

論文の内容の要旨

論文題目「ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素の研究- 新規酵素の発見、機能と構造の解析並びに応用 -」

学位申請者 福田 雄大

キーワード：NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素、短鎖型脱水素酵素/還元酵素、甲状腺除去鶏の脂肪肝、酵素反応速度論、結晶構造

甲状腺除去鶏の脂肪肝に関するプロテオーム解析により脂肪蓄積亢進とともに発現が増強しているタンパク質の存在が従前の研究により明らかになっているが、単純なホモロジー検索だけでは機能が推定できない機能未知タンパク質であった。そこで、本研究では、この機能未知タンパク質の生化学的機能解析および、生理的機能の解明を目的として、バイオフィーマティクスの手法および分子生物学的手法を用いて酵素の機能や立体構造の解明を行った。また、研究の過程において産業的利用価値の高い化合物を合成する活性を有するという非常にユニークな基質特異性を持つ酵素であることが明らかになったことから、酵素の応用面での利用についても着目し研究を行った。

1) ニワトリ脂肪肝由来カルボニル還元酵素(CR)の機能と立体構造解析

NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素(CR, EC: 1.1.1.184)はアルデヒド、ケトンあるいはキノンなどの様々なカルボニル化合物の酸化還元反応を触媒する NAD(P)H 依存性の酸化還元酵素である。CR はあまりに基質特異性が広い酵素であるため、生体内において毒物などの生体異物を分解あるいは排泄するための代謝反応に広く関与する酵素であることが推測されているが、本来の生理的意義はほとんど明らかにされていない。これまでに分子量や酵素化学的諸性質が異なる多様な CR が様々な生物種から発見されているにも関わらず、全ての CR は短鎖型脱水素酵素/還元酵素ファミリー (SDR ファミリー) に属す。この SDR ファミリーに属す酵素のアミノ酸配列には、触媒において重要な役割を担うチロシン残基が保存されているアミノ酸モチーフ (S-Y_{xxx}K) および酸化還元酵素活性に必須な補酵素 NAD(P)H の結合アミノ酸モチーフ (G_{xxx}G_xG)、の 2 つの共通する配列が厳密に保存されていることが既に知られている。ニワトリ脂肪肝由来機能未知タンパク質のアミノ酸配列中から CR に共通する特徴的な 2 つのアミノ酸配列 (G_{xxx}G_xG、S-Y_{xxx}K) を見出している。そこで、「ニワトリ脂肪肝由来の機能未知タンパク質は CR ではないか」との仮説のもとに、遺伝子クローニングと遺伝子発現産物の酵素活性を測定した。その結果、NAD(P)H 依存的にカルボニル化合物(C=O を有する化合物)の還元反応を触媒する酵素活性を検出することに成功した。この結果から、脂肪肝特異的に発現する機能未知タンパク質が新規な CR であることを世界で初めて明らかにしている。しかし、CR は様々なカルボニル化合物に対して反応性を有す広基質特異性の酵素であったため、生理的意義の解明には至らなかった。そこで、生体内での役割を明らかにするために「どのような基質が最も良好な基質となるのか」という問題に対して、各基質に対する K_m 値 (親和性) の算出を酵素反応速度論的な手法で行った。また、酵素の不安定性の問題から結晶構造解析に必須である結晶

化は困難を極めたが、酵素の結晶化および CR-NADPH-エチレングリコール 3 者複合体の 3 次元立体構造解析に 1.98 Å で解析することに成功した。この立体構造解析と、部位特異的変異導入実験により触媒に重要な役割を担う 3 つのアミノ酸残基(Ser159, Tyr178, Lys182)のそれぞれの役割や基質結合部位に“フタ”の役割をする特徴的なアミノ酸残基(Tyr172)の役割について明らかにすることができた。特に基質特異性に関わるループ構造領域(Ile164-Gln174)に存在する Tyr172 は他の生物種では全く保存性が無く、ニワトリ脂肪肝由来 CR にユニークな特徴であった。また、本酵素の機能解析から、Ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (COBE : 脂溶性カルボニル化合物)に対する K_m 値が 0.008 μM で最も親和性が高いことが明らかになった。この COBE を基質とした場合の酵素反応産物は Ethyl(S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate [(S)-CHBE]という化合物であり、これは、高コレステロール血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤の原料として有用な化合物であった。

2) 超好熱菌由来 CR の機能と立体構造解析

ニワトリ脂肪肝由来 CR の詳細な機能を明らかにすることには成功したが、脂質代謝に関連する生理的機能と結び付けることが難しかったため、「CR と相同性を有すホモログから新たな機能を推定することができないか、また、安定性の高い CR があれば(S)-CHBE の合成が容易にできるのではないかと考え、未だ CR ホモログの報告が無い超好熱菌から CR ホモログ遺伝子の検索を行った。その結果 *Aeropyrum pernix* K1 株 (最適生育温度 95°C) に 28%と類似性は低いものの、CR をコードしていると予測される遺伝子(ORF ID: APE_2503.1)を見出すことに成功した。本酵素は 3-オキソアシル-アシルキャリアプロテイン還元酵素としてアノテーションされており、CR 活性を有するのか、また、(S)-CHBE を合成することが可能な酵素であるか全く不明であったが、酵素のクローニングおよび機能解析を行った結果、本酵素は高度耐熱性を有す CR であり、ニワトリ脂肪肝由来 CR と同様に COBE を良好な($K_m=0.7 \mu\text{M}$)基質とする CR であることを明らかにした。結晶化および CR-NADPH の 2 者複合体の立体構造解析を分解能 2.09 Å で解析することにも成功した。超好熱菌由来 CR はニワトリ脂肪肝由来 CR と比較すると安定性は非常に高いが、基質や補酵素に対する親和性は低いことが酵素反応速度論的実験で明らかにしている。これらの違いを分子レベルで明らかにするために 2 つ酵素の立体構造比較を行った。基質結合部位周辺を比較すると、ニワトリ脂肪肝由来 CR では Tyr172 が基質結合ポケットにフタをするような構造をとっており、この構造の違いが基質である COBE に対する親和性を高めるかに高くしている要因であると考えられた。また、補酵素 NADPH とのインタラクションの比較では、超好熱菌由来 CR では水素結合数が減少しており、補酵素に対する親和性低下の要因と考えられた。また超好熱菌由来 CR の熱安定性の要因としてサブユニット間の強固なインタラクション(Glu99, Arg129, Tyr176)が安定化に寄与していることが考えられたため、部位特異的変異導入実験により安定性に寄与するアミノ酸残基であることを証明することにも成功している。また、代謝マップから本酵素が 3-オキソアシル-アシルキャリアプロテイン還元酵素として脂肪酸生合成経路に関わる可能性があるという新規な知見を見出すことに成功しており、基質特異性が非常に広いニワトリ脂肪肝由来 CR の生理的意義の解明につながると考えられる。また、超好熱菌由来の CR の報告例はこれまでに無く、安定性の高い CR は有用なキラル化合物合成などへの応用利用が期待できると考えられる。

以上の酵素化学、構造生物学的知見から新規な CR の生体内での役割の解明と酵素反応の応用利用について考察を行った。