

氏 名 于 宏洋

学位(専攻分野) 博士(工学)

学位記番号 総研大甲第 2230 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

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

学位論文題目 立体構造に基づく *Sphingobium* sp. SYK-6 由来 MTHFR の機能解析

論文審査委員 主 査 足立 伸一
物質構造科学専攻 教授
清水 伸隆
物質構造科学専攻 教授
加藤 龍一
物質構造科学専攻 准教授
川崎 政人
物質構造科学専攻 准教授
千田 俊哉
物質構造科学専攻 教授
政井 英司
長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 教授

博士論文の要旨

氏 名 于 宏洋

論文題目 立体構造に基づく *Sphingobium* sp. SYK-6 由来 MTHFR の機能解析

生物は様々な生育環境に応じて進化してきた。グルコースなどの炭素源がない環境で生存する細菌は、解糖系の代わりに環境に豊富に存在する化合物の脱メチル化反応により炭素を取り入れるようになったと考えられている。一例として、パルプ廃液槽で発見されたグラム陰性菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 (以後、SYK-6) は、グルコースの代わりにバニリン酸を炭素源として生育できる。SYK-6 では LigM 酵素が脱メチル化反応を利用してバニリン酸からメチル基を 1C 代謝系にあるテトラヒドロ葉酸 (以後、THF) に渡し、残りの生成物を芳香環開裂系で分解代謝し、TCA 回路で利用することが知られている。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) は 1C 代謝のうち、メチオニンの合成に使われる N^5 -メチル-THF (以後、 CH_3 -THF) と、プリン体の合成に使われる N^5,N^{10} -メチレン-THF (以後、 CH_2 -THF) の変換を行う酵素である。通常の生物では、解糖系に由来するグリシンを基質とするグリシン開裂系によって生成された CH_2 -THF が、NAD(P)H によって還元された MTHFR により CH_3 -THF に変換されることが知られている。*In vitro* では MTHFR による CH_3 -THF の酸化という、上記の反応の逆反応も起こるが、NAD(P)H による MTHFR の還元反応の k_{cat}/K_m は CH_3 -THF による MTHFR の還元反応の約 45 倍であり、通常 MTHFR は NAD(P)H により還元される。しかし、SYK-6 はグルコースを利用できない上、 CH_2 -THF の合成に必要なグリシン開裂系中の T-protein 遺伝子を欠いている。その代わりに、SYK-6 では LigM 酵素がバニリン酸の脱メチル化反応により、メチル基を THF に転移して CH_3 -THF を生成する (Harada A *et al.* 2017)。その後、MTHFR により CH_3 -THF が酸化されることで CH_2 -THF が生成し 1C 代謝に利用していると考えられている。この様に SYK-6 の MTHFR (以後、S6MTHFR) が通常の生物の MTHFR とは逆の反応を行うのは、脱メチル化に依存した代謝を選択した SYK-6 が、1C 代謝を行うために MTHFR の基質特異性を変化させたためであるという仮説を立てた。このような脱メチル化代謝に適応した進化は 2019 年 Yao らの SYK-6 の近縁種に関する論文でその可能性が示唆されたが、詳細は不明である。我々は、S6MTHFR の特異な触媒反応のメカニズムを原子のレベルで解明し、この酵素と LigM 酵素がバニリン酸と 1C 代謝を繋ぐメカニズムを明らかにできれば、細菌の代謝系の進化の一端に迫ることができると考え本研究を行なった。

まず、S6MTHFR の特異な触媒機構を解明するために、S6MTHFR の生化学解析と結晶構造解析を行った。精製した S6MTHFR を用いて酵素活性測定を行なったところ、 CH_3 -THF は NADH に対し、比活性にして 100 倍以上高い S6MTHFR の還元活性を示した。次に、この比活性の違いを構造に基づいて解明するため、S6MTHFR の apo 体の結晶構造を 2.6 Å の分解能で決定した。さらに、apo 体と holo 体 (CH_3 -THF complex) の結晶構造もそれぞれ 1.5Å、1.85Å の分解能で決定した。構造情報に基づいた変異体解析から、S6MTHFR が NADH でなく CH_3 -THF から反応する原因は 2 つあると考えられた。一つ目は、安定な CH_3 -THF

