

氏 名 原田 彩佳

学位(専攻分野) 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第 1856 号

学位授与の日付 平成28年9月28日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 *Sphingobium* sp. SYK-6 株由来 O-脱メチル化酵素 LigM の X
線結晶構造解析

論文審査委員 主 査 教授 足立 伸一
教授 千田 俊哉
准教授 加藤 龍一
准教授 松垣 直宏
准教授 清水 伸隆
教授 政井 英司 長岡技術科学大学
准教授 永田 裕二 東北大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

序論

アミノ酸代謝と DNA 合成を結ぶ C1代謝は、テトラヒドロ葉酸 (THF) 誘導体を利用した代謝経路で、生物にとって必要不可欠な代謝である。THF は、グルタミン酸とテトラヒドロプテロイン酸が結合した構造を取り、メチル基、メチレン基、ホルミル基などの C1単位と結合する。その C1 単位は、酵素的酸化還元反応によりチミジン合成を始めとする様々な反応に関与している。ヒトを始めとする多くの生物の C1 代謝経路は、グリシン開裂系の T-protein (アミノメチルトランスフェラーゼ) と H-protein (リポ酸含有酵素) との反応により開始されるが、クラフトパルプ工場の排水から分離された細菌である *Sphingobium* sp. SYK-6 (以下、SYK-6) は、LigM または DesA 酵素による O-脱メチル化反応を利用して C1 代謝を行うと考えられている。LigM/DesA は、基質として低分子性リグニン誘導体 (バニリン酸 (VNL)、3-O-メチルガリク酸 (3MGA)、シリンガ酸) の O-脱メチル化反応を行い、THF にメチル基を付加して 5-CH₃-THF を生成する。5-CH₃-THF は、SYK-6 内にある C1 代謝関連酵素により 5,10-CH₂-THF へ還元される。LigM/DesA は T-protein と約 25 % のアミノ酸配列の相同性があるため、LigM は T-protein の相同タンパク質であると考えられる。しかし、T-protein の基質は H-protein に結合したリポ酸 (タンパク質性基質) であり、SYK-6 の基質は低分子性リグニン誘導体である。更に両者の触媒する反応は、類似しているが同一ではない。よって、LigM は SYK-6 の主要なエネルギー源である低分子性リグニン誘導体を C1 代謝に利用できるように SYK-6 内で独自に進化してきたと考えられる。そこで、X 線結晶構造解析法を利用して LigM の結晶構造を決定し、T-protein との 3 次構造比較や 1 次構造比較を行うことで、両者の酵素学的な比較を行い、LigM については SYK-6 の進化に関する知見を得るための基盤を得ることを目的とした。

結果

大腸菌で大量発現した LigM を精製して結晶化したのち、単波長異常分散法により位相決定し、分解能 3.0 Å で結晶構造を決定した。また、基質複合体 (LigM-VNL 複合体、LigM-3MGA 複合体)、補酵素複合体 (LigM-THF 複合体)、基質アナログ + 補酵素複合体 (LigM-PCA-THF 複合体) の結晶をソーキング法によって作製し、分子置換法を用いてそれぞれの結晶構造を決定した。LigM は 16 本の α ヘリックスと 17 本の β シートから構成されており、その大きさは約 65 × 55 × 45 Å³ であった。LigM は GCV_T domain 及び GCV_T_C domain と呼ばれる 2 つのドメインから構成されており、基質である VNL、3MGA、PCA と補酵素である THF は、GCV_T_C domain 内にあるポケットに結合していた。

構造既知の T-protein (*Thermotoga maritime* (PDB ID; 1WOO)、*Escherichia coli* (PDB ID; 3A8I)、*Bacillus subtilis* (PDB ID; 1YX2)、*Homo sapiens* (PDB ID; 1WSV)、*Pyrococcus horikoshii* OT3 (PDB ID; 1V5V)) と LigM との立体構造の比較を行った結果、これらの 3 次元構造は類似していることがわかった。しかし、T-protein には基質である H-protein と補酵素の結合する 2 つのポケットが存在しているが、LigM には T-protein にはないインサート領域が 5 つあり、そのうちの 1 つのインサート領域が T-protein の H-protein 結合

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

ポケットの入口に相当する部分を塞ぎ、外部から基質ポケットへのアクセスを阻害していた。また、両者の活性中心の構造にも違いがあった。LigM においては、Tyr31、His60、Arg122、Thy247、Asn250 及び1つの水分子と基質分子が水素結合のネットワークを形成しており、これらのアミノ酸が触媒反応に関与すると考えられた。特に、*O*-脱メチル化されるメトキシ基の酸素原子と 2.8 Å の距離で水素結合を形成している His60 は、*O*-脱メチル化反応に直接関与する可能性が高い。また、補酵素である THF は Gln57、Gln93、Val120、Gln165、Glu215 と水素結合を形成していた。Glu215 は、T-protein と LigM の全てにおいて保存されており、THF の結合に必要なアミノ酸残基であることが示唆された。一方、大腸菌の T-protein の触媒残基は、Tyr84、Asp96、Asp97、Asn113、Arg223 であるとされているが、これらは LigM の触媒残基とは3次元構造上で異なる位置に配置されていた。以上のことから、LigM と T-protein は、類似したフォールドを持つものの、異なる酵素に分類できることがわかった。

