

博士學位論文要旨

論文題目 酸化還元酵素の構造-機能相関解明とそれに基づく
プロテイン・エンジニアリングの効率化

理工学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

申請者 氏名 下澤 勇弥

指導教員 西矢 芳昭

【第1章】 現在、酵素は食品製造、衣料加工、医薬品、臨床検査など様々な分野で生活に浸透し、人々の暮らしや健康の質の向上に貢献している。このような産業利用酵素は、優れた代謝回転数（比活性）、安定性、基質親和性および基質特異性などの特性が求められており、プロテイン・エンジニアリング（PE）による理想的な酵素開発が行われている。PEによる合理的な機能改変には、酵素の立体構造と機能の相関関係の理解が必要不可欠である。その中でも、基質特異性の改変は、酵素全体や活性部位における複雑な相互作用により基質認識が制御されていることから、多くの酵素で基質認識機構は明らかになっていない。したがって、基質特異性の改変は PE における最大の課題である。また、酵素の基質認識機構の議論は、基質とのコンプレックス構造を基にした静的解析が中心であるが、酵素全体にわたる基質認識の構造的な説明には動的解析が重要である。

L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ NAD^+/NADH ）依存的に L-リンゴ酸からオキサロ酢酸（OAA）への可逆反応を触媒する酸化還元酵素であり、OAA 以外に反応しない高基質特異性を有することが知られている（図1）。このため、種々の MDH を対象とした近縁酵素との系統樹解析やコンプレックス構造に基づく基質特異性改変の研究がなされてきたが、未だ高基質特異性の原因究明には至っていない。また、MDH は OAA の

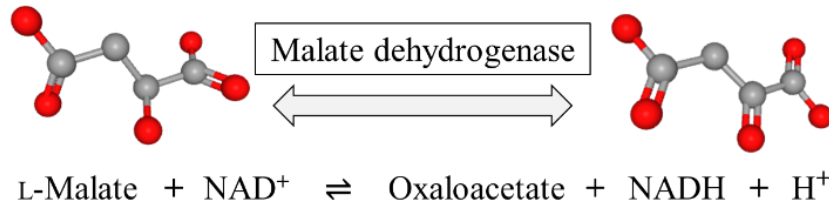


図 1. MDH の反応式と基質構造

結合後に活性部位の可動ループのコンフォメーションが open から closed 構造へ変化することが知られているが、可動ループの構造変化と基質特異性を関連づけた研究はこれまで報告されていない。そこで本研究では、検査薬として市販されている MDH の中でも、特に基質親和性や熱安定性に優れている *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH (gs-MDH) を対象に、X 線結晶構造解析により種々の反応段階の構造を決定した。そして、これらに基づく可動ループの構造変化機構と高基質特異性との相関関係の解明を試みた。また、gs-MDH の反応サイクルに基づいた合理的な変異導入により、酵素特性が向上し使用用途の拡大が期待される変異体の開発を試みた。

【第 2 章】 gs-MDH の X 線結晶構造解析に基づく構造変化機構の解明を試みた。リガンドの有無や複合化条件など種々の結晶化条件検討の結果、MDH の触媒反応段階に対応した (1) apo 型 open 構造 (apo-form) , (2) NAD⁺の加水分解物であるアデノシン 5'-ジホスホリボース (APR) が結合した構造 (APR/open-form) , (3) OAA と NAD⁺が結合した構造 (OAA/open-form) および (4) OAA と APR が結合した closed 構造 (closed-form) の 4 種の構造決定に成功し、詳細な反応サイクルが提案された (図 2) . Apo-form の活性部位は、MDH に広く保存されるアミノ酸残基により正電荷ポケットを形成しており、これにより生まれる可動ループと基質結合ポケット間での電荷的な反発は、dicarboxylate である OAA に対して選択的な構造変化をもたらすことを示唆した。MDH の結晶構造に

