

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 富田 武郎

細胞質型リンゴ酸脱水素酵素(Malate Dehydrogenase, MDH)はTCAサイクルにおいてNAD⁺を用いてリンゴ酸からオキサロ酢酸への変換を触媒する酵素である。これまでに好熱菌 *Thermus flavus* AT-62 株由来の細胞質型リンゴ酸脱水素酵素のNADHとの複合体の結晶構造解析からtMDHがNAD(H)に対する高い特異性を持つ機構は明らかになっているものの、tMDHがNAD(H)とNADP(H)を識別する分子機構は明らかになっていない。本研究では好熱菌 *T. flavus* AT-62 株由来の野生型リンゴ酸脱水素酵素、および補酵素特異性改変体のNADH、NADPHとの複合体の結晶構造解析を行い、補酵素識別機構の解明を試みている。また、そこで得られた知識を基に、これまで補酵素特異性の変換が難しいとされていた乳酸脱水素酵素(Lactate Dehydrogenase, LDH)の補酵素特異性をNAD(H)からNADP(H)へと変換することを試みている。

第一章は序論である。第二章では、tMDH-NADPH、tMDH-NADP⁺複合体の結晶構造をそれぞれ 1.65、2.08Å分解能で決定している。全体構造は既に構造が決定されているtMDH-NADH複合体とほぼ同一であったが、予想外にNADP(H)は通常とは逆の方向、すなわちアデニン部分が活性中心の近くに、ニコチンアミド部分がtMDH-NADH複合体においてアデニン部分が結合していた部位に向けて結合することを見いだした。このことはNAD(P)(H)は高濃度ではtMDHに逆位に結合し、阻害剤として働くことを示唆していると考えられた。そこで溶液中においても「逆位」に結合し、酵素活性を阻害するのかどうか解析し、NADP⁺に対して 2.6 mMの*K_i*で阻害が起こることを観察した。また、NAD⁺の場合もより高濃度域ではあるが活性の阻害を確認した。同阻害は、NADP(H)が分子内に擬対称性を持つことが原因となっていることから、このような「逆位」の結合が、基本的にはどのNAD(P)(H)依存酵素においても、起こりうる可能性があるとして提案している。これらは、これまでに知られていない補酵素濃度による酵素活性の調節、あるいは代謝調節機構の存在を示唆する新しい発見といえる。

第三章では、tMDHの補酵素特異性改変体 EX7 と NADPH、NADH との複合体の結晶構造をそれぞれ2.00Å分解能で決定している。EX7-NADPH複合体中で、置換されたSer42、Ser45 が NADPH の 2'-リン酸基と水素結合を形成していることが明らかとなった。また、2'-リン酸基結合部位近傍に野生型酵素では見られないいくつかの水分子が導入されており、これらを介した EX7 との水素結合ネットワークも 2'-リン酸基の安定化に寄与していることが示唆された。結晶構造中で NADPH のアデニン部分が観察されなかったため、この部分がヒポキサンチンに置換された補酵素 NHDPH を用いた解析を行った結果、tMDH がアデニンを特異的に認識しているのに比べて、EX7 がアデニンを認識していないことが示され

た。さらに結晶構造中で側鎖の観察されなかった Arg44 の NADPH の認識における役割を調べるため、部位特異的変異を導入し、解析を行った結果、Arg44 が 2'-リン酸基の認識に寄与していることが示唆された。また、EX7-NADPH 複合体と EX7-NADH 複合体の結晶構造を比較した結果、両者で EX7 の構造はほとんど変化していなかったが EX7 は補酵素の 2'-リン酸基の有無を識別する結果、ニコチンアミド部分の安定性、親和性の違いへと反映されていることが明らかとなった。

第四章では tMDH の補酵素特異性変換に有効であった葉緑体 MDH 由来の 7 アミノ酸配列を *Thermus thermophilus* HB27 由来の LDH の相当領域と交換することによって LDH の補酵素特異性を NAD(H) から NAPD(H) へと変換することを試みている。その結果、野生型 LDH では、NADH を使った反応は NADPH のものと比べて 130 倍も高い触媒効率を持つものに対して、それが逆転し、約 4 倍の触媒効率で NADPH の方をよく認識するように補酵素特異性がシフトした酵素の創生に成功している。

補章では、高度好熱菌 *T. thermophilus* のリジン生合成に関わるアミノ基転移酵素 LysN の結晶構造解析を行っている。その結果、LysN がいくつかの疎水性アミノ酸残基を用いて疎水性側鎖を持つ基質を認識することが明らかとなった。その一方で、これらのアミノ酸残基はフレキシブルなループ領域に存在しており、このことが幅広い大きさの基質に対応できる機構であることが示された。

以上、本論文は tMDH の結晶構造決定を通じて、同酵素の補酵素特異性の分子基盤を明らかにすると同時に、そこで得られる知識が他の関連酵素に応用可能であることを示したものであり、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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。