

論文内容要旨 (和文)

平成27年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 Petrus Yesaya Samori



論文題目 耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素の構造安定性と機能に関する研究

本論文は、耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素の構造安定性とその機能に関する研究成果をまとめたものである。ファルネシルニリン酸合成酵素 (FPPS) は、イソプレノイドと呼ばれる天然有機化合物群の生合成経路において中心的な役割を担う酵素である。多くのイソプレノイドは医薬品、化粧品、香水、顔料及び着色剤、栄養機能食品などで使われており、経済的価値のある有用な化合物群である。つまり、FPPSの構造安定性、活性、基質特異性および生成物を制御することができれば、有用な化合物の生産を思い通りに行うことが可能となる。これらを実現するためには、FPPSの立体構造や機能の解明が不可欠である。そこで本研究では、耐熱性GsFPPS (*Geobacillus stearothermophilus*) をターゲットとして、次の3つの目的で研究を行った。第一の目的は、耐熱性FPPSの構造安定性に関わる因子を明らかにすることでFPPSの構造を制御し、有機合成へ応用する可能性を高める。第二の目的は、反応生成物の鎖長を制御するTyr81の点変異が構造全体にどのような変化をもたらすのか、そしてその変化によってどのように活性が変化するのかを明らかにする。これらの情報は、FPPSの活性制御に不可欠である。第三の目的は、有機溶媒中でのFPPSの酵素活性を評価できる新規なリアルタイム測定法を開発する。有機合成への応用を考える上で、反応媒体として有機溶媒を用いることは不可避であるが、現在、一般的に使われている測定法は、有機溶媒中での反応測定には向いていないため、代替評価法の開発が必要である。

以上の内容から、本論文は次の5つの章から構成されており、ここではそれぞれの章を概説する。

第1章では、自然界におけるプレニルトランスフェラーゼの役割や反応メカニズム、種類について触れ、GsFPPSを用いる研究背景、そして本研究の目的についてまとめ、記述した。プレニルトランスフェラーゼはイソプレノイドの中間体であるプレニルニリン酸の鎖伸長反応を触媒し、その触媒作用によって生じる二重結合の幾何異性および生成物の鎖長によって分類される。FPPSはE型短鎖プレニルトランスフェラーゼに分類されており、イソペンテニルニリン酸 (C₅, IPP) とその異性体であるジメチルアリルニリン酸 (C₅, DMAPP) を縮合し、ゲラニルニリン酸 (C₁₀, GPP) を経由してkey中間体であるファルネシルニリン酸 (C₁₅, FPP) を合成する。重要な役割を担うこのFPPSはプレニルトランスフェラーゼの中で最も古くから盛んに研究されてきた。FPPSは、幾つかの生理活性物質の合成にも用いられているが、動物由来のFPPSは熱に不安定であり、その調整法と利用条件には制限があった。好熱菌由来の耐熱性FPPSを用いた研究において、古山らは、中等度好熱菌GsFPPSの遺伝子クローニングの多量発現に成功し、様々な基質アナログに対する本酵素の基質特異性等、数多くの研究を行っ

ているが、GsFPPSの立体構造に関する報告例はあまりない。そこで本研究では、GsFPPSの立体構造に着目し、構造安定性や構造機能に関する情報を得ることを目的に研究を行った。

第2章では、耐熱性GsFPPSにおける熱安定性の因子解明についてまとめた。GsFPPSの熱安定性の原因因子を探るためには、GsFPPSの立体構造を明らかにする必要がある。本研究では、古山らによって確立されたGsFPPSの精製法を改善することで、高純度のGsFPPSを得ることができ、それを結晶化してX線結晶構造解析を行うことに成功した。得られたGsFPPSの立体構造は、他の微生物由来耐熱性酵素および常温生物由来酵素と比較することにより、FPPSには構造安定性に関与する「準保存領域」が存在することが明らかとなった。さらに、熱変性シミュレーションにより、その「準保存領域」にあるアミノ酸残基の側鎖サイズこそが、構造全体のパッキングを左右して、安定性を決める因子であることを示した。これら「準保存領域」の存在、およびその熱安定性との関係を明らかにしたのは、今回、我々が初めてである。

第3章では、Tyr81の点変異における構造活性および立体構造への影響について記した。榎らは、Tyr81を他のアミノ酸に置換した点変異酵素Y81D, Y81R, およびY81Sが、プレニル基にエーテル基やヒドロキシ基をもつ基質アナログに対して天然型酵素(W.T.)よりも高い活性を示すことを明らかにした。更なる知見を得るために本研究では、これらの酵素の天然基質に対する活性の違い、およびその違いの原因について研究を行った。酵素活性評価より、活性が高いものから順に、Y81S > Y81R > W.T. > Y81Dとなった。次に各酵素の柔軟性(揺らぎ)を蛍光法および粗視化分子動力学シミュレーションを用いて評価した結果、柔軟性が高いものから順に、Y81S > Y81R > W.T. > Y81Dとなり、これらの結果は、酵素活性と高い相関性が見られた。これは、Tyr81をArgあるいはSerに置換することで、構造全体の柔軟性が増し、基質を受け入れ易くなったためであると考えられる。

