

氏名	もり 森 じげ た ろう 茂 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1529 号
学位授与の日付	平成 17 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科食品生物科学専攻
学位論文題目	Studies on crystal structure of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> NAD kinase and structure-function relationship of microbial NAD kinases (結核菌由来 NAD キナーゼの結晶構造と微生物由来 NAD キナーゼの構造機能相関に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 村田幸作 教授 清水 昌 教授 井上國世

論 文 内 容 の 要 旨

NAD キナーゼは、NAD のリン酸化による NADP の生合成反応を触媒する酵素であり、リン酸供与体利用能の違いによって、ポリリン酸/ATP-NAD キナーゼと ATP-NAD キナーゼの 2 種類に分類される。ポリリン酸/ATP-NAD キナーゼは、ポリリン酸（オルトリン酸が縮重合した化合物）と ATP の両方をリン酸供与体として利用し、多くのグラム陽性細菌 [*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) や *Micrococcus flavus* など] に存在する。ATP-NAD キナーゼは、ATP のみを利用し、グラム陰性細菌 (*Escherichia coli* や *Sphingomonas* sp. A1 株など) 並びに真核生物 (*Saccharomyces cerevisiae* など) に見出されている。この様に、種々の生物種由来 NAD キナーゼが報告されているが、NAD キナーゼのリン酸受容体特異性や NAD キナーゼの立体構造、特に基質との複合体（ホロ型）の構造に関する知見は得られていない。また、*S. cerevisiae* 由来 NAD キナーゼ (Utr1p, Pos5p, Yef1p) は、NADH を NADPH にリン酸化する NADH キナーゼ活性も有するが、*Sphingomonas* sp. A1 株由来 NAD キナーゼ (NadK) は NADH キナーゼ活性を示さないことが報告されている。しかし、NAD キナーゼのリン酸受容体特異性に関する明確な知見は得られていない。

本研究では、NAD キナーゼの高次構造解析及び構造と機能の相関の解明に焦点を当て、種々の細菌由来 NAD キナーゼのリン酸受容体特異性、結核菌由来 NAD キナーゼのアポ型・ホロ型 (NAD との複合体) の高次構造、及び NAD キナーゼの構造とリン酸受容体特異性との相関を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、種々の細菌由来 NAD キナーゼのリン酸受容体特異性を明らかにし、それらの結晶化を行った。その結果、*M. tuberculosis* (結核菌) 由来 NAD キナーゼ (Ppkn) と *M. flavus* 由来 NAD キナーゼ (Mfnk) は NADH キナーゼ活性を示すが、*E. coli* 由来 NAD キナーゼ (YfjB) は NAD を特異的にリン酸化することが明らかとなり、NAD キナーゼは、リン酸受容体利用能の違いによって 2 種類に分類できることが示された。また、結晶構造解析に適した Ppkn のアポ型 (apo-Ppkn) 並びに基質 NAD との複合体であるホロ型 (Ppkn-NAD) の結晶を調製し、その結晶学的諸性質を明らかにした。

第 2 章では、apo-Ppkn と Ppkn-NAD の結晶を用いて、Ppkn の立体構造を決定した。Ppkn の立体構造は、 α -ヘリックス/ β -シート/ α -ヘリックスからなる N-ドメインと 6 本の逆平行 β -ストランドからなる β -シートが 2 枚向かい合った構造の C-ドメインから構成されており、両ドメイン間に存在するクレフトに NAD1 分子が結合していることを明らかにした。また、apo-Ppkn、並びに Ppkn-NAD とともに溶液中と同様に結晶中でも 4 量体を形成していることを見出した。さらに、サブユニット間の相互作用に関与し、かつ NAD 結合サイトの形成にも寄与していると考えられる 1 本のループ (Ppkn-flexible loop と命名) 構造が、apo-Ppkn と Ppkn-NAD において明らかに異なっていることを見出した。

Ppkn-NAD の立体構造並びに部位特異的変異に関する検討の結果、NAD 結合サイトの形成に関与するアミノ酸残基 (全ての NAD キナーゼ並びにそのホモログの一次構造において高度に保存されていた) を特定し、NAD キナーゼの一次構造における新しいモチーフ (N/ED short motif) の存在を示した。また、Ppkn における NAD 結合サイトの形成には隣

