OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Three-dimensional Structure of a Highly Thermostable Enzyme, 3-Isopropylmalate Dehydrogenase
Author(s)	Imada, Katsumi
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3060134
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【29】

氏名	今田勝巳（いまだかつみ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第10135号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科 高分子学専攻
学位論文名	Three-dimensional Structure of a Highly Thermostable Enzyme, 3-Isopropylmalate Dehydrogenase（耐熱性タンパク質 3−イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の立体構造）
論文審査委員	（主査） 教授 勝部 幸輝 （副査） 教授 高木 俊夫　教授 小高 忠男　教授 小林 雅通 教授 中村 晃

論文内容の要旨

高度好熱菌 *Thermus Thermophilus* 由来の3−イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（Tt-IPMDH）は70〜80℃でも働き非常に高い熱安定性を示す。この種のタンパク質の熱安定化機構を立体構造面から探るため，また機能と構造の関係を調べるため，Tt-IPMDHのX線結晶構造解析を行った。IPMDHは熱安定性の異なる変異酵素や好熱菌と常温菌のキメラ酵素が作られているが，その一部についても結晶解析を行った。さらに温度変化による構造変化を結晶解析法で追うことを試みた。

Tt-IPMDHの立体構造は同型置換法を用いて2.2 Å分解能で決定した（R＝18.2%）。IPMDH分子は互いに同一のトポロジーを持つ2つのドメインから成る。一方のドメインで形成される二量体は4本のヘリックスによる疎水性相互作用と分子間βシートで強固に結び付けられている。脱水素酵素一般に存在するNAD結合ドメインの6本の平行β鎖はなく，その一部を切り取ったような構造がIPMDHの両ドメインに存在する。このような構造はイソクエン酸脱水素酵素（ICDH）を除き既に解析された脱水素酵素と大きく異なる。よってICDHとIPMDHは進化的に他の脱水素酵素と異なると考えられる。

立体構造および異なる生物種のIPMDHのアミノ酸配列をもとに好熱菌のみに共通する残基に着目して熱安定性の要因を探ったところ，Len246をはじめ疎水性相互作用の重要性を示唆する箇所が多く存在した。また，IPMDHの部位特異的変異の結果を立体構造から解釈したところ，いずれも疎水性相互作用の重要性を示していた。耐熱性が向上した変異酵素では蛋白質分子内部の隙間が埋まるようなアミノ酸置換が，低下した酵素は近接残基と衝突するような置換が生じていた。

耐熱性が異なるキメラIPMDH（2T2M6T）と，その変異体（193L）の解析はTt-IPMDHの

構造をもとに2.2 Å分解能で行った。R値が20％以下になるまで精密化を行い立体構造を比較したが，耐熱性に差があるにもかかわらず両者に構造上の顕著な違いは認められなかった。両者の差異は高温状態で現れると思われる。

温度を変化させての解析は，イメージングプレートを用い，10℃，39℃，45℃でTt-IPMDHで行った。45℃では回折強度に大きな変化が現れた（R_F＝25.3％）。それぞれ精密化を行い構造を比較した結果，個々のB因子に温度による大きな違いが現れて来た。そのうちで温度上昇に連れてB因子が著しく増大した残基に注目し，立体構造上の場所を調べたところ，分子表面より分子の内部でいくつかの場所に集中していることが分かった。

論文審査の結果の要旨

本論文では，高度好熱菌由来の3－イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素および高度好熱菌と常温菌とのキメラ酵素などの立体構造をX線結晶構造解析法によって決定し，高度好熱菌由来の本酵素の耐熱性が，分子内部および2量体形成部の疎水性相互作用に起因することを明らかにしている。また，異なる種々の温度で本酵素の構造解析を行ない，基質結合部付近の構造に緩みが生じる温度で，活性が急激に増加することを明らかにしている。このように，本論文は，蛋白質の耐熱性および活性の温度依存性について多くの新しい知見を得ており，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。