



Title	Insights into superoxide dismutase structure from Tardigrade <i>Ramazzottius varieornatus</i>
Author(s)	Sim, Kee Shin
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92977
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (SIM KEE SHIN)	
Title	Insights into superoxide dismutase structure from Tardigrade <i>Ramazzottius varieornatus</i> (ヨコズナクマムシ由来スーパーオキシドジスムターゼの構造研究)
Abstract of Thesis Superoxide dismutase (SOD) is an indispensable antioxidant protein found ubiquitously in biological systems. Anhydrobiotic tardigrades, renowned for their extreme resilience, possess an expanded repertoire of antioxidant genes, including SODs. While the role of SODs in oxidative stress resistance, particularly during desiccation, is well recognized, their molecular functions remain largely unexplored. Here, we present crystal structures of RvSOD15, a copper/zinc-containing SOD from the anhydrobiotic tardigrade <i>Ramazzottius varieornatus</i> strain YOKOZUNA-1. Notably, RvSOD15 exhibits a unique T-shaped catalytic copper center, resulting from the substitution of a histidine ligand with valine (V87). However, its reactivity was modest in functional assays. Structural analyses of the wild-type and V87H mutant revealed a flexible loop near histidine 87 that its conformational dynamics of this loop controlled by Tyr97, was observed in "Locked" and "Free" states. Investigation of other RvSODs uncovered additional unusual variants characterized by features such as electrostatic loop deletions, β3-sheet modifications, and atypical metal-binding residues. Binding studies with azide and hydrogen peroxide complexes provided insights into potential substrate, product, and inhibitor binding regions. Leveraging the <i>alphaFold</i> model structure, we classified RvSODs into alpha, beta, gamma, delta, and epsilon subgroups based on their SOD fold characteristics. Intriguingly, our findings suggest that RvSOD15 and some RvSODs may have evolved to lose their SOD function, challenging the notion that gene duplications of antioxidant proteins alone account for the exceptional stress tolerance observed in anhydrobiotic tardigrades. This study sheds light on the structural diversity and functional adaptations of SODs, deepening our understanding of their role in stress response mechanisms.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (SIM KEE SHIN)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	井上 豪
	副 査	教授	福澤 薫
	副 査	准教授	青山 浩

論文審査の結果の要旨

本研究では、極限環境耐性が極めて高いことで知られるクマムシの1種*Ramazzottius varieornatus* YOKOZUNA-1由来の、抗酸化タンパク質であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)に着目し、銅/亜鉛含有SODであるRvSOD15と、活性部位に欠損していたヒスチジンリガンドを再構成したRvSOD15変異体(V87H)のアポ体、および基質やアジドとの複合体のX線結晶構造を高精度に行うと共に、SOD活性を測定し、構造と機能の相関関係の解明を行い、以下の興味深い結論を得た。

1. RvSOD15は、活性中心のCuイオンに配位することで知られるヒスチジンリガンドがバリリン(V87)に置換されている。X線結晶構造解析の結果、本タンパク質はユニークなT字型の触媒銅中心を示し、一般的なSODと異なる静電ループ、金属結合ループへのアミノ酸挿入などの特徴を持つことが判明した。また、アジドとや過酸化水素との複合体のX線結晶構造解析により、生成物や阻害剤の潜在的結合領域が判明し、これらは既知のSOD内での結合位置と類似する位置に結合することが明らかになった。
2. 活性中心の重要なヒスチジン残基が失われていることから予想されたように、活性測定の結果、RvSOD15は他のSODに比べ反応性が極めて低かった。活性中心を再構成したV87H変異体についても活性を測定遂行したが、野生型に比べると活性が上昇するものの、他生物由来のSODと比べると活性は遥かに低いままであった。
3. 2. で明らかになった低反応性の理由をV87H変異体の構造解析から追究した。ヒスチジン87の近くに柔軟なループがあることが明らかになり、このループのコンフォメーションダイナミクスはTyr97によって制御され、「ロック」状態と「フリー」状態として観察された。1の解析と合わせて、RvSOD15はたとえ正常な活性中心をもつとしても、活性中心の安定性が低くその活性が低いことが示唆された。
4. AlphaFoldモデル構造を利用して、*R. varieornatus* が有する全SODをフォールドの特徴からいくつかのサブグループに分類した。興味深いことに、RvSOD15といくつかのSODがSOD機能を失うように進化した可能性を示唆しており、これまでの仮説にあったような「抗酸化タンパク質の遺伝子重複」だけでは、クマムシに見られる驚異的なストレス耐性を説明できない可能性が示唆された。

以上のように、SODが酸化ストレス耐性、特に乾燥時に果たす役割はよく知られているが、*R. varieornatus* YOKOZUNA-1由来のSODを含む抗酸化遺伝子のレパートリーは広く、その分子機能はほとんど解明されていなかった。これに対して本論文は、構造的多様性と機能的適応に光を当て、ストレス応答機構におけるSODの役割についての理解を深めるものであり、今後に紐解き得る知見を提示する、貴重な研究成果である。

以上より、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。