次に、LigM の相同タンパク質が類縁のバクテリア内にどのように分布しているのかを解析した。その結果、SYK-6 以外にも LigM 型酵素を持つものが存在したが、LigM 型酵素と T-protein 型酵素の両方の酵素を持つものが多く存在した。

考察

LigM と T-protein は、THF に C1 単位を供給する点では同じ機能を有し、立体構造の類似性からも同一の進化的起源を持つと考えられるが、異なる反応を触媒し反応に関与する残基も全く異なっている事が明らかになった。これは、低分子性リグニンを経路の栄養素としている SYK-6 が、豊富にある低分子性リグニン誘導体からカテコール誘導体を作る際に必要な *O*-脱メチル化反応を利用して、THF へ C1 単位を付加する経路を進化させることで生じた変化と考えられる。SYK-6 と類縁のバクテリア内には、LigM 型酵素をもつバクテリアが多く存在し *O*-脱メチル化により C1 代謝を行っていると考えられるが、LigM 型酵素だけを持つものより LigM 型酵素と T-protein 型酵素の2つの C1 代謝関連酵素を持つバクテリアの方が多い。このことから、LigM 型酵素の起源は T-protein にあると推測された。しかし、T-protein の表面残基が保存されたままであると、H-protein との結合が生じ、基質である低分子性リグニン誘導体との反応の効率が落ちると考えられる。そこで、H-protein との反応を妨げるために LigM 型酵素に特徴的なインサート領域を付加することで、H-protein 結合ポケットを塞ぐ必要があったと推測された。さらに、低分子性リグニン誘導体の *O*-脱メチル化反応を触媒するため、活性残基も変わっていったと考えられた。

結論

O-脱メチル化酵素 LigM の立体構造を X 線結晶解析法により決定した。この LigM と構造既知の T-protein は、進化的に同一起源に由来する酵素と考えられるが、活性部位や基質結合部位には明確な違いがあり、2 つは異なるグループに分類すべき酵素であることが明確になった。

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

原田彩佳氏は、高エネルギー加速器科学研究科・物質構造科学専攻（5年一貫制博士課程（3年次編入学））に所属し、これまで3年間にわたり推進してきた、放射光を用いたO-脱メチル化酵素LigMの結晶構造解析と、そこから派生する構造生物学的な研究成果に基づき、博士論文の発表を行った。

Sphingobium sp. SYK-6（以下、SYK-6）は、低分子性リグニンを栄養源とする特異な栄養要求性のため、通常の生物とは異なる代謝経路を有する。その一例が、生物の生存に必須なC1代謝経路へと繋がるO-脱メチル化反応である。SYK-6由来のLigMは、脱メチル化反応によって、基質のメチル基をテトラヒドロ葉酸に転移する反応を触媒する。メチル基を転移されたテトラヒドロ葉酸は、C1代謝に利用されると考えられている。本研究は、LigMの結晶構造を決定し、その結晶構造に基づいた酵素学的な解析を行うとともに、本酵素の分子進化を解析していく基盤を確立したものである。

出願者は、大腸菌を用いてLigMの大量発現・精製系を構築し、精製された本酵素を結晶化した。そして、得られた結晶を用いて、重原子置換体結晶を用いた単波長異常分散法(SAD法)で結晶構造を決定した。また、タンパク質結晶構造解析の分野における新しい解析法であるNative(S)-SAD法によっても結晶構造解析を成功させ、Native-SAD法の有効性を示している。このようにして決定した基質非結合型の結晶構造解析に加え、補酵素（テトラヒドロ葉酸）複合体や複数の基質複合体の結晶構造も決定し、基質や補酵素の結合部位を明らかにした。これらの結晶構造に基づいて、LigMの触媒反応に重要と思われるアミノ酸残基の同定を行い、反応中間体の立体構造の推定も行うことで、本酵素の触媒反応機構に関して多くの知見を得た。

さらに、相同酵素であるT-proteinとLigMとの立体構造的な比較を行った。T-proteinは、多くの生物にみられるグリシン開裂系に存在する酵素で、C1単位をテトラヒドロ葉酸に転移するという点ではLigMと部分的に対応する酵素で、アミノ酸配列的にもLigMと弱い相同性を示す。両者の立体構造の比較から、LigMにはT-proteinと比較して5カ所に挿入配列がみられること、これらの挿入配列によりT-proteinの基質であるH-proteinとの結合部位や、触媒反応に関するH-proteinのリポイルリシン残基を活性部位に導入するトンネルがLigMでは保存されていないことを示した。そして、T-proteinの触媒残基はLigMにおいては保存されておらず、異なる触媒反応を行うために独自の活性部位の構造を持つことも明らかにしている。更に、SYK-6の近縁の微生物の遺伝情報を検索することで、上で述べたLigMと同様の特徴を持ち、T-proteinとは異なった特徴をもつLigM型の酵素が複数存在することを突き止めた。以上から、グリシン開裂系に存在する相同酵素であるT-proteinとLigMとは別種の酵素であることを立体構造に基づいて示し、新しい酵素のグループとして位置付けられることを明らかにした。これらの結果は、本酵素の分子進化を解析する上での基盤となると考えられる。

本審査の発表では、予備審査での指摘事項を踏まえて、(1) 論文全体を1つのまと

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

まったストーリーとして展開すること、(2) 結晶構造解析の結果の考察を充実させ、分子進化を論ずるための基盤となる酵素学的な解析と考察を充実させること、(3) 本研究の意義を明確にすること、に関して適切に対応できたと判断した。