第4章では、分光光度計を用いたFPPS酵素活性のリアルタイム測定法の確立について記述した。現在、FPPS酵素活性の評価法は、放射性同位元素¹⁴Cで標識した基質を用いる方法が一般的であるが、これは労働集約的かつ非連続的な方法であるだけでなく、測定者の被曝の問題が付きまとう。そこで本研究では、ベンジル基を有する基質アナログを用いた分光光度計による代替評価法の確立を試みた。基質アナログおよび生成物アナログを化学合成し、分光光度法による反応のモニタリングを行った。その結果、反応生成物は、基質アナログに対して、2倍以上の高いモル吸光係数を示し、反応の進行をリアルタイムで計測できることがわかった。また本方法は、有機溶媒中でのFPPSの活性評価にも応用できることを明らかにした。

第5章では、第2章から第4章までの結果を踏まえて、本研究の結言を次のようにまとめた。GsFPPSには「準保存領域」が存在し、この領域は熱安定性に関わる重要な因子である。この酵素の活性部位の中にあるTyr81を点変異することによって、構造の柔軟性および酵素活性を制御することが可能となることから、将来の有機溶媒中での有機合成を目的とした利用可能性が示唆された。最後にFPPS酵素活性の代替評価法として本方法を用いることで、従来法より簡単な手順で、かつリアルタイムで測定できる可能性を示した。

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成30年 2月13日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 木島 龍朗
 副査 西岡 昭博
 副査 波多野 豊平
 副査 大谷 典正
 副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	専攻・分野名 バイオ工学専攻・バイオ化学分野 氏名 SAMORI PETRUS YESAYA		
論文題目	耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素の構造安定性と機能に関する研究		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	平成30年 1月23日～ 平成30年 1月31日
論文公聴会	平成30年 1月31日	場 所	工学部3号館 2307教室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	平成30年 1月31日
学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)			
<p>本論文は、<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来の耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素 (GsFPPS) の構造安定性とその機能に関する研究成果をまとめた。第1章では、研究背景と研究目的を述べ、第2章では、耐熱性 GsFPPS における熱安定性の因子解明についてまとめた。GsFPPS の熱安定性を生み出す因子を探るために、GsFPPS の立体構造を明らかにする必要がある。申請者は当該酵素の精製、結晶化および X 線結晶構造解析に初めて成功し、GsFPPS の立体構造を明らかにした。更に、FPPS には構造安定性に関与する「準保存領域」が存在することを明らかにし、熱変性シミュレーションにより、その「準保存領域」にあるアミノ酸残基の側鎖サイズこそが、構造全体のパッキングを左右して安定性を決める因子であることを示した。第3章では、Tyr81 の点変異による酵素活性および立体構造への影響について記し、点変異酵素 Y81D, Y81R, および Y81S がプレニル基にエーテル基やヒドロキシ基をもつ基質アナログに対して天然型酵素 (W.T.) よりも高い活性を示すことを明らかにした。更に、各酵素の柔軟性 (揺らぎ) を蛍光法および粗視化分子動力学シミュレーションを用いて評価し、酵素活性と柔軟性との間の高い相関性を明らかにした。第4章では、分光光度計を用いた GsFPPS 活性のリアルタイム測定法について記述しており、現在の放射性同位元素で標識した基質を用いる現行法に替わる、新しい評価方法としての可能性について言及した。同法は、基質アナログと酵素反応によって得られる生成物の吸光度差を利用して反応進行を測定する方法であり、これまで不可能であった有機溶媒中での酵素活性評価を可能とする画期的手法であることを示した。第5章では、論文全体を総括し、本研究で得られた成果の学術的意義と将来性についてまとめた。</p> <p>本論文で得られた研究成果は、この学位論文に密接に関連する査読付き筆頭著書英語論文1報が学術雑誌に掲載済みで、査読付き国際学会でも主著者として2件の発表を行っており、当該専攻の審査基準を満たしている。以上より、本論文により得られた知見およびその成果は、学術的にも工学的にも価値があるものと認め、博士 (工学) の学位論文として合格と判定した。なお、本研究は動物実験委員会承認 (承認番号: 2663, 2855) のもとで行われており、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ない。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験は、学位論文に関する40分の口頭発表の後に、主査・副査の審査委員およびその他の参加教員等により40分以上に渡り、質疑応答を行う形で実施された。論文申請者の専門的知識と学位論文の妥当性、論理性について深い議論が行われた。その結果、博士の学位を授与するのに十分な知識と能力を有していると判断されたため、最終試験について合格と判定した。</p>			