

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	小 林 淳
論文題目	Studies on Structures and Functions of Vitamin B ₆ Degrading Enzymes (ビタミン B ₆ 分解酵素群の構造と機能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ビタミン B₆ 分解経路は、根粒菌 <i>Mesorhizobium loti</i> や一部の土壌細菌が持つ、ビタミン B₆ を資化する経路である。本経路は 8 段階の酵素反応によりビタミン B₆ を酢酸、アンモニア、二酸化炭素、コハク酸セミアルデヒドへと分解する。本経路内には、糖尿病合併症の治療薬の合成、ファインケミカルの合成、クオラムセンシングやアルツハイマー病の診断等の産業的に応用が可能な酵素が多い。さらに特殊なアミノ基転移、不均化、開環、加水分解反応を触媒する酵素があり、学術的にも興味深い。こうした背景から、本経路内の反応を触媒する全酵素の酵素学的性質が明らかにされ、3 種の酵素についてはその結晶構造が決定されている。本研究は、本経路内の 3 番目のラクトン環加水分解反応を触媒する亜鉛依存性の 4-Pyridoxolactonase、7 番目のピリジン環開裂反応を触媒する FAD 依存性の 2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase、および 8 番目の加水分解反応を触媒する α-(N-Acetylaminomethylene)succinic acid amidohydrolase の結晶構造を新たに決定し、それらの構造と機能の相関を明らかにしたものであり、その内容は以下のように要約される。</p>			
<p>1. 4-Pyridoxolactonase の結晶構造を単波長異常分散法により決定し、1.6 Å 分解能で精密化した。本酵素の全体構造は $\alpha \beta / \beta \alpha$ サンドイッチフォールドであり、クラス B β-ラクタマーゼとの rmsd の値が 3 Å 程度の低い類似性を示した。本酵素の活性部位には His96、His98、Asp100、His101、His185、Asp207、His252 の側鎖によって配位される 2 つの亜鉛イオンが存在したことから本酵素はクラス B β-ラクタマーゼのサブクラス B3 に属することが推定された。しかし、本酵素と拮抗阻害剤 5-Pyridoxolactone との複合体の結晶構造を 2.3 Å 分解能で精密化し、この構造を基にした基質および反応中間体とのドッキングシミュレーションを行った結果から、本酵素はサブクラス B3 の酵素群ではなく、1 つの亜鉛イオンを配位したサブクラス B2 の酵素群と類似した様式で基質や反応中間体を結合することが示された。このことから本酵素はクラス B β-ラクタマーゼのサブクラス B2 の触媒機構により反応を触媒することが強く示唆された。</p>			
<p>2. 2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase の結晶構造を分子置換法により決定し、1.9 Å 分解能で精密化した。本酵素の全体構造は α / β フォールドの FAD 結合ドメインと基質結合ドメインから成り、FAD 依存性のモノオキシゲナーゼとの rmsd の値が 3 Å 程度の低い類似性を示した。次に、本来の基質に比べて代謝回転数が 5% に減少する代替基質 5-Pyridoxic acid との複合体結晶構造を 1.8 Å 分解能で精密化し、本複合体では活性部位に存在する Tyr270 が構造変化を起こすことを明らかにした。この Tyr270 を部位特異的変異導入により Phe270 と Ala270 に変異させ、基質存在下におけるピリジン環開裂活性と、基質非存在下における NADH オキシダーゼ活性を野生型酵素と比較した結果、野生型酵素では NADH オキシダーゼ活性に対しピリジン環開裂活性が 6800 倍促進されていたのに対し、両変異酵素ではその促進効果が失われていることが明らかとなった。このことから Tyr270 の側鎖がピリジン環開裂活性を促進させていることが明らかになった。</p>			

3. α -(*N*-Acetylamino)methylene)succinic acid amidohydrolase の結晶構造を分子置換法で決定し、2.7 Å分解能で精密化した。本酵素の全体構造は α/β ヒドロラーゼフォールドドメインとキャップドメインからなり、本酵素の推定活性部位には、Ser106-His258-Asp130 と Ile41-Leu107 がそれぞれセリンプロテアーゼにみられる典型的な触媒三残基とオキシアニオンホールを形成していた。このことから未同定であった本酵素の触媒残基は Ser106-His258-Asp130 の触媒三残基であることが明らかになった。さらに、本酵素の一次構造の BLAST 検索によって、本酵素と相同な位置に触媒三残基を持つ、エステラーゼやデハロゲナーゼ等の多数の加水分解酵素が存在することが示され、本酵素を含むこれらの酵素群が α/β ヒドロラーゼスーパーファミリーにおいて新たなサブクラスを形成していることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ビタミン B₆ 分解経路は、根粒菌 *Mesorhizobium loti* や一部の土壌細菌が持つ、ビタミン B₆ を資化する経路である。本経路内の反応を触媒する酵素群は産業的・学術的に有用であることから、経路内の全酵素の酵素学的性質が明らかにされ、さらに 3 種の結晶構造が決定された。本論文は、経路内反応を触媒する 3 種の酵素、4-Pyridoxolactonase、2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase、 α -(*N*-Acetylaminomethylene)succinic acid amidohydrolase の結晶構造を新たに決定し、それらの構造と機能の相関を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下の 3 点である。

1. 4-Pyridoxolactonase の結晶構造を 1.6 Å 分解能で精密化した。さらに 4-Pyridoxolactonase/5-Pyridoxolactone 複合体の結晶構造を 2.3 Å 分解能で精密化し、この複合体構造を基に、基質および反応中間体との複合体のドッキングシミュレーションを行い、本酵素の触媒機構がクラス B β -ラクタマーゼのサブクラス B2 に類似することを明らかにした。
2. 2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase の結晶構造を 1.9 Å 分解能で精密化した。さらに 2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase/5-Pyridoxic acid 複合体の結晶構造を 1.8 Å 分解能で精密化し、その構造情報を基に、Tyr270 変異体の速度論的解析を行い、本酵素の活性発現における Tyr270 の役割を明らかにした。
3. α -(*N*-Acetylaminomethylene)succinic acid amidohydrolase の結晶構造を 2.7 Å 分解能で精密化し、本酵素の触媒残基が Ser106-His258-Asp130 の触媒三残基であることを明らかにした。さらに、BLAST 検索から α / β ヒドロラーゼスーパーファミリーにおいて本酵素と相同な位置に触媒三残基を持つ加水分解酵素のサブクラスが存在することを提唱した。

以上のように、本論文はビタミン B₆ 分解経路に関与する 3 種の酵素について結晶構造を解明し、それらの構造と機能の相関の一端を明らかにしたものであり、微生物学、酵素学、構造生物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 26 年 7 月 10 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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）