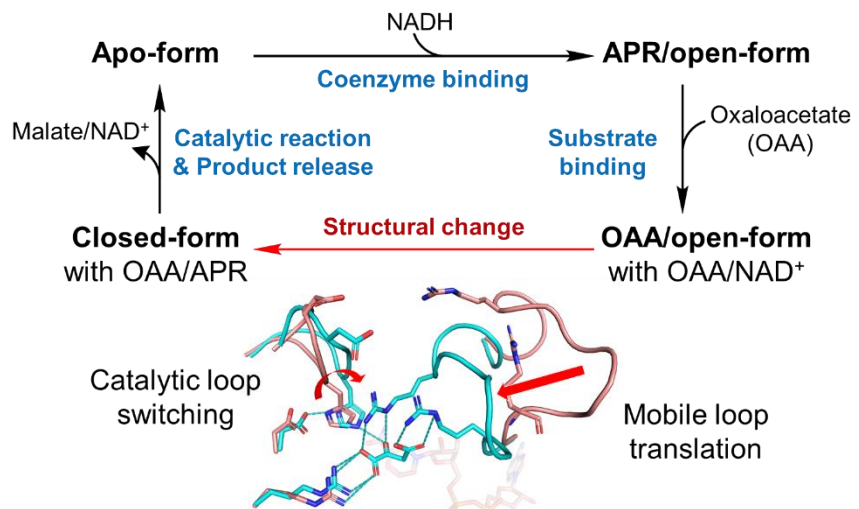


図 2. MDH の反応サイクルモデルおよび活性部位構造. open および closed 構造は、それぞれサーモンおよびシアンで示した。

において新規に決定された OAA/open-form と closed-form の比較は、基質結合ではなく可動ループの構造変化による触媒残基の switching (配向変化) の誘導を明らかにし、構造変化が基質選択に重要な役割を持つことを示唆した。これらの知見は、コンプレックス構造の静的解析だけでなく、基質結合から触媒反応に至るまでの動的解析が、基質認識機構の理解において欠かせない要因であることを示している。

【第3章】 MDH と同じ α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する近縁酵素であり、低基質特異性で知られる L-乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) との構造比較により、反応サイクルにおける基質認識機構の違いを調べた。LDH の活性部位は、中性アミノ酸残基が保存されていることから正電荷ポケットを形成せず、電荷による基質選択能力が低いことが示唆された。また、種々の LDH は触媒残基の switching 機構を有しておらず、触媒反応に可動ループの構造変化を必要としないことが明らかになった。さらに、gs-MDH の可動ループに対する変異解析では、活性部位の正電荷の緩和により monocarboxylate (MC) に対する反応性が観察され、正電荷ポケットの基質選択への寄与を示した。また、gs-MDH と種々の LDH の構造を用いた分子動力学解析は、LDH と比較して gs-MDH の可動ループの低柔軟性を明らかにし、OAA による活性部位の架橋が gs-MDH の構造変化に必要であることを示唆

した。以上の結果から、正電荷ポケット、触媒残基の switching, 可動ループの低柔軟性に加えて α -ケト酸構造が結合する活性部位の空間認識も含めた4つの要素により gs-MDH が高基質特異性を獲得していることが明らかになった (図3)。本研究結果は、高基質特異性を実現する詳細な基質認識機構を明らかにした重要な知見であり、 α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリー

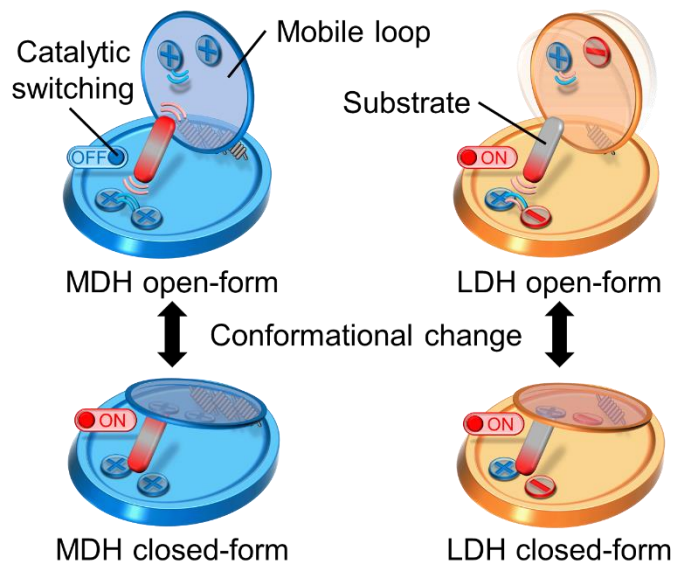


図 3. MDH および LDH の構造変化モデル。可動ループの柔軟性はバネの数で表し、多いほど低柔軟性を示す。活性部位の電荷分布は+および-の記号で、触媒残基の switching 機能は、ON と OFF で表した。

