

学位論文審査の結果の要旨

氏名	林 順司
審査委員	主査 櫻庭 春彦 副査 麻田 恭彦 副査 阿野 嘉孝 副査 大西 浩平 副査 渡邊 彰

論文名

Unique coenzyme binding mode of hyperthermophilic archaeal NAD(P)-dependent dehydrogenases
(超好熱アーキア由来 NAD(P)依存性脱水素酵素が示す新規な補酵素結合様式)

審査結果の要旨

100℃付近の高温環境に生育する超好熱菌は、高度に安定な細胞成分を生産する。特に超好熱菌由来の酵素は、高温だけでなく有機溶媒や界面活性剤などに対しても非常に耐性が高い。このため、様々な分野での産業利用が期待されている。ほとんどの超好熱菌は、第3の生物と呼ばれるアーキアに属しており、真核生物やバクテリアには存在しない新奇な代謝系やその関連酵素を持つことから、ユニークな酵素の宝庫として注目を集めている。

本研究では、超好熱アーキアにおけるアミノ酸及びリン脂質生合成系の研究過程で見出された2つの NAD(P)依存性脱水素酵素が、これまで知られていない新規な補酵素結合様式を示すことを明らかにしている。1つは、メチオニン、スレオニン、イソロイシン生合成の共通の前駆体となるホモセリンの合成に働くホモセリン脱水素酵素で、もう1つは、アーキア特有のグリセロリン脂質であるグリセロール 1-リン酸の生合成に関わるグリセロール 1-リン酸脱水素酵素である。本研究においては、この2つの酵素の詳細な性質と結晶構造が決定され、新規な補酵素結合様式をもたらす要因が解析された。

(1) ホモセリン脱水素酵素

超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* にホモセリン脱水素酵素を見出し、大腸菌における発現、精製、諸性質解明、及び X 線結晶構造解析に成功している。構造解析の結果、本酵素の精製及び結晶化の過程で NADPH を添加していないにも関わらず、補酵素結合部位に NADPH が結合していることが判明した。しかしながら、NADP は本酵素の補酵素としては働かず、逆に NAD 依存性ホモセリン酸化反応を強力に阻害することが判明した。本酵素の補酵素結合部位は、従来の NADP 依存性酵素によく見られる特徴を備えており、NADP のアデニンリボース C2'リン酸基と酵素間に複数の相互作用の存在が確認された。この相互作用に関連するアミノ酸残基の内、Lys57 をアラニンに変えた変異酵素(K57A)は NADP に対する高い反応性を獲得した。K57A の構造解析を行った結果、NADPH と酵素間の相互作用の減少が確認された。これらの結果から、NADP と酵素間の強力な結合が、NAD(P)依存性脱水素酵素の触媒活性の妨げとなることが示唆された。酵素に NADP の結合ポケットが存在するにも関わらず、NADP が補酵素として利用されないことを示した最初の例となる。

(2) グリセロール 1-リン酸脱水素酵素

超好熱アーキア *Pyrobaculum caldifontis* にグリセロール 1-リン酸脱水素酵素を見出し、大腸菌における発現、精製、諸性質解明、及び X 線結晶構造解析に成功している。機能解析の結果、既知のグリセロール 1-リン酸脱水素酵素は全て NADPH に高い特異性を示すが、本酵素は NADH に高い特異性を示すことが判明した。構造解析及び HPLC による分析の結果より、本酵素の精製及び結晶化の課程で NADPH を添加していないにも関わらず、補酵素結合部位に NADPH が結合していることが確認された。構造情報から、NADPH のアデニンリボース C2'リン酸基が、Ser40 及び Thr42 と 5 本の偏った水素結合を形成していることが明らかとなった。また、本酵素の NADPH は既知のグリセロール 1-リン酸脱水素酵素の補酵素結合部位から押し出されるように配位していた。興味深いことに、変異酵素 S40A/T42A は、野生型酵素ではほとんど活性を示さなかった NADPH に対する高い活性を獲得した。このことから C2'リン酸基周辺に存在する偏った水素結合により、NADPH が正常な結合とは異なる形で配位され、酵素が反応性を示さなくなったことが示唆された。ホモセリン脱水素酵素と同様、酵素に NADP の結合ポケットが存在するが、これとはまた異なるメカニズムで NADP が利用されないことを示した例となる。

一般に、NAD(P)依存性脱水素酵素は補酵素特異性によって大きく 3 つに分類される。すなわち、NAD を主に利用する酵素、NADP を好む酵素、両者を区別なく利用できる酵素である。NAD は NADP のアデニンリボース C2'リン酸基が無いだけであるため、このリン酸基と相互作用するアミノ酸残基の有無が、酵素の補酵素特異性に大きく影響すると考えられてきた。NAD 依存性の酵素は、NAD のアデニンリボース C2'、C3'水酸基と水素結合するアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基を持っており、これらが存在するため、NADP のアデニンリボース C2'リン酸基が立体的に収納できない構造となっている。一方、NADP 依存性の酵素では、上記のアスパラギン酸残基やグルタミン酸残基がより小さなアミノ酸残基に変換されており、アデニンリボース C2'リン酸基が結合できるポケットが存在する。また、周辺のリジン残基やアルギニン残基がアデニンリボース C2'リン酸基と相互作用して NADP を固定している。NAD・NADP とともに利用できる酵素では、それぞれの補酵素の結合に合わせて構造が変化し、水素結合の付け替えが行われる例が報告されている。つまり、それぞれの補酵素の構造に合わせた結合ポケットが酵素中に存在するか否かで補酵素特異性が決まるという考え方がこれまでの基盤となっている。

本研究で明らかにされた脱水素酵素の補酵素特異性決定メカニズムは、これまで提唱されてきたものとは全く異なっており、補酵素特異性を決定する分子基盤に様々なバリエーションが存在することが示唆された。また NAD(P)依存性脱水素酵素の補酵素特異性は、たとえ酵素の構造情報が得られても予測できないことを示した点で、関連分野に大きな影響を及ぼすと考えられ、その成果は高く評価されるものである。

平成 29 年 2 月 4 日、愛媛大学農学部で開催された学位論文審査委員会において、本論文の内容について審査した結果、審査委員全員一致して、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。