

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 那須野 亮

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b 株に見出した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、プロリン代謝中間体 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸/グルタミン酸- γ -セミアルデヒド (P5C/GSA) のアセチル化により、プロリン (Pro) とアルギニン (Arg) の代謝を連結し、Arg からの一酸化窒素 (NO) 合成に関与することで、細胞に酸化ストレス耐性を付与する。一方、Mpr1 はその一次構造から Gcn5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) スーパーファミリーに属すると考えられるが、Mpr1 は他の GNAT タンパク質とは異なり環状二級アミンを基質とするため、Mpr1 は新規の立体構造や反応機構を有する可能性がある。そこで本研究では、Mpr1 の立体構造の決定と触媒反応機構の解析を行った。

まず、大腸菌から組換え酵素として精製した Mpr1 を用いて結晶を調製し、X 線結晶構造解析を試みた。その結果、セレノメチオニン導入型 Mpr1、野生型 Mpr1、および Mpr1-基質複合体の構造をそれぞれ 2.1Å、1.9Å、2.3Å の分解能で決定した。Mpr1-基質複合体構造から、基質のカルボキシル基が Asn135 の側鎖アミドおよび Asn172 と Leu173 の主鎖アミドと結合していることが明らかになった。また、Mpr1 は既知の GNAT タンパク質に保存されている β -bulge 構造を取っておらず、基質である環状二級アミンの結合による立体障害を回避していることが示唆された。次に、Mpr1 と立体構造が類似したタンパク質の構造を用いて、Mpr1 におけるアセチル CoA (AcCoA) 結合部位を推定した。その結果、AcCoA のカルボニル酸素が Phe138 の主鎖アミドの NH 基と、硫黄原子が Asn178 の側鎖とそれぞれ結合することが示唆された。これらのアミノ酸残基の置換体について速度論的解析を行ったところ、Asn135Ala-Mpr1 は野生型酵素に比べて約 20 倍の K_m 値を、Asn178Ala-Mpr1 は約 1/40 の k_{cat} 値をそれぞれ示し、Asn135Asp-Mpr1 と Asn178Asp-Mpr1 は活性が検出されなかった。一方、Mpr1 の反応機構を速度論的に解析するため、各基質濃度における反応初速度を測定した。Lineweaver-Burk プロットの結果から、Mpr1 による触媒反応は Mpr1-AcCoA-基質の三者複合体を介して逐次機構により進行することが明らかになった。以上の結果から、基質のカルボキシル基を Asn135、Asn172、Leu173 が認識・結合し、Asn178 が反応中間体分解後に生成するチオレートアニオンを安定化することで触媒反応が進行すると結論づけた。Asn 残基に依存的な触媒反応や、典型的な β -bulge 構造を有していないなどの特徴から、Mpr1 が新しいタイプの GNAT タンパク質であることが強く示唆された。

一方、Mpr1 の遺伝子破壊株では、高温などの酸化ストレスによって細胞内の P5C 含量が増加するが、活性が消失した Asn135Asp-Mpr1、Asn178Asp-Mpr1 を発現させた酵母においても、野生型 Mpr1 発現株に比べてストレス処理後の P5C 含量が有意に増加した。以上の結果から、Mpr1 の生理機能 (P5C/GSA のアセチル化を介した細胞への抗酸化能付与) においても、Asn135 と Asn178 が重要な残基であることを明らかにした。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 那須野 亮

酵母 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、プロリン (Pro) とアルギニン (Arg) の代謝を連結し、Arg からの一酸化窒素 (NO) 合成に関与することで、細胞に酸化ストレス耐性を付与する。Mpr1 は Gcn5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) に分類されるが、Mpr1 は既知の GNAT タンパク質とは異なり、環状二級アミンを基質とする。申請者は Mpr1 の立体構造と反応機構の解析を行い、以下に示す重要な結果と知見を得た。

- 1) 大腸菌から組換え酵素として精製した Mpr1 を用いて結晶を調製し、X線結晶構造解析を行った。その結果、セレノメチオニン導入型 Mpr1、野生型 Mpr1、および Mpr1-基質複合体の構造を、それぞれ 2.1 Å、1.9 Å、2.3 Å の分解能で決定した。
- 2) Mpr1-基質複合体の構造から、基質のカルボキシル基が Asn135 の側鎖アミドおよび Asn172 と Leu173 の主鎖アミドと結合していることを明らかにした。また、GNAT タンパク質に保存される β -bulge 構造を形成しないことで、基質である環状二級アミンの結合による立体障害を回避していることが示唆された。
- 3) 構造類似タンパク質のアセチル CoA (AcCoA) との複合体構造から、Mpr1 の AcCoA 結合部位を予測した。その結果、AcCoA のカルボニル酸素が Phe138 の主鎖アミド NH 基と、硫黄原子が Asn178 の側鎖アミドとそれぞれ結合することが示唆された。
- 4) 立体構造から推定される活性残基のアミノ酸置換体について、速度論的解析を行った。その結果、Asn135Ala-Mpr1 が基質に対して野生型酵素の約 20 倍の K_m 値を、Asn178Ala-Mpr1 が約 1/40 の k_{cat} 値をそれぞれ示し、Asn135Asp-Mpr1、Asn178Asp-Mpr1 は活性が検出されなかった。このことから、Asn135 が基質のカルボキシル基を認識し、Asn178 は反応中間体分解後に生じるチオレートアニオンを安定化・プロトン化することで反応を触媒すると結論づけた。
- 5) Asn135Asp-Mpr1、および Asn178Asp-Mpr1 を酵母で発現させると、野生型酵素発現株に比べて高温ストレス処理後の P5C 含量が増加したことから、Asn135 および Asn178 は Mpr1 の生理機能においても重要であることが明らかとなった。

本研究では、Mpr1 の立体構造を決定し、基質認識を含む触媒反応機構を明らかにした。また、同定した活性残基が Mpr1 の生理機能にも重要であることを示した。

β -bulge を形成しないユニークな構造と Asn 残基依存的な触媒機構は、Mpr1 が GNAT スーパーファミリーにおいて「環状二級アミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ」という新しい一群を形成することを強く示唆している。また、今回の知見は応用面でも、酵母の酸化ストレス耐性を向上させる変異型 Mpr1 の分子設計に資すると期待できる。

以上のように、本論文は新規アセチルトランスフェラーゼの構造と反応機構を明らかにしたものであり、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。