

氏名	丹 羽 一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2001号
学位授与の日付	平成10年9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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	脂肪酸合成酵素複合体のX線結晶構造解析のための発現系の構築と精製 (主査)
論文調査委員	教授 柳田充弘 教授 藤吉好則 教授 七田芳則

論 文 内 容 の 要 旨

これまで、精製や結晶化の困難さから、比較的容易に大量に精製できる分泌蛋白質や、基質との結合で安定化するDNA結合蛋白質などが主に結晶構造解析されてきた。しかし近年、生体内の反応は酵素と基質のランダムな衝突による酵素機能発現というよりむしろ複合体を形成し、微妙かつ精巧な調節機構、伝達機構を備えた超分子システムを構築している場合が多いのではないかと考え始められ、にわかに複合体の構造解析が注目を集めてきている。申請者は、脂肪酸合成酵素複合体にみられる、酵素間の反応中間体を溶媒中に拡散することなく連続的に反応を触媒するチャンネル機構が、これら超分子複合体の本質であるととらえ、その構造特性を原子レベルで明らかにすることを最終の目的に、その発現系の構築と精製を行った。本論文では分裂酵母を用いた大量発現系から得られた脂肪酸合成酵素複合体の分子構造、電子顕微鏡観察による巨視的な構造についても報告している。

脂肪酸合成酵素はアセチルCoAとマロニルCoAから直鎖飽和脂肪酸、主に炭素鎖16のパルミチン酸を合成する酵素で、大腸菌からヒトまでその反応機構は非常によく保存されている。最終的にパルミチン酸が合成されるまでに、アシル基転移、マロニル基転移、縮合、還元、脱水、再還元、パルミチル基転移反応が起こる。申請者は、これらの反応を担う酵素がa、bという二つのサブユニットに局在して、多機能酵素複合体を形成していると考えられる分裂酵母を材料にして研究を行った。

申請者は、分裂酵母*S. pombe*脂肪酸合成酵素bサブユニットをコードする遺伝子をPCR法を用いて単離し、*fas 1*⁺と命名した。大量発現系の構築は、分裂酵母脂肪酸合成酵素aサブユニット*Isd 1*⁺/*fas 2*⁺遺伝子とともに*nmt 1*⁺発現ベクターに組み込み、分裂酵母に導入している。この発現系から精製された酵素複合体は4400mU/mg以上の高い比活性を持ち、精製量も0.5-1 mg/lと、質、量的に結晶解析に充分であることを示した。また分裂酵母脂肪酸合成酵素が、a、b、2種のサブユニットからなるヘテロ12量体型(a₆b₆)構造をとっていることを遺伝学的、生化学的に明らかにした。さらに電子顕微鏡観察から酵素複合体が32または622対称を持つ中空のかご型の構造であることを見いだした。このかご型構造は、中央にリング状構造、その上下に小さなディスク状構造、それらをつなぐ6本乃至12本のアーチ状構造からなっており、抗体によるサブユニット認識実験によって、中央のリング構造がaサブユニットである可能性が示唆された。支持膜を用いない染色方法で複合体の大きさは、リング直径はおよそ16nm、高さは20nmと報告している。

結晶化の条件検討のひとつのアプローチに遺伝学的な手法を導入した例として、構造的に安定性が増すと期待できる不活性化した複合体を作る変異遺伝子の作成についても報告している。

論文審査の結果の要旨

近年、構造生物学に分子生物学的な手法が導入されてきている。その背景として、巨大分子の原子レベルでの構造解析に必須な結晶構造解析には大量の均一な蛋白質試料が必要だが、標的蛋白質がいつも細胞内に十分な量存在するとは限らないこと。また、生物界に存在する何十万種にも及ぶ蛋白質に対しアミノ酸の折れ畳み方はせいぜい1000程度しかないというChothiaの予想に代表される、機能に対応した普遍的な構造モチーフなど存在しないという見解から、機能と構造の相関を探るには変異体解析が必要となってくること、などがあげられる。こうした現状に対する分子生物学的な最も効果的なアプローチとして挙げられるのが大量発現系の構築であり、申請者はこうした事実を踏まえ、他に類を見ないような巨大分子複合体の共発現系を構築した。

脂肪酸合成酵素はチャンネルリングを行う酵素の中でも、反応中間体を自身に共有結合させることで溶媒中への拡散を防いでいる、もっとも高次の代表的なチャンネルリング酵素である。生物種によるサブユニット構造は多様だが、どれも7つの活性ドメインと反応中間体を保持するアシルキャリアードメインをもつ、分子量100万ダルトン以上の巨大分子複合体で、結晶化において非常に挑戦的な課題である。また連続的触媒機構を備えた超分子複合体の結晶化はこれまで報告されておらず、その意味でも意義深い。

申請者は、分裂酵母の脂肪酸合成酵素bサブユニットのクローニングを行い、aサブユニットとの大量共発現系を構築し、複合体蛋白質の精製に成功した。精製された複合体は、質、量ともにX線結晶構造解析に十分なものであった。大腸菌で盛んな発現系も脂肪酸合成酵素のような巨大で、複雑なサブユニット構造をもつ蛋白質には適さない場合が多く、本研究の真核生物の分裂酵母での発現系の確立は有意義である。また申請者は、分裂酵母の脂肪酸合成酵素がa₆b₆型の分子構造を持つことを遺伝学的、生化学的に確認した。このことは、分子構造による脂肪酸合成酵素の多様性を説明する上で重要である。さらに申請者は電子顕微鏡観察による複合体の巨視的な構造解析において、a₆b₆型脂肪酸合成酵素で共通したかご型構造を報告している。かご型構造を構成するリング状、アーチ構造まで観察しており、抗体を用いて、リング状構造がaサブユニットである可能性も示唆した。これらのことは、構造と酵素機能を考える上での初期的な情報として貴重なものといえる。

以上の結果は、連鎖的触媒機構を構造面から解明するための脂肪酸合成酵素の原子レベルでの構造解析に大きく貢献した。よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。