ミリーだけでなく、様々な酵素の基質認識における基礎的な洞察を与えた。

【第4章】 gs-MDH は前述のように優れた特性を有しているが、中等度好熱性菌由来であるため一般的な検査温度（30°C や 37°C）での低活性が課題として残されている。そこで、反応サイクルに基づいた合理的な機能改変による、gs-MDH の課題解決と有用性向上を試みた。一般に、活性部位の柔軟性向上によりターンオーバーの上昇が期待される。しかし、第3章で示したように、gs-MDH の open 構造における可動ループの低柔軟性は、MC の結合による closed 構造への構造変化を制限している。したがって、gs-MDH のターンオーバーの向上には、触媒反応後の closed から open 構造への構造変化の促進が求められる。gs-LDH との closed 構造の比較により、LDH のみに保存性の高い Y 残基が見出され、これに対応する gs-MDH の G218 への変異導入は、closed 構造における可動ループの柔軟性向上と open 構造の保持が期待された。G218 変異体の速度論解析は、野生型と比較して顕著な比活性の向上を示した（図4）。また、G218 変異体は野生型と同程度の熱安定性を示し、高比活性と熱安定性を兼ね備えた変異体の開発に成功した。さらに、G218Y の結晶構造は、変異残基による可動ループのねじれたコンフォメーションを示し、嵩高いアミノ酸残基との立体障害による可動ループの

柔軟性向上が示唆された。これは分子動力学解析により検証され、G218Y の可動ループは、野生型と比較して closed 構造での高い柔軟性を示した。以上の結果は、反応サイクルに基づく合理的な機能改変の成功例として、酵素特性の保持と機能向上の両立に向けた新たなデザイン手法を提供する。

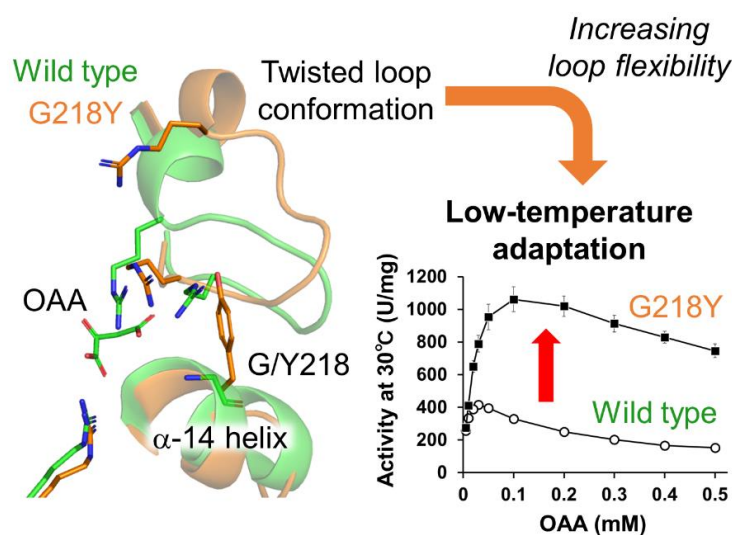


図4. 野生型 gs-MDH および G218Y の活性部位構造および 30°C における G218 変異体の基質飽和曲線。

【第5章】 酵素の触媒反応や基質結合に関与するアミノ酸残基群は第一層領域とされ、第一層領域と相互作用するアミノ酸残基群は酵素特性に間接的に関与する第二層領域と呼ばれる。

