

学 位 論 文 題 名

Molecular evolution and highly active catalytic
mechanism of the monomeric isocitrate dehydrogenase
studied by X-ray crystallography

(単量体型イソクエン酸脱水素酵素の分子進化および
高活性機構に関する構造学的研究)

学位論文内容の要旨

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) は、クエン酸回路の律速段階であるイソクエン酸から α ケトグルタル酸への酸化的脱炭酸化反応を触媒し、その多くが多量体で機能を発現する。これまでに大腸菌由来の二量体型 IDH に関して多くの結晶構造が報告され、その活性部位がサブユニット界面に存在し、両方のサブユニットからの残基が基質および補因子認識に関与することが明らかにされている。一方、多量体型 IDH との間に一次構造相同性を持たない単量体型 IDH が数種の真正細菌からのみ見つかった。興味深いことに、単量体型 IDH は多量体型 IDH と比較して非常に高い活性を発現する。本研究では、単量体型 IDH の基質-Mn²⁺複合体、および NADP⁺複合体の最初の結晶構造を示し、その構造情報から、本酵素の極めて特徴的な分子進化の過程、および触媒反応高活性化の構造学的基盤を明らかにした。以下に論文の内容に沿った要旨を示す。

単量体型 IDH は、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* から直接単離し、基質および Mn の存在下で結晶化を行った。しかしながら得られた結晶は非常に壊れ易く、構造解析のために必要な重原子誘導体の調製は極めて困難であったため、補因子である Mn の異常分散シグナルを利用した多波長異常分散 (MAD) 法により、1.95 Å 分解能での構造解析に成功した。単量体型 IDH のフォールディングは、明らかに二量体型 IDH と共通なトポロジーから成り、二量体型 IDH のひとつのサブユニット全体と、もう一方のサブユニットの部分構造とが融合することで成り立っていた。このような特異な構造を形成することで、サブユニット界面に存在する二量体型 IDH の活性部位と相同な活性部位構造を、単量体構造の中に持つことを可能にしていた。また、単量体型 IDH の大ドメインは、ふたつの相同な構造モチーフが繰り返すことにより成り立っており、立体構造をもとにアミノ酸配列のアライメントを行った所、これらの構造モチーフ間で部分的な残基の保存が見られた。つまり単量体型 IDH の立体構造は、遺伝子の部分的重複によって生まれたと結論付けられる。両 IDH 間に活性残基以外に一次構造の相同性がほとんど見られないのは、遺伝子の部分重複の後、単量体型 IDH が熱力学的に安定なフォールディングを再び取り戻した

め、度重なる変異や挿入、欠失を受け入れてきた結果であるだろう。一般に蛋白質は単量体から多量体へと進化するとされ、ドメイン・スワッピングによる分子進化仮説によって支持されている。これに対して単量体型 IDH は、構造的に二量体型 IDH の特徴をよく備えており、また二量体型 IDH の広範囲に渡るサブユニット界面を、ドメイン界面に置き換えて保存していることから、明らかに二量体型 IDH から進化してきたと考えられる。このような分子進化経路はこれまでに提唱されておらず、単量体から多量体へと向かう分子進化と対照的である。

次に、単量体型 IDH が高活性である理由を構造的に明らかにするため、NADP⁺複合体の構造解析を行った。構造解析の結果、単量体型 IDH の NADP⁺認識様式が二量体型 IDH と大きく異なっていることが明らかになった。これは基質認識残基がほぼ完璧に保存されているのとは異なり、NADP⁺特異性が進化の過程で独立に獲得されたことを示唆している。本構造解析で最も注目すべき事実は、NADP⁺のニコチンアミドリボースと酵素との間にいくつかの水素結合が形成されていたことである。大腸菌由来の二量体型 IDH-NADP⁺複合体構造では、このニコチンアミドリボース部位は完全にディスオーダーしていることが既に表示されている。これは、単量体型 IDH のニコチンアミドを認識している Asn85-Ser87 にあたる残基が二量体型 IDH には存在しないためと考えられる。また、今回解析した NADP⁺複合体の構造を先に解析した基質-Mn²⁺複合体の構造に重ね合わせ、想定される初期 ES 複合体のモデルを構築したところ、NADP⁺の反応点とイソクエン酸の2位炭素間のジオメトリーが、一般的にヒドリド転移反応が起こるとされる範囲内に位置できることが確かめられた。すなわちこれは、基質と NADP⁺は共に、互いが存在しない状態であってもヒドリド転移可能な状態で酵素に結合し、待機できることを示している。NADP⁺と酵素間の相互作用が必要以上に増えることは、NADPH と酵素間の親和性も増すため、代謝回転数を上げるためには好ましくないだろう。単量体型 IDH に見られるニコチンアミドリボース部位の固定は、必要最小限の相互作用により、飛躍的な機能の高性能化を実現している天然酵素の興味深い戦略と言える。ニコチンアミド固定の役割を果たすループ領域は、遺伝子の部分重複により二量体から単量体へと進化した過程で獲得されたと考えられる。

本学位論文では、構造解析の手法に関しても詳細に記述した。単量体型 IDH の構造解析は、天然の補因子 Mn との複合体結晶を用い、Mn の異常分散を利用した MAD 法を用いて行った。Mn の K 殻吸収端は波長約 1.9 Å と低エネルギー領域に存在するため、X 線の吸収が大きく、結晶の放射線損傷が顕著となり、誤差の少ない回折データ収集が困難となる。本解析では、プログラム SCALA を用いた波長間の相対スケージング、およびディテクター (x, y) とイメージ (z) 方向での三次元スケージングを行い、この誤差を最大限に取り除いた。さらに別の晶系に属する結晶のデータとの間で結晶間電子密度平均化法を行い構造決定に成功した。Mn を用いた MAD 法の成功は本研究が最初である。本研究は、Mn を用いた MAD 法が生体高分子結晶学の分野において十分に現実的手法であることを示したものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	勲
副査	教授	新田	勝利
副査	助教授	佐々木	直樹
副査	助教授	渡邊	信久

