

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡井 公彦

本論文では、好酸性好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 short-chain flavin reductase HpaC 及び  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADP}^+$  複合体の X 線結晶構造解析を行い、フラビン還元酵素の反応メカニズムとフラビン選択性、 $\text{NAD(P)H}$  依存性について議論している。本論文は第一章の序論、第二章から第四章の HpaC の構造解析、第五章の総合討論の全 5 章より構成されている。

第一章の序論ではフラビン化合物の働きとフラビン還元酵素について述べている。フラビンは生体内の酸化還元反応に広く関わっている物質で酵素反応によって種々の酸化還元状態をとり、電子の受け渡しをおこなっていると説明している。フラビン還元酵素はフラビンを還元する酵素で、生物に広く存在しており、本論文の HpaC もその中のひとつで近年、報告されてきた short-chain flavin reductase ファミリーに属する。本論文では *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の HpaC の構造解析を行い、フラビン還元の詳細なメカニズムを解明することを目的としている。

第二章では、HpaC のフラビン還元活性測定と結晶構造解析について述べている。フラビン還元活性測定では HpaC が  $\text{NADH}$  依存的にフラビンを還元すること、 $\text{FMN} > \text{FAD} > \text{riboflavin}$  の順に還元活性があることを明らかにした。またセレノメチオニン化された HpaC を結晶化し、異常分散効果を用いて構造解析に成功した。

第三章では、HpaC- $\text{NAD}^+$  複合体の結晶構造解析について述べている。HpaC は  $\text{NADH}$  依存的にフラビンを還元することから、基質である  $\text{NADH}$  を結晶にソーキングして複合体の構造解析を行った。

第四章では、HpaC- $\text{NADP}^+$  複合体の結晶構造解析について述べている。 $\text{NADPH}$  依存的な酵素に関しての構造的基盤は変異体や構造解析などにより明らかになってきているが、 $\text{NADH}$  依存的な酵素に関してはほとんど分かっていない。 $\text{NADP}^+$  複合体の構造解析を行い、 $\text{NAD}^+$  複合体と比較することで  $\text{NADH}$  依存的な酵素の構造的基盤の情報を与えることができた。 $\text{NADH}$  と同様にソーキング法を行い、 $\text{NADP}^+$  複合体の構造を得ることに成功した。

第五章では第二章から第四章で得られた 3 状態の構造について議論を行っている。HpaC は構造解析よりダイマーとして存在し、各モノマーは 12 本の  $\beta$  ストランド、3 つの  $\alpha$  ヘリックス、2 つの  $3_{10}$  ヘリックスより成り、中央のパレルが  $\alpha 2$  ヘリックスにキャッピングされた構造をとっていた。

HpaC はフラビン化合物を添加しなくても黄色を呈しており、構造解析から

FMN を結合することを明らかにした。FMN のイソアロキサジン環の *si*-face がタンパク質の内部を向いて基質の結合が不可能であったのに対し、*re*-face は完全に活性ポケットの方を向いていたことから、反応は *re*-face で行われることが分かった。HpaC は同じ short-chain flavin reductase ファミリーの PheA2 と似た全体構造をとっていたが、PheA2 では FAD が結合しているのに対し、HpaC は FMN を結合していた。HpaC と PheA2 の重ね合わせより  $\alpha 3$  ヘリックスと  $\eta 1$  ヘリックス間のループおよび、それに続く  $\eta 1$  ヘリックスで HpaC のほうがよりフラビンに近くに位置しており、この領域の位置が FMN と FAD のどちらと強く相互作用するかを決定していると考えられる。

HpaC-NAD<sup>+</sup>複合体の構造より、NAD<sup>+</sup>がFMNと $\alpha 1$ ヘリックスに挟まれて結合することを明らかにした。NAD<sup>+</sup>のニコチンアミドはFMNのイソアロキサジン環と平行に並んでおり、NADHからFMNへのハイドライドイオンの転移は十分に起こり得る。NAD<sup>+</sup>はニコチンアミドとアデニンがほぼ平行に並んだ非常にコンパクトな構造をとっており、現在までに解かれているNAD(P)<sup>+</sup>の中で最も折りたたまれたものの1つであった。HpaCのNAD<sup>+</sup>はホモログであるFeR (ferric reductase)のNADP<sup>+</sup>とは結合様式が異なっていた。FeRではC末端が $\alpha$ ヘリックスであるのに対し、HpaCは $\beta$ -シートであり、この領域との相互作用の結果がNAD(P)の結合様式を決定していると考えられた。

HpaC-NADP<sup>+</sup>複合体の構造よりNADP<sup>+</sup>がNAD<sup>+</sup>と同じ結合ポケットに入ることが明らかにした。しかしNAD<sup>+</sup>とは逆向きで結合しており、この理由として本論文では結合ポケットの入り口にあるLys6、Lys53との相互作用を挙げている。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。