

# 審査結果の要旨

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

本論文は、甲状腺除去鶏の脂肪肝において脂肪蓄積亢進とともに発現が増強している NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素(CR)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、バイオインフォマティクス的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を明らかにしたものである。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ている。

本酵素はニワトリ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であるが、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(NCBI-XP\_414028)であることが分かった。本機能未知タンパク質のアミノ酸配列解析により補酵素 NAD(P)依存性酵素に特徴的なアミノ酸配列である G<sub>XXX</sub>G<sub>X</sub>G、および短鎖型脱水素酵素/還元酵素ファミリーの酵素の触媒において重要なアミノ酸モチーフ S-Y<sub>XXX</sub>K が保存されていることを見出している。この結果から、NAD(P)依存性の酸化/還元酵素であることは容易に予測された。しかし、どのような基質に対して反応性を有す酵素であるのか不明であったが、NAD(P)H 依存性 CR とわずかにホモロジーがあることを見出している。そこで、本機能未知タンパク質を NAD(P)H 依存性 CR であると予測すると共に、大腸菌を用いた大量発現系の構築および酵素活性測定実験を行ったところ CR 活性の検出に成功している。この結果により、これまで機能が全く不明であった酵素が NAD(P)H 依存性 CR であることを証明することができた。また、詳細な酵素反応速度論の解析により、本酵素が CR のモデル基質よりも Ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (COBE : 脂溶性カルボニル化合物)に対する親和性がおおよそ 250 倍高い( $K_m=0.008 \mu\text{M}$ )という特異な事実を明らかにしている。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。本酵素は安定性が低い酵素であり結晶構造解析のために必須である結晶化は困難であったが、結晶化および CR-NADPH-エチレングリコール複合体の 3 次元立体構造解析に 1.98 Å で解析することに成功し、基質特異性に関わるアミノ酸残基(Ile164-Gln174)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)も新たに見出している。これらのアミノ酸残基は他の生物種では全く保存性の無いユニークなものであった。

本研究によりニワトリ脂肪肝由来 CR の詳細な機能と構造を明らかにできたが、CR がどのような代謝経路に関与するのか不明であったため、生理的機能の推定や、安定性の高い CR による有用物質の生産を行うことを目的に、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ている。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)を見出し、酵素のクローニングおよび大腸菌を宿主細胞と

した酵素の大量発現に成功している。本酵素は CR ではなく 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、(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、酵素の詳細な機能解析の結果、本酵素は高度耐熱性を有す CR であり、さらに、ニワトリ脂肪肝由来 CR と同様に COBE を最も良好な( $K_m=0.7 \mu\text{M}$ )基質とする CR であった。超好熱菌由来の耐熱性 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を明らかにしている。これらの違いを分子レベルで明らかにするために立体構造解析および立体構造比較を行っている。CR-NADPH 複合体の結晶構造解析を  $2.09 \text{ \AA}$  で決定し、ニワトリ脂肪肝由来 CR との比較から基質結合部位のキャビティーの大きさや NADPH との水素結合様式の違い、また、熱安定性にはサブユニット間のインタラクションが重要であることを明らかにしており、これらの情報は今後、高機能化 CR を創製するための有用な情報となりうる。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ししており、ニワトリ脂肪肝由来 CR の生理的意義の解明につながる情報がホモログ酵素の研究を行うことにより得られている。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。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 福田 雄大 は東海大学博士(農学)の学位を授与されるに値すると判断した。

#### 論文審査委員

主査	農学博士	荒木 朋洋	農学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(医学)	永井 竜児	農学部准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(農学)	安田 伸	農学部准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(工学)	米田 一成	農学部准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	農学博士	芝田 猛	東海大学名誉教授	