接するサブユニット由来のアミノ酸残基 (Asp-189 と His-226), すなわち 2 量体構造の形成が深く関与することを明らかにした。この結果, Ppnk-flexible loop の役割も考え併せ, NAD 結合サイト形成における 2 量体構造を基本としたサブユニット間相互作用の重要性が示された。

さらに, これまでに同定されている NAD キナーゼは全て 2 量体が会合した多量体構造を形成していること, 及び Ppnk において隣接するサブユニットの NAD 結合サイトの形成に寄与している残基 (Asp-189 と His-226) は全ての NAD キナーゼ並びにそのホモログの一次構造において高度に保存されていることから, Ppnk 以外の NAD キナーゼにおいても, NAD 結合サイトの形成には多量体構造 (特に 2 量体構造) の形成に伴うサブユニット間の相互作用が重要であることが示された。このことにより, 全ての NAD キナーゼが 2 量体の会合した多量体構造を形成する理由が明らかになった。

第 3 章では, NAD キナーゼの構造とリン酸受容体利用能との相関について解析した。NAD キナーゼは, NAD と NADH のリン酸化反応を触媒するグループ (Ppnk, Mfnk, Utr1p, Yef1p, Pos5p) (以後, NADH キナーゼと称する) と NAD のみのリン酸化反応を触媒するグループ (YfjB, NadK) に分類される。Ppnk の立体構造情報に基づき, Ppnk の Gly-187 に相当するアミノ酸残基が, NADH キナーゼでは Gly あるいは極性アミノ酸 (Gln, Thr) であるのに対して, NAD キナーゼでは荷電性アミノ酸 (Arg) であることを見出し, 本残基がリン酸受容体利用能を規定していると推測した。そこで, NAD キナーゼ (YfjB, NadK) において, 着目した部位 (YfjB では Arg-175, NadK では Arg-180) に位置する Arg を Gly に置換した。その結果, 両置換体ともに NADH キナーゼ活性を示すようになった。すなわち, 1 アミノ酸残基の置換により, NAD キナーゼを NADH キナーゼに機能変換することに成功した。さらに, YfjB において, Arg-175 を極性アミノ酸 (Gln, Thr, His) に置換した変異体にも NADH キナーゼ活性が認められたが, 荷電性アミノ酸 (Lys, Glu) あるいは疎水性アミノ酸 (Ile) に置換した変異体では NADH キナーゼ活性は認められなかった。また, Arg-175 を Gly に置換した変異体では, NAD キナーゼ活性自体が低下していたため, 本残基は NAD キナーゼ活性にも重要であると考えられた。一方, NADH キナーゼ (Mfnk) において, 対応した Gly-183 を Arg に置換した変異体においては NADH キナーゼ活性の消失は認められなかったが, その活性は有意に低下していた。また, NAD キナーゼ活性自体も低下していた。これらの結果より, NAD キナーゼにおいては, 着目した部位に位置する荷電性あるいは疎水性アミノ酸残基が NAD への特異性を規定している (本残基が Gly あるいは極性アミノ酸残基ならば, NADH キナーゼ活性も示すようになる) が, NADH キナーゼにおいては, 着目した位置に存在する Gly や極性アミノ酸残基は, NADH キナーゼ活性に重要な残基であるが, NADH 利用能を決定している唯一の要因ではないことが明らかになった。また, 該当する残基は, 隣接するサブユニットの NAD 結合サイトに位置しており, かつ NAD キナーゼ活性自体にも重要であることから, NAD キナーゼ並びに NADH キナーゼ活性には, 多量体 (特に 2 量体) 構造の形成に伴うサブユニット間の相互作用が重要であることが示された。この結論は, Ppnk の立体構造解析より得られた知見 (第 2 章) と一致した。

さらに, NAD キナーゼにおいて, NAD への特異性を規定するアミノ酸残基 (例: YfjB Arg-175) が, 多様な生物種由来 NAD キナーゼホモログにおいて, 高度かつ特徴的に保存されていることを示した。

