

論文内容の要旨

申請者氏名 齋藤 洋太郎

本論文では、ポリアミン合成の際に生じる副産物に含まれる還元硫黄をメチオニンに再生するメチオニン還元硫黄再生経路で働く3つの酵素群の解析を行い、それぞれにおける反応機構を考察した。3酵素はアミノ酸配列において、実際に触媒する反応とは別の機能を有するタンパク質と相同性を持つというユニークな特徴を示す。

1つ目の酵素、メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼは真核型翻訳開始因子 eIF2B の α サブユニットと約 20% の相同性を有す。基質はヘミアセタール基にリン酸を有するので鎖状型アルドースを形成できない。そのようなアルドース糖の開環反応を触媒する酵素の速度定数を明らかにしたのは本研究が初めてである。また、重水を用いた NMR 解析や MS 解析の結果から、触媒時のプロトン移動中に溶媒からのプロトンの取り込みが極めて起こり難いことを明らかにした。相同性を持つタンパク質の基質結合型、非結合型の立体構造の比較から、活性中心が基質結合に伴い大きく構造を変化させ、活性中心を外界から遮断することが予想され、触媒中に溶媒とのプロトン授受が起こり難いという実験結果と合致した。

2つ目の酵素、メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼはアミノ酸配列において、クラス II 型のアルドラーゼファミリーと約 20% の相同性を示す。特に、金属結合やリン酸結合、プロトンの授受に働くとされるアミノ酸が保存されていた。実際に金属を強固に結合させており、部分的に金属を取り除くことで活性が大幅に減少したことから、他のアルドラーゼファミリーと同様に、触媒に金属を必要とすることが示唆された。生成物である 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸は不安定であり、その分解速度を求めたところ、半減期が比較的短いことがわかった。そのため、多くの生物においてこのデヒドラターゼとジケトを基質とするエノラーゼがオペロンを形成していることは、両酵素の量比を調節することで代謝効率を高めるために重要であると考えられた。

3つ目の酵素、2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼ（以下エノラーゼと略記）はアミノ酸配列において、光合成/化学合成における CO_2 固定酵素リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) と約 20% の相同性を示す。RuBisCO のエンジオール化における必須触媒残基に相当するアミノ酸残基に対して置換変異を施したところ、変異エノラーゼはすべて活性を失った。また、RuBisCO の基質、反応中間体、生成物がいずれもエノラーゼの活性を競合的に阻害した結果から、エノラーゼは RuBisCO と似た結合特異性を持つ活性中心を有し、エンジオール化の反応においては RuBisCO が行うエンジオール化と同様の触媒残基を用いていることが示唆された。

これら 3 種のタンパク質は、構造や機能面において相同性を有しているタンパク質と配列から予想された以上に分子進化上非常に深い関係にあると考えられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 齋藤 洋太郎

メチオニン還元硫黄再生経路は細菌、酵母、植物、ラット、ヒトなど多くの生物が有していることが知られている。メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼ、メチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼ、2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼの3酵素は、アミノ酸配列において他の機能を持つタンパク質、それぞれ、真核型翻訳開始因子 eIF2B α 、糖代謝酵素アルドラーゼ、CO₂固定酵素 RuBisCO と相同性を示し、かつ同じ物質を基質とする酵素が他に無いというユニークな酵素であることから、*B. subtilis* リコンビナントタンパク質を用いて酵素学的諸性質を決めると共に、反応機構を解析した。

第1章では、メチルチオリボース 1-リン酸イソメラーゼの解析では、生化学、構造学の両アプローチから、活性部位の疎水的環境を考察し、アルドースケトースイソメラーゼの中でも極めて珍しいヒドリド移動機構を証明した。これまでにヒドリド機構が照明されたアルドースケトースイソメラーゼはキシロースイソメラーゼしかなく、本イソメラーゼの解析は、アルドースイソメラーゼの反応機構に関する新しい知見、特に環状糖の開環反応における新たなモデルを提供した。

第2章のメチルチオリブロース 1-リン酸デヒドラターゼの解析では、その酵素化学的性質の解明に加え、反応生成物の分解特性を明らかにした。連続する反応を触媒する酵素がオペロン構造を有することの代謝効率の観点から意義付けた。

第3章における枯草菌 2,3-ジケト 5-メチルチオペンチル 1-リン酸エノラーゼの解析では、種々の相同タンパク質のエノラーゼ活性を測ることから触媒残基の候補を絞り、さらに相同性を持つ RuBisCO の先行する研究結果との比較から、触媒残基を考察した。触媒残基の同定までには至らなかったが、カルバメート化処理が活性に及ぼす影響の RuBisCO とエノラーゼとの違いは両者の反応機構や触媒残基の違いを考察する上で意義深い。逆に、RuBisCO とエノラーゼとの共通点として、RuBisCO が触媒する RuBP カルボキシラーゼ反応の基質、生成物、反応遷移状態アナログで両者が特異的に阻害される事実は実に驚くべき結果であった。特に遷移状態アナログは構造異性体では阻害されないことから、枯草菌エノラーゼの活性中心部位の構造が RuBisCO に極めて近いものであることが示唆された。

以上のように、本論文は枯草菌のメチオニン還元硫黄再生経路で働く酵素群の酵素学的諸性質と関連するタンパク質との進化的関連性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。