の結合サイトを形成することである。大腸菌由来 MTHFR (EcMTHFR) の Phe223 は、結合する基質により側鎖の向きを変えるが、これに対応する S6MTHFR Phe215 の側鎖は Phe269 にしっかり固定され、Leu48 と共に安定な CH₃-THF 結合サイトを形成し、Leu48, Phe215, Cys219, Phe269 の 4 残基が CH₃-THF の結合に重要であることが変異体実験で明らかになった。二つ目は、Leu48 と Pro49 が、NADH の活性部位へのアクセスを阻害していることである。これは Leu48 と Pro49 の 2 つの残基をグリシンに置換すると、NADH に対する比活性が顕著に上昇することから示された。さらに興味深いことに、NAD⁺ も S6MTHFR の活性中心には結合することはできないため電子受容体として機能できず、SYK-6 内で他の物質が電子受容体となり反応を turnover させていることが強く示唆された。

上記で得られた S6MTHFR の特徴を進化の面から考えるために、アミノ酸配列解析を行った。脱メチル化代謝に依存して生存していると考えられる SYK-6 の近縁種のバクテリアから 40 種の MTHFR の配列を BLAST により収集すると共に、モデル生物および酵素学的性質が報告されている 40 種の MTHFR を加えた合計 80 種の MTHFR のアミノ酸配列を用いてシーケンスアラインメントを行った。その結果、S6MTHFR の類縁酵素は、S6MTHFR の構造に基づいて発見した上記の 2 つの特徴を酵素に付与するため 3 つの motif を有することがわかった。つまり、安定な CH₃-THF の結合サイトを形成するのに必要な Cys219 と Phe269 をそれぞれ含む 2 つの motif (C₂₁₉GxGxS motif と PF₂₆₉GG motif) を持つこと (さらに Leu48 は完全に保存されており、Phe215 は 75% の保存度を持つ)、そして NADH の活性部位へのアクセスを阻害する Leu48 と Pro49 を含む motif (TFL₄₈P₄₉ motif) を持つことが明らかになった。これらの特徴は、通常の MTHFR には見られないものである。さらに、アミノ酸配列解析の結果 S6MTHFR およびその類縁酵素は、NAD(P)H を利用して CH₂-THF を CH₃-THF に還元する通常の MTHFR とは異なるクラスターに分類された。興味深いことに、S6MTHFR 型と通常の型の MTHFR の 2 つを有するバクテリアも存在していた。通常の生物の 1C 代謝ではグルコースなど炭素源が豊かになるに伴い、解糖系に由来するグリシンからグリシン開裂系を利用して炭素を利用するように MTHFR が進化したが、一部のバクテリアでは炭素源が限られているため、dicamba、CH₃Cl、バニリン酸などのメチル基含有化合物を利用して生存できるように、グリシン開裂系のほかに脱メチル化に依存した代謝経路も持つようになったと考えられた。その後、SYK-6 のようにグリシン開裂系遺伝子を欠失して脱メチル化代謝経路に炭素源を依存するようになり、S6MTHFR 型の MTHFR が CH₃-THF を CH₂-THF に変換することで 1C 代謝に利用するような仕組みに進化したと考えられる。

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 于 宏洋Title
論文題目 立体構造に基づく *Sphingobium* sp. SYK-6 由来 MTHFR の機能解析