論文審査の結果の要旨

NAD キナーゼは, NAD のリン酸化による NADP の生合成反応を触媒する酵素である。従来, NAD キナーゼは, ポリリン酸 (オルトリン酸が縮重合した化合物) と ATP の両方をリン酸供与体として利用するポリリン酸/ATP-NAD キナーゼと, ATP のみを利用する ATP-NAD キナーゼの 2 種類に分類されていた。ポリリン酸/ATP-NAD キナーゼは *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) や *Micrococcus flavus* などのグラム陽性細菌に, ATP-NAD キナーゼは *Escherichia coli* や *Sphingomonas* sp. A1 株などのグラム陰性細菌, あるいは *Saccharomyces cerevisiae* などの真核生物に見い出されている。しかし, NAD キナーゼの諸性質の解析は遅れており, 例えば, NAD キナーゼのリン酸供与体利用能については多数の報告例があるが, リン酸受容体特異性に関しては不明な点が多い。また, NAD キナーゼの立体構造, 特に基質との複合体 (ホロ型) の構造も明らかにされていないため, 本酵素の構造と機能の相関に関する理解も進んでいなかった。

本研究は, 種々の細菌由来 NAD キナーゼのリン酸受容体特異性, 結核菌由来 NAD キナーゼ (Ppnk) のアポ型・ホロ型 (NAD との複合体) の高次構造, 及び NAD キナーゼの構造とリン酸受容体特異性との相関を解析し, NAD キナーゼ

の触媒機能と構造との関係の詳細を明らかにしたものである。評価すべき点は、以下の通りである。

1. 種々の細菌由来 NAD キナーゼにおけるリン酸受容体利用能を明らかにした。その結果、NAD キナーゼは、NAD と NADH の両方をリン酸化するグループと NAD のみをリン酸化するグループに分類できることを示した。
2. 結核菌由来 NAD キナーゼ (Ppnk) のアポ型 (apo-Ppnk) 並びに NAD との複合体であるホロ型 (Ppnk-NAD) の立体構造を決定した。本酵素が α -ヘリックス/ β -シート/ α -ヘリックスからなる N-ドメインと 6 本の逆平行 β -ストランドからなる β -シートが 2 枚向かい合った構造の C-ドメインから構成されていること、並びに両ドメイン間に存在するクレフトに NAD1 分子が結合していることを明らかにした。また、Ppnk が溶液中と同様に結晶中でも 4 量体を形成することを示した。さらに、隣接するサブユニットにおける NAD の結合に関与していると予想され、かつ apo-Ppnk と Ppnk-NAD とで構造が異なるループ (Ppnk-flexible loop と命名) を見出した。
3. NAD キナーゼ (Ppnk) における NAD の結合様式を明らかにし、NAD 結合サイトの形成に関与しているアミノ酸残基を特定した。これらのアミノ酸残基は、全ての NAD キナーゼ並びにそのホモログの一次構造において高度に保存されていた。その結果、NAD キナーゼの一次構造における新しいモチーフ (N/ED short motif) の存在を示した。
4. NAD 結合サイトの形成には、サブユニット間の相互作用による多量体 (特に 2 量体) 構造の形成が重要であることを示し、全ての NAD キナーゼが 2 量体以上の多量体構造を形成する理由を提示した。
5. NAD キナーゼ (Ppnk) の立体構造情報に基づいて NAD キナーゼの構造とリン酸受容体特異性との相関を解析し、NAD への基質特異性を規定しているアミノ酸残基を特定すると共に、NAD キナーゼを NADH キナーゼに機能変換させる分子レベルでの手法を示した。
6. NAD への基質特異性を規定しているアミノ酸残基が、多様な生物種由来 NAD キナーゼホモログにおいても高度かつ特徴的に保存されていることを示した。

以上のように、本論文は、種々の細菌由来 NAD キナーゼのリン酸受容体特異性、並びに結核菌由来 NAD キナーゼ (Ppnk) の高次構造を明らかにすることにより、生体エネルギー代謝と連動した NADP と NADPH の生合成機構、並びに NAD キナーゼの構造・機能相関に関して多くの新しい知見を与えた。また、高次構造情報に基づいて酵素機能を変換する方法論を示した。これらの結果は、応用微生物学、酵素科学、生物機能変換学及び構造生物学の発展に寄与するところが大い。

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17年9月15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。