

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Andrew Njagi Mugo
審査委員	主査 大西 浩平 副査 櫻庭 春彦 副査 渡邊 誠也 副査 加藤 伸一郎 副査 八木 年晴

論文名

Study on crystal structures of two enzymes involved in degradation pathway I for pyridoxine in *Mesorhizobium loti*

(根粒菌が持つピリドキシン分解経路 I を構成する 2 種類の酵素の立体構造解析に関する研究)

## 審査結果の要旨

ビタミン B<sub>6</sub> は生体にとって必須栄養素であるが、ある種の細菌はビタミン B<sub>6</sub> を唯一の炭素源、窒素源として生育することができる。すなわち、ビタミン B<sub>6</sub> の分解系を有している。細菌によるビタミン B<sub>6</sub> 分解系には、異なってはいるが関連する系 I と系 II の二つが存在する。系 I を構成する酵素遺伝子群が根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 のゲノム上にクラスターを形成して存在することが見いだされている。本菌株は実際にビタミン B<sub>6</sub> を唯一の炭素源、窒素源として生育可能である。ビタミン B<sub>6</sub> の一つピリドキシンは、系 I により 8 段階の酵素反応を経て、コハク酸セミアルデヒド、アンモニア、酢酸、二酸化炭素に分解される。それぞれの酵素をコードする遺伝子はクローニング、大腸菌による発現系が構築され、反応機構についての解析が行われている。多くの酵素は立体構造も解明されている。本論文は、ピリドキシンからピリドキサールへの反応を触媒する 1 番目の酵素ピリドキシン 4-酸化酵素(PNOX)と 5 番目の反応を触媒する 5-formly-3-hydroxy-2-methylpyridine-4-carboxylic acid (FHMPC) 脱水素酵素の立体構造を解明し、詳細な反応機構について議論している。

PNOX は FAD 依存の酸化酵素であり glucose-methanol-choline (GMC)酸化還元酵素ファミリーに属する。また、分子量 55kDa の単量体として作用する。PNOX はピリドキシンに対する特異性が高く、ピリドキシン 5'-リン酸とは反応しない。PNOX の基質特異性がピリドキシン 5'-リン酸に広がれば、その反応産物ピリドキサール 5'-リン酸(PLP)を合成することが可能である。その立体構造の解明から基質特異性を改変するための手がかりを得ることを最終目標としている。

C 末端側に His-tag を付加した PNOX を精製し、酵素単体およびピリドキシンのアナログであるピリドキサミン (PNOX によって代謝されない) との複合体の結晶構造を GMC 酸化還元酵素ファミリー酵素のひとつ、コリン酸化酵素の立体構造を用いた分子置換法によって解明した。その解像度はそれぞれ 2.2 Å と 2.1 Å であった。FAD は水素結合のネットワークを介して非共有結合で酵素に結合していた。PNOX の表面には基質が侵入するためのくぼみが存在していた。PNOX とコリン酸化酵素をスーパーインポーズするとよく一致した。特に活性中心は非常に類似していた。活性中心のアミノ酸配列

の比較から His460 と His462 が酵素活性に重要であることが予測されたことから、それぞれ、および両方のアミノ酸をアラニンに置換した変異酵素を作製した。その結果、H460A、H462A 一変異酵素は親和性の減少と大幅な *k<sub>cat</sub>* の減少が見られ、比活性は 1% 以下となった。さらに二重変異酵素は完全に活性を消失したことから、この 2 箇所の His は PNOX 活性に必須の残基であることが明らかとなった。His462 は GMC 酸化還元酵素ファミリー酵素で保存されており水素原子の引き抜きに関係していると考えられている。基質アナログであるピリドキサミンとの複合体の立体構造を元に基質ピリドキシンの結合モデルを構築したところ、His462 が酵素反応の開始に関わっていることが強く示唆された。解明された構造を元に基質特異性の改変への道が開けたことになる。

5 番目の反応を触媒する FHMPC 脱水素酵素は、FHMPC を酸化型 NAD<sup>+</sup> を補酵素として 3-hydroxy-2-methylpyridine 4,5-ジカルボン酸(HMPDC)に酸化する本来の反応と同時に、還元型 NADH を補酵素として 4-ピリドキシニン酸へと還元する反応も触媒する不均化酵素である。試験管内の反応においては、最終的に HMPDC と 4-ピリドキシニン酸が反応生成物として等モル合成される。本酵素は L-3-hydroxyacyl-CoA 脱水素酵素(HAD)ファミリーに属し、ヒト心臓 HAD と 32% の相同性を示す。HAD ファミリー酵素の活性に重要な His-Glu 二残基のうち His が触媒塩基として働く。また、周辺の Ser、2 分子の Asp もファミリー内でよく保存されていることが知られている。FHMPC 脱水素酵素においても His137-Glu149 が触媒二残基を形成する可能性があること、さらに Ser116、Asn188、Asn140 が保存されていることが明らかとなっていた。

FHMPC 脱水素酵素は pET を用いた大腸菌の発現系で大量発現し、陰イオン交換、Blue A カラムクロマトグラフィーで精製された。結晶を形成させ、X 線散乱データを取得後、ヒト心臓 HAD をもとにした分子置換法によって立体構造を 1.55 Å の解像度で決定した。構造は、非対称な単量体 2 分子からなる二量体であり、精製酵素のゲルろ過解析の結果とよく一致していた。補酵素 NAD<sup>+</sup> は N 末端側に結合していた。結晶構造は基質を含まないが、HAD ファミリーに保存されている 5 個のアミノ酸残基は、いずれも想定される基質結合部位、活性中心に位置していた。

解明された立体構造をもとに FHMPC 脱水素酵素の不斉化反応のメカニズムについて考察した。His137-Glu149 に Ser116 を加えた触媒三残基が不斉化反応に寄与している。Ser116 は還元反応における His137 のプロトン化を行う一方で、His137 は酸化反応においてプロトンの引き抜きを行うと考えられる。E149Q 変異株は大きく還元反応 (4-ピリドキシニン酸生成) に傾くというこれまでの報告もこのモデルを支持している。今後は、基質との共結晶の構造解析や、Ser116、Asn140、Asn188 を変異させた酵素の反応性を調べることで、より詳細な反応メカニズムが解明されるものと期待される。

本論文に関する公開審査会は平成 27 年 2 月 7 日、愛媛大学農学部で開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査会で本論文の内容を慎重に審議し、審査委員全員一致して博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判定した。