

氏名	稗田 直樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3405号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Structure Analysis of Diol Dehydratase-Reactivating Factor and Characterization of Ethanolamine Ammonia Lyase-Reactivating Factor (ジオールデヒドラターゼ再活性化因子の構造解析およびエタノール アミンアンモニアリアーゼ再活性化因子の確認)
論文審査委員	教授 虎谷 哲夫 教授 中西 一弘 教授 酒井 裕

学位論文内容の要旨

アデノシルコバラミン(AdoCbl)関与酵素のジオールデヒドラターゼ(DD)およびエタノールアミンアンモニアリアーゼ(EAL)は生理的基質により不活性化を受ける。この不活性化は酵素に結合した補酵素が損傷を受け、酵素から解離しないために起こる。DD再活性化因子(DDR)は、不活性化したDDから損傷補酵素を解離させることにより、これを再活性化することが知られている。本研究では、立体構造に基づいたDDRの精密作用機構の解明を目的として、DDRの結晶構造解析を行った。また、他のAdoCbl関与酵素における再活性化因子の存在の一般性を調べる目的で、EAL再活性化因子(EALR)の同定および作用機構の解析を行った。

DDRを精製、結晶化し、ADP結合型およびヌクレオチドフリー型の結晶を得た。これらの結晶構造を解析・比較した結果、ADPの結合によりDDR α サブユニットの構造が変化し、 α サブユニットのインサートドメインと β サブユニットとの接触面積が減少することが判明した。また、DDR β サブユニットとDD β サブユニットの構造の類似が見られた。これらの事実から、DDR β サブユニットがDD β サブユニットと置換することでDD-DDR複合体が形成され、両 α サブユニット間で立体反発が起きることでDDの立体構造が変化し、損傷補酵素がDDから解離する、という分子機構が強く示唆された。

EALを発現させた大腸菌を用いて、失活EALがATP、 Mg^{2+} および遊離のAdoCbl存在下で再活性化されることを確認できた。この再活性化には*eutA*遺伝子産物(EutA)のみが必須であった。精製EutAも失活EALの再活性化能を持っていた。従って、EutAがEALRであると同定できた。EALRの作用を調べたところ、EALRは上方配位子にアデニン環を持たないコバラミンが結合したEALにのみ作用し、上方配位子にアデニン環を持たないコバラミンをEALから解離させることが示された。また、EutAモノマーがEALR活性に主要な役割を果たすことが明らかとなった。これらの点から、EALRはDDRと作用は同様であるが、詳細な機構は異なることが示唆された。

論文審査結果の要旨

アデノシルコバラミン(AdoCbl) (ビタミン B₁₂ 補酵素) 関与酵素であるジオールデヒドラーゼ (DD) およびエタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) はラジカル機構で触媒し、また生理的基質によって機構依存的に不活性化を受けるという興味深い性質を示す。この不活性化は酵素に結合した補酵素が損傷を受け、酵素から解離しないために起こる。こうして不活性化された DD は DD 再活性化因子(DDR)によって再活性化を受ける。DDR は DD から損傷補酵素を解離させることにより、これを再活性化することが知られている。本研究では、DDR の精密作用機作の解明を目的として、DDR の結晶構造解析が行われた。また、再活性化因子の存在の一般性を調べる目的で、別の AdoCbl 関与酵素である EAL の再活性化因子(EALR)の同定および性質と作用機作の解析も行われている。

DDR が精製され、ADP 結合型およびヌクレオチド非結合型として結晶化された。結晶構造解析の結果、ADP の結合により DDR α サブユニットの構造が変化することで、 α サブユニットと β サブユニットとの接触面積が減少し、相互作用が弱くなることが示唆された。また、DDR β サブユニットと DD β サブユニットの間には類似したフォールドが見られた。したがって、DDR β サブユニットが DD β サブユニットにより置換されることで DD-DDR 複合体が形成され、この複合体において両 α サブユニット間の立体反発により DD の立体構造が変化し、損傷補酵素が DD から解離するという分子機構が強く示唆された。一方、機構依存的に不活性化された EAL は ATP、Mg²⁺ および遊離 AdoCbl の存在下で再活性化されることが大腸菌で示された。この再活性化には *eutA* 遺伝子産物 (EutA) が必須であり、精製 EutA は EAL 再活性化能をもっていた。したがって、EutA が EALR であると同定された。EALR は上方配位子にアデニン環をもたないコバラミンを EAL から解離させるが、アデニン環をもつコバラミンは解離させないことが示された。さらに、EutA はマルチマーを形成し易いが、EALR 活性にはモノマーが重要であるという結果も得ている。

以上のように本研究では、アデノシルコバラミン関与酵素の再活性化に与る蛋白質に関して、重要かつ独創的な新知見が得られている。よって、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと認める。