

学 位 論 文 題 名

Carbon-carbon bond formation and degradation
by biocatalysts : structural and mechanistic studies
of specific enzymes by X-ray crystallography

(天然触媒による炭素炭素結合の形成と開裂：

X線結晶構造解析を用いた蛋白質構造・機能相関の解明)

学位論文内容の要旨

蛋白質は進化の過程において、最も有利な立体構造をとるものに淘汰され現在に至ると考えられる。残基種および残基配置の一つ一つが精緻なセレクションの結果であり、必然性の集合が蛋白質(群)を為している。酵素であれば活性部位を手がかりにして、この必然性に迫ることができよう。本論文では炭素炭素結合の形成、分解に関わる二種の酵素について、精巧な立体構造に裏打ちされた合理的な触媒化学反応を述べる。蛋白質が織りなす様々な生命化学現象を説明するため、すなわち構造・機能相関を論じる上で立体構造情報が不可欠である。本研究はそれぞれ、X線結晶構造解析により得られた構造情報と生化学的な手法を組み合わせ、酵素反応の本質に迫ったものである。補酵素要求性 ACC deaminase および世界初 Diels-Alderase である macrophomate synthase について、個別に述べる。

高等植物において、成長を高度に制御する植物ホルモンとしてエチレンの存在が知られるが、エチレンの前駆物質は三員環を側鎖に持ったアミノ酸 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) である。ACC は三員環構造ゆえに分解されにくい、植物体内では ACC oxidase によりエチレンへと変換される。一方 ACC を唯一の窒素源とする生物は、ACC deaminase によって ACC を分解し利用している。ACC deaminase は補酵素としてビタミン B6 の活性型である pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を保持する。基質 ACC は α -プロトンを持たないために、通常の PLP 酵素と異なる反応機構を要求する。酵母 *Hansenula saturnus* 由来の野生型 ACC deaminase の立体構造から、Lys51, Ser78, Tyr269, Tyr295, Glu296 の各残基に変異を導入し諸性質を調べると共に、Lys51, Tyr295 については ACC との複合体の構造解析も行った。反応中間体構造は巧妙な酵素反応を解明する上で多くの情報を提供する。ACC deaminase では活性残基である lysine の側鎖が、メチレン側鎖よりプロトンを引き抜くという新しい知見をもたらした。ACC deaminase が他に採用している戦略としては、基質三員環をより electron-deficient にするために、潜在的エレクトロンシン

クである PLP ピリジン環および基質 α -カルボン酸の電子吸引基としての能力を調節することが挙げられた。これらの調節因子は、反応中間体構造から具体的に明らかになったものであるが、小さな基質を分解するために 342 残基もの蛋白質が必要な理由が垣間見える。

Diels-Alder 反応はジエンとジエノフィルからシクロヘキセンを協奏的に生成する反応であり、環状物質の合成に多用される。D. Hilvert らは抗体を利用して Diels-Alderase を創製することに成功した。構造解析も行われており、活性部位と反応効率の相関が示されている。しかし、天然に多く存在することが予測される natural Diels-Alderase については、反応系が複雑なこともあって研究が難航している。人工型の触媒抗体に比べて選択圧を受け、より進化した天然型は触媒効率が非常に高く、その活性部位が採用している戦略は非常に有用であろう。Macrophomate synthase は 2-pyrone とピルビン酸を基質とする Diels-Alderase であるが、その他に二度の脱炭酸、二度の脱水を行う多段階触媒である。オキザロ酢酸脱炭酸酵素としての触媒効率は、現在までに発見されているもののうち、もっとも高い。野生型酵素の構造解析から、ヘリックス交換型 $\alpha\beta$ パレル単量体より成る、MPS 六量体機能単位の構造を明らかにした。マグネシウムイオンが存在する活性部位にはピルビン酸が配位していたため、基質認識に関して多くの知見を得ることができた。活性部位には反応を加速させる二種の水素結合が存在し、一般的に Diels-Alderase で大きな問題となる生成物阻害を回避するためのコンフォメーション変化を許容する環境を明らかにすることができた。水素結合の重要性は変異の導入によりさらに裏付けられた。抗体触媒のうち、最も反応性に富む 1E9 と MPS では生成物阻害を回避する工夫は同じと言える。現在までに発見されている MPS を含む天然型 Diels-Alderase では、基質としてより活性化されたジエンまたはジエノフィルを利用しており、抗体触媒ではなし得ない造形が施されている。また、基質の取り込みや生成物の排出にも工夫がみられる。MPS では活性部位を覆っているループ部分は柔軟性に富み、晶系間で互いに異なるコンフォメーションをとっていた。これらの戦略は、より効果的な抗体触媒を設計する上で貴重な情報である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 助教授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

