

(論文内容の要旨)

D-セリンは哺乳類の脳に高濃度に存在し、グルタミン酸受容体の一つである *N*-メチル-D-アスパラギン酸受容体の内在性アゴニストとして脳の高次機能発現に関与する。D-セリンの生合成はセリンラセマーゼが担うと考えられている。本酵素はピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とし、セリンのラセミ化を触媒する。そのホモログは高等動物のみならず種々の生物に広く存在しており、これまでにカイコ、ラット、マウス、ヒト、シロイヌナズナなどから精製や遺伝子クローニングが行われている。本酵素の構造や反応機構に関する知見は、本酵素の異常が原因となる疾患の治療薬開発などに重要な指針をあたえるものと期待されるが、精密立体構造や詳細な反応機構は明らかにされていない。本研究は、哺乳類由来セリンラセマーゼのホモログである分裂酵母由来セリンラセマーゼの構造と機能を解析したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. 分裂酵母由来セリンラセマーゼの cDNA をクローニングし、大腸菌を宿主とする発現系を構築し、酵素を単離精製した。本酵素はセリンのラセミ化と脱水反応を触媒し、 Mg^{2+} などの二価カチオンや ATP により活性化される点で、他生物由来のセリンラセマーゼと類似した性質をもつことが示された。一方、質量分析により、本酵素が基質であるセリンと反応する過程で、基質により修飾されることを明らかにした。修飾型酵素はセリンを含まない溶液中でも脱修飾されず、修飾が不可逆的に起こることが示された。修飾型セリンラセマーゼの X 線結晶構造解析を行った結果、非修飾型酵素において PLP と結合する Lys57 に、基質に由来する D-アラニンの β -炭素が共有結合し、その D-アラニンのアミノ基と PLP がシッフ塩基を形成したユニークな構造をもつことが見いだされた。また、修飾型酵素も非修飾型酵素と同様にセリンのラセミ化活性と脱水活性(デヒドラターゼ活性)をもつことが明らかになった。修飾型酵素とセリンの複合体の X 線結晶構造解析により、修飾型酵素の活性部位に基質が結合する空間のあることが示され、修飾型酵素が活性をもつことを構造の面からも矛盾無く説明できることが明らかとなった。修飾型酵素で導入された D-アラニンのアミノ基は、非修飾型酵素で触媒基として働く Lys57 の ϵ -アミ

ノ基を代替し触媒基として働くものと考えられた。

2. X線結晶構造解析により、セリンラセマーゼがホモダイマー構造をもち、各サブユニットが大小二つのドメインによって構成されること、また、各ドメインが α/β 構造をもつことが明らかになった。これにより本酵素が典型的なピリドキサル酵素タイプ II 構造をもつことが示された。また、基質結合に伴ってドメインが動き、活性部位が閉じた構造に変化することも示された。さらに、本酵素の活性化因子である Mg^{2+} の結合部位も明らかになった。 Mg^{2+} は活性中心から離れた部位に結合しており、酵素の構造を維持する役割があるものと推定された。一方、ATP アナログである 5'-アデニルルメチレンニリン酸との複合体の X 線結晶構造解析により、ATP アナログが、酵素のホモダイマーを構成する 2 つのサブユニットの境界において、サブユニットを構成する大ドメインと小ドメインの間に結合することを見いだした。ATP は 2 つのサブユニットの相対的な位置関係やドメインの動きを制御するほか、PLP の 3'-水酸基を含む水素結合ネットワーク形成に関与することによって酵素活性を制御するものと考えられた。

3. セリンラセマーゼによるラセミ化反応が 2 塩基機構で進行し、塩基のうち一つが PLP とシッフ塩基を形成する Lys57 であることを明らかにした。また、X 線結晶構造解析により、Ser82 がもう一つの塩基であることを見いだした。このセリン残基をアラニン残基に置換した S82A 変異型酵素はセリンのラセミ化活性および D-セリンデヒドラターゼ活性を示さないものの、L-セリンデヒドラターゼ活性を示した。これにより、Ser82 が D-セリンからのプロトン引き抜きと中間体へのプロトン付加による D-セリンの合成に直接関与することが明らかになった。また、S82A 変異型酵素も野生型酵素と同様、反応中に L-セリンによって修飾されることが示され、修飾反応と脱水反応が同一の中間体を経て進行するものと考えられた。

氏名

山内 貴恵

(論文審査の結果の要旨)

セリンのラセミ化を触媒するセリンラセマーゼは動植物や酵母など種々の生物に存在し、哺乳類の脳では神経伝達に關与する D-セリンの生合成という重要な機能を担っている。セリンラセマーゼの組織分布や細胞内動態などの生理的性質は明らかにされつつあるが、その立体構造や反応機構は十分に解明されていない。本研究は、哺乳類由来セリンラセマーゼのホモログである分裂酵母由来セリンラセマーゼの立体構造と触媒機構を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. セリンラセマーゼの酵素学的性質を明らかにし、本酵素が哺乳類セリンラセマーゼと類似の性質をもつことを示した。また、本酵素が基質であるセリンによって修飾されることを見いだすとともに、修飾型酵素が活性をもつことを明らかにした。修飾型セリンラセマーゼの立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにし、修飾型酵素では、非修飾型酵素で PLP と結合している Lys57 と PLP との間に、基質由来の D-アラニンが挿入されていることを明らかにした。また、修飾型酵素と基質との複合体の X 線結晶構造解析によって、修飾型酵素の基質結合部位を見だし、修飾型酵素が酵素活性をもつことを構造面から矛盾無く説明できることを示した。これは、基質由来のアミノ基が触媒基として機能するユニークな現象を見いだしたものであり、酵素科学的観点からきわめて高く評価できる。

2. セリンラセマーゼの X 線結晶構造解析により、ATP アナログである 5'-アデニルルメチレンニリン酸と Mg^{2+} の結合部位を明らかにした。これらは、ATP と Mg^{2+} によるセリンラセマーゼ活性化の機構解明に重要な手がかりをあたえるものとして高く評価できる。

3. セリンラセマーゼの部位特異的変異、速度論的解析、X 線結晶構造解析により、Ser82 が D-セリンの α -プロトン引き抜きを担う触媒残基であることを明らかにした。また、S82A 変異型酵素による L-セリンの脱水反応と活性部位の修飾反応が共通の中間体を経て進行することを明らかにした。これらの結果は、セリンラセマーゼの精密な触媒機構を明らかにしたものとして評価に値する。

以上のように本論文は分裂酵母由来セリンラセマーゼの精密立体構造、活性化因子の結合部位、触媒機構を明らかにするとともに、活性部位のユニークな修飾反応を見いだしたものであり、生化学、微生物科学、酵素化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 6 月 11 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。