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) は生物に必須の代謝である一炭素 (1C) 代謝のうち、メチオニンの合成に使われる N^5 -メチル-THF (以後、 CH_3 -THF) と、プリン体の合成に使われる N^5, N^{10} -メチレン-THF (以後、 CH_2 -THF) の変換を行う酵素である。通常の生物では、解糖系に由来するグリシンを基質とするグリシン開裂系によって生成された CH_2 -THF が、NAD(P)H によって還元された MTHFR により CH_3 -THF に変換されることが知られている。しかし、*Sphingobium* sp. SYK-6 (以後、SYK-6) はグルコースを炭素源として利用できないこともあり、 CH_2 -THF の合成に必要なグリシン開裂系中の T-protein 遺伝子を欠いている。その代わりに、THF 依存脱メチル化酵素である LigM がバニリン酸の脱メチル化反応によりメチル基を THF に転移して CH_3 -THF を生成する。その後、MTHFR により CH_3 -THF が酸化されることで CH_2 -THF が生成し 1C 代謝に利用していると考えられている。この様に SYK-6 の MTHFR (以後、S6MTHFR) が通常の生物の MTHFR (以後、通常型 MTHFR) とは逆の反応を行うのは、SYK-6 が T-protein ではなく LigM による脱メチル化を選択し CH_3 -THF を合成するためであると考えられた。そこで、本研究では SYK-6 をはじめとする THF 依存脱メチル化酵素を利用するバクテリアの代謝系の進化を理解するために、生化学解析、結晶構造解析と配列解析を用いて S6MTHFR の酵素学的な性質を原子レベルで解析することにした。

大腸菌で発現させ精製した S6MTHFR を用いて酵素活性測定を行なったところ、S6MTHFR は予想通り通常の MTHFR と異なり CH_3 -THF を CH_2 -THF へと還元することがわかった。次に、この活性の違いを構造に基づいて解明するため、S6MTHFR の基質非結合型と基質結合型 (CH_3 -THF 複合体) の結晶構造をそれぞれ 1.5Å、1.85Å の分解能で決定した。構造情報に基づいた変異体解析から、S6MTHFR が通常型 MTHFR とは逆向きに反応するのは、(1) S6MTHFR が安定な CH_3 -THF の結合サイトを形成できること、そして (2) Leu48 と Pro49 が、NADH の活性部位へのアクセスを阻害しているためであることが明らかになった。このような S6MTHFR の特徴を進化の面から考えるために、アミノ酸配列解析を行なった。その結果、S6MTHFR の類縁酵素は、S6MTHFR の構造に基づいて発見した上記の2つの特徴を酵素に付与するための3つのアミノ酸配列モチーフ、(i) TFL₄₈P₄₉、(ii) C₂₁₉GxGxS、(iii) PF₂₆₉GG を有することがわかった。これらの特徴は、通常型 MTHFR には見られないものである。さらに、アミノ酸配列解析の結果、S6MTHFR およびその類縁酵素は通常型 MTHFR とは異なるクラスターに分類された。興味深いことに、S6MTHFR 型と通常型 MTHFR の2つを有するバクテリアも存在していた。通常の生物の 1C 代謝ではグルコースなど炭素源が豊かになるに伴い、解糖系に由来するグリシンからグリシン開裂系を利用して炭素を利用するように MTHFR が進化した。一部のバクテリアでは炭素源が限られているため、メチル基含有化合物を利用して生存できるようにグリシン開裂系のほかに THF 依存脱メチル化の代謝経路も持つようになったと考えられた。その後、SYK-6 のようにグリシン開裂系遺伝子を欠失して脱メチル化代謝経路に

炭素源を依存するようになり、S6MTHFR 型の MTHFR が $\text{CH}_3\text{-THF}$ を $\text{CH}_2\text{-THF}$ に変換することで 1C 代謝に利用するような仕組みに進化したと考えられる。

本審査の発表では予備審査での指摘事項(1)SEC-MALS や結晶構造解析に関する結果を今一度確認すること、(2)全体の構成を工夫してストーリーをはっきりさせること、(3)本研究による発見が何か、そしてその意義を明確にすること、に適切に対応したことが示され、これらを反映した発表が行われた。質疑応答にも的確に答え、研究内容及び関連する分野に関する十分な知見があることを示した。本審査委員会は全員一致で博士論文の本審査合格と判定した。