Carbon-carbon bond formation and degradation by biocatalysts : structural and mechanistic studies of specific enzymes by X-ray crystallography

(天然触媒による炭素炭素結合の形成と開裂：

X線結晶構造解析を用いた蛋白質構造・機能相関の解明)

蛋白質の構造・機能相関を論じる上で、立体構造情報は不可欠である。本論文は、炭素-炭素結合の形成と分解に関わる二種の酵素、ACC deaminase と macrophomate synthase について、X線結晶構造解析法と生化学的な手法を組み合わせ、酵素反応の本質を追求したものである。

高等植物において、成長を高度に制御する植物ホルモンとしてエチレンの存在が知られている。エチレンの前駆物質は三員環を側鎖に持ったアミノ酸 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) である。ACC は三員環構造ゆえに分解されにくい、ACC を唯一の窒素源とする生物は、ACC deaminase によって ACC を分解し利用している。ACC deaminase は補酵素としてビタミン B6 の活性型である pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を保持する。基質 ACC は α -プロトンを持たないために、通常の PLP 酵素と異なる反応機構を要求する。本学位論文では、酵母 *Hansenula saturnus* 由来の野生型 ACC deaminase の立体構造から、Lys51, Ser78, Tyr269, Tyr295, Glu296 の各残基に変異を導入し、諸性質を調べると共に、Lys51, Tyr295 については ACC との複合体の構造解析も行つて反応機構を構造生物学的に調べた。その結果、ACC deaminase では活性残基であるリジンの側鎖が、メチレン側鎖よりプロトンを引き抜くという新しい知見をもたらした。また、基質三員環をより electron-deficient にするために、潜在的電子シンクである PLP ピリジン環および基質 α -カルボン酸の電子吸引基としての能力を調節していることを、反応中間体構造から具体的に明らかにした。

Diels-Alder 反応はジエンとジエノフィルからシクロヘキセンを協奏的に生成する反応であり、環状物質の合成にとって非常に重要な反応である。Diels-Alder 反応を触媒する酵素 Diels-Alderase の研究については、これまでに抗体を利用した Diels-Alderase の創製研究が行われ、また、立体構造解析にもとづいた活性部位と反応効率の相関も示されている。しかし、天然に多く存在することが予測される天然型 Diels-Alderase については、その立体構造情報は皆無であった。人工型の抗体触媒に比べて、選択圧を受け、より進化した天然型は触媒効率が高く、その活性部位が採用している酵素戦略は、抗体触媒のような触媒を創製する研究にとって非常に有用である。本研究では、Macrophomate synthase の立体構造を、天然型 Diels-Alderase としてはじめて、解明した。Macrophomate synthase は 2-pyrone とピルビン酸を基質とする Diels-Alderase であるが、二度の脱炭酸、二度の脱水を行う多段階触媒でもある。解析から、本酵素が $\alpha\beta$ バレル構造を基本単位とした六量体の分子であり、活性部位にはマグネシウムイオンとそれに配位したピルビン酸が結合していることを明らかにした。この構造は、本酵素が Aldorase と進化上類縁の酵素であることを示している。また、Diels-Alder 反応を加速させる二種の水素結合が、酵素と 2-pyrone の間に存在することを変異体の作製によって証明した。さらに、抗体触媒で問題にされている生成物阻害を回避するための天然酵素の構造、Diels-Alder 反応に伴う基質の大きなコンフォメーション変化を許容する反応部位の環境、基質や生成物の取り込みと排出に関与しているだろう活性部位を覆うループ構造の存在など、Diels-Alderase の活性部位に関する多くの新しい発見を行った。天然型 Diels-Alderase のとっているこれらの戦略は、より効率的な抗体触媒を設計する上で貴重な情報である。

以上、本論文は、炭素—炭素結合の形成と分解に関わる二種の酵素の構造を決定することにより、その構造、機能相関を明らかにしたものであり、本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。