

論文内容の要旨

申請者氏名 CHEK MIN FEY

石油化学によるプラスチックの多くは自然界では難分解性であり、ゴミ処理問題、焼却による地球温暖化、あるいは海洋汚染等といった環境問題の原因となっている。この一つの解決策として、生分解性プラスチックによる代替が注目されている。微生物学によると、多くの細菌は、窒素やリン等の栄養素が欠乏している環境下で炭素源が豊富な時には、ポリエステルであるポリ水酸化アルカノネート (polyhydroxyalkanoate, PHA) を細胞内で合成して不溶性の顆粒として蓄積するが、一方で、炭素欠乏時には、この PHA を自ら分解して炭素源として活用する。すなわち、PHA は完全生分解性プラスチックであり、上記社会問題解決のための工業化の最有力標的となっている。PHA 生合成の鍵酵素は、生合成の最終段階で働く PHA ポリメラーゼ (PhaC) であり、水酸化アルキルカルボン酸でアシル化されたコエンザイム A (CoA) であるアシル CoA (acyl-CoA) を基質として、モノマーの水酸基とカルボキシル基を利用して、ポリエステルを重合する。PhaC の酵素活性と特異性によって、PHA の重合度や重合されるモノマーの種類が選択されることで、生成プラスチックの可塑性や伸張性等の工業化に向けての重要な物性が決定される。申請者は、現在知られている PhaC の中で最も活性が高いとされているクロモバクテリウム sp. USM2 (*Chromobacterium* sp. USM2) 由来の PhaC (PhaC_{Cs}) の三次元構造の研究を進めた。その結果、遊離状態の C-末端側の触媒ドメイン (PhaC_{Cs}-CAT) と、基質類似体である CoA 結合状態 (PhaC_{Cs}-CAT+CoA) の 2 つの結晶構造をそれぞれ分解能 1.48 Å と 3.10 Å で決定した。これにより、PhaC は α/β ヒドロラーゼに類似した α/β コアサブドメインと α ラセンからなる CAP サブドメインにより構成されることや、CAP サブドメインを通して二量体化することがわかった。活性部位は α/β コアサブドメインの凹みにあり、遊離型では CAP によって覆われていた。一方、CoA 結合型では、CAP サブドメインは α ラセンの巻き戻しや新たな形成を伴った大きなコンホメーション変化を起こして、活性部位が大きく開く。これにより CoA 結合部位を新たに形成しており、CoA 末端の SH 基が活性中心残基 Cys291 と水素結合を形成する位置に CoA が固定されることが判明した。また、本研究の投稿論文作成中に他にグループから報告された *Cupriavidus necator* 由来の PhaC の触媒ドメイン (PhaC_{Cn}-CAT) の遊離型の構造との比較により、触媒ドメインは CAP サブドメインの構造変化に応じて、活性部位の閉鎖型 (fully closed form)、準閉鎖型 (semi-closed form)、部分開放型 (partial open form)、開放型 (fully open form) があり、準閉鎖型と部分開放型はホモ二量体を、閉鎖型と開放型はヘテロ二量体を形成することがわかった。これらの構造変化を統合して、二量体で PHA 鎖が 1 本合成される触媒メカニズムを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 CHEK MIN FEY

生分解性プラスチックとして注目されている PHA の合成酵素（重合酵素）である PhaC は、その酵素活性と基質特異性が生成 PHA の物性を決定する。それ故、PhaC は PHA 生産の工業化においての最重要酵素であり、その研究は 30 年以上も続けられてきた。しかし、酵素の三次元分子構造の決定に成功していなかったために、触媒機構や基質特異性メカニズムが未だに不明であり、蛋白質工学による有用な酵素への変換が遅れていた。そのような状況を克服する第一歩としての本構造研究の価値は高い。また、本研究のクロモバクテリウム sp. USM2 由来 PhaC は、既知 PhaC の中で最も酵素活性が高いとされており、工業的な価値も高い。本研究では、PhaC_{cs} の組み換えタンパク質の精製、三次元構造と物性の解明、更には変異導入や精製酵素試料を用いた酵素学的な解析に成功している。構造解析では、触媒ドメイン PhaC_{cs}-CAT の遊離型と CoA 結合型の 2 状態での三次元構造を X 線回折で決定しており、以下の発見をした。

第一の発見は、活性部位の自己阻害状態である。遊離型状態での構造では、 α/β コアサブドメインにある活性部位が、CAP サブドメインによって覆われており、基質が活性部位に到達するためには、何らかの構造変化が必須であることを見出して、「semi-closed form」と命名した。他研究グループにより報告された遊離型 PhaC_{cr}-CAT の「partial open form」は、人為的な空気酸化による S-S 結合形成が誘起した可能性を指摘した。

第二の発見は、CAP サブドメインを通した二量体化の柔軟性である。CAP サブドメインの構造変化により、触媒ドメインは活性部位の閉鎖、準閉鎖、部分開放、ならびに開放型の 4 つの状態が存在することが本研究と PhaC_{cr}-CAT の研究から明らかになったが、どの状態でも二量体化することがわかった。これは、PhaC の活性には二量体化が必須であるというこれまでの研究結果と矛盾しない。

第三の発見は、CoA 結合における大規模な構造変化である。この大規模な構造変化は CoA 結合部位形成に必須であり、基質であるアシル CoA の CoA 部分の重要性を構造上で説明した。この構造変化は、「fully open form」と「fully closed form」のヘテロ二量体中で起きており、「fully open form」分子の大規模構造変化を「fully closed form」分子の CAP サブドメインが直接の相互作用で安定化していることも明らかにした。

第四の発見は、新しい触媒メカニズムである。本研究で明らかにした構造に基づいて二量体で PHA 鎖が 1 本合成されるという新しい触媒メカニズムを提唱した。

以上のように、本論文は PHA 合成酵素の酵素学や蛋白質工学、PHA 合成の生化学、ならびに PHA 生産の工業化に向けた開発に寄与するもので、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。