第二層領域に対する変異導入は、劇的な機能向上は期待できないものの、酵素機能の消失や顕著な低下などのリスクが低いと考えられる。そこで、gs-MDH において可動ループのヒンジ領域と相互作用する第二層領域である C 末端領域 ($\alpha 17$ -ヘリックスおよび C 末端数残基) における機能解析と欠失変異による影響を検討した。gs-MDH の *in silico* 解析は、C 末端残基の欠失による活性中心との相互作用数の増加と可動ループの活性部位側へのシフトを示し、欠失変異による gs-MDH の酵素特性への寄与を示唆した。欠失変異体の速度論解析は、高基質親和性と反応速度の維持を示し、MDH の使用用途の拡大における課題である高基質濃度での強い基質阻害の低下が確認された (図 5)。さらに、特性評価の結果、欠失変異体は実用的に十分な熱安定性を有していたことから、基質過剰条件で反応を行う免疫標識用酵素などへの応用が期待された。また、 $\Delta 311$ の結晶構造において、C 末端領域と可動ループは野生型と異なる様々な配向を示し、C 末端領域が可動ループのコンフォメーションの制御に関与することが示唆された (図 6A)。さらに、 $\Delta 311$ では野生型よりも狭い活性部位空間が観察され、過剰な基質結合の制限による基質阻害の低下への寄与が示唆された (図 6B および C)。以上の結果は、MDH のコンフォメーション制御における C 末端領域の役割に関する新たな知見であり、基質阻害機構の構造的理解への手がかりとして期待できる。

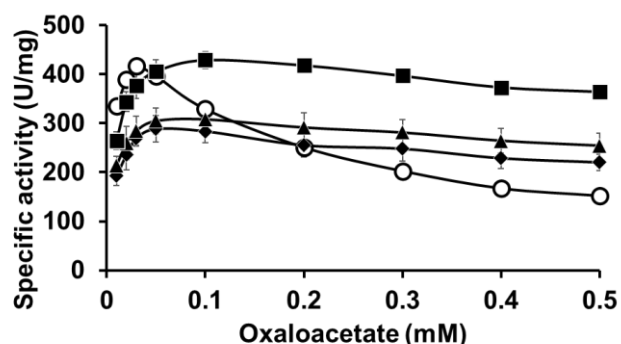


図 5. 野生型 (○), $\Delta E311$ (▲), $\Delta L310-E311$ (■) および $\Delta L310$ (◆) の基質飽和曲線.

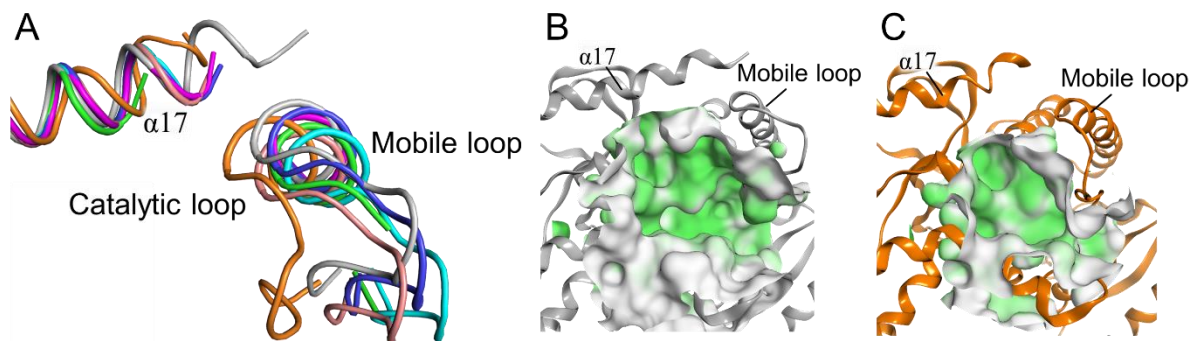


図 6. 野生型および $\Delta E311$ の活性部位構造. $\Delta E311$ は、サブユニットごとに色分けし、野生型はグレーで示した。A. 活性部位の重ね合わせ図。B および C. 野生型 (B) および $\Delta E311$ (C) の分子表面図。活性部位ポケットにおける非露出表面をグリーンで示した。