

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 福田 英理子

2-オキソ酸の酸化的脱炭酸反応は糖・アミノ酸代謝など、様々な代謝経路において重要な反応であり、通常の生物では分子量数百万におよぶ巨大酵素複合体によって触媒される。それに対し、すべての古細菌、少数の真正細菌、及び一部の真核生物では、2-オキソ酸：フェレドキシン酸化還元酵素 (OFOR) により、フェレドキシンを電子受容体として上記の反応を触媒する。本研究では、好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus* sp. strain 7 のもつ OFOR の構造・機能を解明することを目的とした。

第一章では、研究対象としての古細菌およびそれに由来する酵素 OFOR ファミリーの意義について概説を行った。

第二章では、*Sulfolobus* OFOR の大腸菌を用いた発現系の構築を行い、活性のあるレコンビナント野生型 OFOR を得た。*Sulfolobus* sp. strain 7 から精製した天然型 OFOR と比較した結果、レコンビナント OFOR は調べた全ての点で天然型 OFOR と同一の性質を示し、OFOR ファミリーではじめて安定なレコンビナント OFOR を生成する発現系が構築された。本発現系によって、OFOR ファミリーのタンパク質工学的研究が可能になり、酵素の構造・機能解明の第一歩が確立されたと考えられる。

第三章では、構築された *Sulfolobus* OFOR の発現系を用いて OFOR ファミリーにおいて保存性が高く、機能未知のアミノ酸配列 YPITP モチーフの役割を調べた。*Sulfolobus* OFOR の a サブユニットに見出される本モチーフ (第 253 残基から第 257 残基) に部位特異的変異を導入した結果、YPITP モチーフの第 253 残基には芳香環が必須であり、第 257 残基には Pro が必須であることが明らかになった。それに対して P254、I255、T256 の変異体はいずれも活性を保持していた。*Desulfovibrio africanus* 由来の POR の X 線結晶構造によると、T256 残基の水酸基は基質であるピルビン酸と水素結合していることから、活性に必須であると考えられたが、予想に反して *Sulfolobus* OFOR の T256 の変異体は活性を保持していた。これらの結果から、YPITP モチーフは 2-オキソ酸の認識・結合ではなく、酵素の触媒反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

第四章では、*Sulfolobus* OFOR の 2-オキソ酸結合に関与していると推定されるアミノ酸残基 (a サブユニットの T256, R344, T353, b サブユニットの K49, L123) に部位特異的変異を導入し、その影響を調べた。その結果、a サブユニットの R344 は必須であり、T353 は活性に重要であると考えられた。また、b サブユニットの第 49 残基は OFOR をピルビン酸に特異的な POR 型酵素に、第 123 残基は OFOR を 2-オキソグルタル酸に特異的な KOR 型酵素に決定づけるアミノ酸残基の一つであると推定することができた。

第五章では、*Sulfolobus* OFOR の CoA 結合部位を決定することを試みた。OFOR ファミリーにお

いてCoA認識部位であると推定されるGXXGXXGモチーフのGlyをAlaに置換した変異体の解析を行った結果、本モチーフは活性に重要であることが確認された。また、アデニン環類似体である化学修飾NBD-Fを用いて*Sulfolobus* OFORのラベル化を試みたところ、NBD-FはOFORの活性中心に特異的に結合し、反応を阻害することが明らかになった。また、NBD-Fは*Sulfolobus* OFORのbサブユニットに特異的に結合することが明らかになった。このことから、*Sulfolobus* OFORのCoA結合部位は、サブユニット界面に存在していると推定された。

第六章では、当研究室で同じ*Sulfolobus* sp. strain 7株から発見されたインドール-3-ピルビン酸：メチルビオロゲン酸化還元酵素 (IMOR) の性質を解析した。*Sulfolobus* IMORの基質特異性を調べた結果、インドール-3-ピルビン酸、フェニルピルビン酸などのかさ高い疎水的な側鎖を持つ2-オキソ酸の他、インドールアセトアルデヒド、フェニルアセトアルデヒドなどのアルデヒドも基質とすることが分かった。このことから*Sulfolobus* IMORはアルデヒドオキシダーゼと2-オキソ酸の脱炭酸活性の両者を有しており、全く新規な酵素であることが確認された。

以上、本論文は*Sulfolobus* sp. strain 7のOFORの発現系構築と、それを利用した部位特異的変異体の作成・解析により、OFORの構造・機能に関する新しい知見を与えたものとして、学術上、貢献するところが大きい。よって、審査委員一同は本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。