学位論文題名

Molecular evolution and highly active catalytic mechanism of the monomeric isocitrate dehydrogenase studied by X-ray crystallography

(単量体型イソクエン酸脱水素酵素の分子進化および
高活性機構に関する構造学的研究)

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) は、クエン酸回路の律速段階であるイソクエン酸から α ケトグルタル酸への酸化的脱炭酸化反応を触媒する。これまでに大腸菌由来の二量体型 IDH に関して多くの結晶構造が報告され、その活性部位がサブユニット界面に存在し、両方のサブユニットからの残基が基質および補因子認識に関与することが明らかにされている。一方、二量体型 IDH との間に一次構造の相同性を持たない単量体型 IDH が数種の真正細菌から見つかっている。興味深いことに、単量体型 IDH は二量体型 IDH と比較して非常に高い活性をもつ。本研究は、単量体型 IDH の基質-Mn²⁺複合体、および NADP⁺複合体の最初の結晶構造を示し、その構造情報から、本酵素の極めて特徴的な分子進化の過程、および触媒反応高活性化の構造学的基盤を明らかにしたものである。

単量体型 IDH の構造解析は、補因子である Mn の異常分散シグナルを利用した多波長異常分散 (MAD) 法により、1.95 Å 分解能で行われた。解析の結果、単量体型 IDH のフォールディングは、二量体型 IDH と共通なトポロジーから成り、分子は、二量体型 IDH のひとつのサブユニットに、もう一方のサブユニットが部分的に融合することで成り立っていた。このような特異な構造を形成することで、サブユニット界面に存在する二量体型 IDH の活性部位と相同な活性部位構造を単量体構造の中に持つことを可能にしていた。また、単量体型 IDH の大ドメインは、ふたつの相同な構造モチーフが繰り返すことにより成り立っており、立体構造をもとにアミノ酸配列のアライメントを行った所、これらの構造モチーフ間で部分的な残基の保存が見られた。こうした事実から、単量体型 IDH

の立体構造は、遺伝子の部分的重複によって生まれたと結論付けられ、また、両 IDH 間に活性残基以外に一次構造の相同性がほとんど見られないのは、遺伝子の部分重複の後、単量体型 IDH が熱力学的に安定なフォールディングを再び取り戻すため、度重なる変異や挿入、欠失を受け入れてきた結果であると考えられた。単量体型 IDH は、構造的に二量体型 IDH の特徴をよく備えており、また二量体型 IDH の広範囲に渡るサブユニット界面を、ドメイン界面に置き換えて保存していることから、明らかに二量体型 IDH から進化してきたと考えられた。このような分子進化経路はこれまでに提唱されておらず、単量体から多量体へと向かう分子進化と対照的である。

次に、単量体型 IDH が高活性である理由を構造学的に明らかにするため、NADP⁺複合体の構造解析が行われた結果、単量体型 IDH の NADP⁺認識様式が二量体型 IDH と大きく異なっていることが明らかになった。これは基質認識残基がほぼ完璧に保存されているのとは対照的であり、NADP⁺特異性が進化の過程で独立に獲得されたことを示唆している。本構造解析で最も注目すべき事実は、NADP⁺のニコチンアミドリボースと酵素との間にいくつかの水素結合が形成されていたことである。大腸菌由来の二量体型 IDH-NADP⁺複合体構造では、このニコチンアミドリボース部位は完全にディスオーダーしていることが既に表示されている。これは、単量体型 IDH のニコチンアミドを認識している Asn85-Ser87 にあたる残基が二量体型 IDH には存在しないためと考えられる。また、NADP⁺複合体の構造を基質-Mn²⁺複合体の構造に重ね合わせ、想定される初期 ES 複合体のモデルを構築したところ、NADP⁺の反応点とイソクエン酸の 2 位炭素間のジオメトリーが、一般的にヒドリド転移反応が起こるとされる範囲内に位置できることが確かめられた。すなわちこれは、基質と NADP⁺は共に、互いが存在しない状態であってもヒドリド転移可能な状態で酵素に結合し、待機できることを示している。単量体型 IDH に見られるニコチンアミドリボース部位の固定は、必要最小限の相互作用により、飛躍的な機能の高性能化を実現している天然酵素の興味深い戦略と言える。ニコチンアミド固定の役割を果たすループ領域は、遺伝子の部分重複により二量体から単量体へと進化した過程で獲得されたと考えられる。

単量体型 IDH の構造解析は、天然の補因子 Mn との複合体結晶を用い、Mn の異常分散を利用した MAD 法を用いて行われたが、Mn の K 殻吸収端は波長約 1.9 Å と低エネルギー領域に存在するため、X 線の吸収が大きく、結晶の放射線損傷が顕著となり、誤差の少ない回折データ収集が困難となる。本解析では、波長間の相対スケールリング、三次元スケールリングなどにより、この誤差を最大限に取り除き、さらに別の晶系に属する結晶のデータとの間で結晶間電子密度平均化法を行い構造決定に成功したものである。

以上、本研究は、Mn を用いた MAD 法を適用することにより、単量体型 IDH の基質-Mn²⁺複合体、および NADP⁺複合体の立体構造を解明し、同酵素の分子進化

と活性について詳細に研究したものである。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）の学位を得る十分の資格があるものと認めた。