

論文審査の結果の要旨

氏名 宮房 孝光

本論文は黄色ブドウ球菌の病原因子の1つである莢膜の合成酵素、CapE、CapFに関する構造解析、機能解析を行い、抗菌剤の標的分子としての可能性を探ることを目的とした。

本論文は7章から構成されており、大略は以下の通りである。

まず第1章では序章として研究背景や意義、本研究で採用した研究手法について述べている。黄色ブドウ球菌に対する新規な作用機序を有する抗菌剤の開発は社会的に強く求められている。莢膜とは細胞壁の外側に存在する多糖類の厚い膜であり、宿主の食生活からの防御機構として働いていることが知られている。本研究では、莢膜の合成に必須であることが報告されていることを理由として、CapE、CapFを標的蛋白質とした。このCapE、CapFはShort-chain dehydratase/reductase familyに属しており、その作用機序を理解するためには活性部位の詳細な立体構造情報が必須であることが分かっていた。そこで、X線結晶構造解析から情報基盤を構築し、変異体機能解析と熱量測定を用いて溶液中での議論を進めることで、これらの酵素の総合的な理解を目指すこととした。

第2章では、野生型のCapEとCapFを用いた機能解析を行った。同様の反応を触媒する緑膿菌由来のホモログ蛋白質WbjB、WbjCと同様にそれぞれ2段階の反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。また、CapEに関しては平衡論的には2段階目の反応が逆反応に有利であるということが示唆され、さらにCapFに関しては1反応につき1当量のNADPHを消費することなど、ホモログ蛋白質では報告例のない特徴が示された。

第3章では、CapEのX線結晶構造解析結果について述べた。酵素単独、基質アナログとの複合体(反応前の複合体とみなした)、基質との複合体(反応中の複合体とみなした)という3種類の条件の異なる立体構造を用いて、CapEの反応触媒中の構造を連続的に観察した。まず、CapEは二量体を構成単位とした六量体構造で安定化していることが示された。その結果、CapEは基質結合前後で基質結合ポケットの構造を大きく変化させていることが明確に示された。具体的には、250番目のイソロイシンから258番目のリジンまでのループに顕著な構造変化が観察された。一方で、284番目のアスパラギン酸から305番目のチロシンの構造変化も極めて大きく、基質複合体の構造中では隣接する分子と強固な相互作用界面を形成しているにも関わらず、酵素単独での構造中では構造変化が大きく電子密度が観察されなかった。ここで示した2つのループは同一分子内では離れた領域に位置しているが二量体界面において向かい合っており、この2つのループの構造変化は同期していることが強く示唆された。

第4章では、CapEの変異体機能解析結果を示した。第3章の構造解析の結果から示唆された基質結合と構造変化の相関を証明するために、アラニン置換体の活性測定を進

めた。その結果、284番目のアスパラギン酸から305番目のチロシンまでのループ中に存在するチロシンをアラニンに置換した変異体で顕著な活性の低下が観察され、このループの構造が活性に影響を与えることを明らかとした。

第5章では、CapFのX線結晶構造解析結果を示した。CapFはホモ二量体を形成した2ドメイン蛋白質であった。N末端ドメインとC末端ドメインとが独立しており、それぞれ2つの触媒活性が局在していることが示唆された。N末端ドメインはShort-chain dehydratase/reductase familyに共通するRossmann foldであったのに対し、C末端ドメインはcupin foldという構造を有していた。Cupin foldは多様な機能を発現しうる構造モチーフとして知られており、立体構造からの機能予測は困難であった。C末端ドメインには3つのヒスチジンと1つのアスパラギン酸によって包摂された亜鉛原子が観察され、機能への寄与が示唆された。

第6章ではCapFの機能解析の結果を示した。まずドメイン分割体を用いた活性測定の結果、各ドメインの機能の局在が証明された。また、N末端ドメインは反応に際して補酵素の添加を必要とするが、その結合メカニズムが特徴的であることをCapFと補酵素の相互作用測定から明確に示した。等温滴定型熱量測定を用いてCapFとNADPHの親和性を測定したところ還元型のNADPHと選択的に結合し、酸化型のNADP⁺との親和性は100倍近く低いことが明らかとなった。さらにNADH、NAD⁺との親和性についても評価したところ、CapFは補酵素を2ヶ所の点で認識していることが示唆された。また、結合エンタルピーが2ヶ所での非共有結合で得られるものより大きいこと、結合に伴い大きなエントロピーの損が生じることから、2ヶ所での結合を契機とした構造変化が誘起されていることが強く示唆された。

第7章ではこれらの構造、機能解析の結果を総括し、CapE、CapFの創薬標的としての可能性や、得られた知見の新規性について総括している。

本研究では、CapE、CapFを標的蛋白質として、X線結晶構造解析、酵素活性測定、熱量測定など多角的な手法を用いた解析を行い、それぞれの酵素が基質、補酵素の認識に大きな構造変化を利用していることを明らかにした。CapEにおいてはX線結晶構造解析を基質、基質アナログを用いて行うことにより、反応ステップを追って議論することに成功した。一方、CapFにおいてはX線結晶構造解析と熱量測定を組み合わせることにより、結晶中での構造から溶液中での構造変化へと議論を進めることに成功した。これらの結果は、蛋白質が構造変化を利用して機能を制御していることを示すための実験的なアプローチとして極めて意義深いものであり、同時に、CapE、CapFを標的とした抗菌剤の開発に向けた情報基盤として完成度の高いものであると言える。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。