を解明し、その生理的意義を明らかにする必要がある。また、本研究で開発した活性測定法は他の多くのキナーゼ反応にも応用でき、それらの反応機構の解明に寄与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

硫酸還元菌は土壌や深海の熱水噴出口だけでなくヒトの腸管にも生息し、乳酸のような有機物を酸化し、同時に硫酸イオンを硫化水素に還元して ATP を産生している。本研究は、このエネルギー代謝の鍵酵素である酢酸キナーゼを初めて単離精製し、その性質を調べたものである。

その結果、翻訳後修飾反応によって 2 種の酢酸キナーゼが産生されることを示し、さらに、酵素反応は「高速平衡ランダム Bi Bi 機構」であることを明らかにし、反応動力学定数のすべてを初めて決定した。このため、ATP や ADP を直接定量する HPLC 法を開発している。

これらの成果は、嫌気性細菌のエネルギー代謝の解明に寄与し、また、HPLC 法による ATP や ADP の直接定量法は他の多くのキナーゼ反応にも適用できる。よって、本論文は博士（医学）の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。