

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	丹羽 智美
論文題目	ヘム A 合成酵素の構造生物学的研究		
(論文内容の要旨)			
<p>ヘムAは呼吸鎖末端酵素であるシトクロム酸化酵素の補欠分子族であり、酸素還元部位とプロトンチャネルを形成している。ヘムAはシトクロムaファミリー中でしか見られないことから、分子状酸素還元反応に重要であることが示唆される。ヘムAは生体内で一般的に見られるヘムBとは異なり、2位にヒドロキシエチルファルネシル基を、8位にホルミル基を持つ。生体中では、ヘムAはヘムOの8位のメチル基がホルミル基に変えられることで合成されている。この反応を触媒する酵素はヘムA合成酵素(HAS)である。HASは内在性の膜タンパク質であり、ヘムBを補因子として結合している。HASは好気生物にとって重要であるが、その反応機構は不明である。これは、活性を保った状態でHASを単離・精製した例がないことに加え、構造も不明であることに由来する。現在最も研究が進んでいるのは枯草菌<i>B. subtilis</i>由来HAS(BsHAS)である。BsHASは大量発現系が構築されており、また種々の変異体も作製されている。しかしながら、構造が不明であるために、生化学的実験や変異体解析の結果の解釈は困難であった。そこで、本研究ではBsHASの構造解析をおこなった。また、得られた構造から過去の研究の結果の再解釈を試み、最終的にヘムA合成反応について考察した。</p> <p>Lipidic cubic phase法を用いてBsHASの結晶化をおこなったところ、最長辺20 μm程度の結晶が得られた。これらの結晶を用いて回折データを収集し、重原子同型置換法による位相決定とモデル構築をおこなった。その結果、2.2 Å分解能での構造決定に成功し、アミノ酸の側鎖の配向や水分子といった反応考察に必要な情報を得ることができた。</p> <p>BsHASは8回膜貫通型の膜タンパク質であり、N端側のTM1-TM4とC端側のTM5-TM8はそれぞれドメインを形成していた。各ドメインは4-ヘリックスバンドル型のヘム結合サイトを形成しており、C端側ドメインには補因子であるヘムBが1分子結合していた。N端側ドメインのヘム結合サイトは空であり、かつ膜外ループECL1によって占められていたことから、得られた構造が基質非結合型であることが判明した。2つのドメインの膜貫通部位はよく一致し、分子内擬似二回対称の関係にあった。しかしながら、配位子となるヒスチジンを保持している膜貫通ヘリックスでは両者の構造が異なっており、これは基質結合ドメイン側のTM2、TM4での主鎖構造の崩れに由来していた。このことから膜貫通ヘリックスTM2、TM4の可動性が推測された。また、N端側とC端側のドメインにそれぞれ属している大きな膜外ループECL1、ECL3は、アミノ酸配列が類似しているにもかかわらず全く異なる構造を取っていた。</p> <p>さらに、結晶構造と擬似二回対称性を利用することで基質結合型構造のモデルを作成した。得られた構造では、補因子ヘムと基質ヘムの最近接距離は13 Å程度であった。これは、ヘム間で電子伝達が可能であることを示している。また、完全に保存されているGlu57が基質であるヘムOの8位メチル基近傍に位置していた。ヘムA生合成におけるホルミル化反応の酸素源は水分子であることが示されている。基質結合型構造ではGlu57とメチル基の周囲に水分子が占有できる空間が存在し、かつこの空間は膜外ループECL1によって外界とは隔絶されていた。このことから、Glu57が触媒残基であることが強く示唆された。</p>			

得られた基質非結合型・基質結合型構造から、過去の文献で報告されていた変異体解析実験の解釈と考察をおこなった。ヘムの配位子となるヒスチジンの変異体の特徴から、補因子ヘムが構造の保持だけではなく、実際に反応に寄与していることが推測された。このことは、基質結合型構造でのヘム間距離が電子伝達可能な距離であることとも一致する。一方で、変異体解析の結果からECL1、ECL3のシステイン残基がジスルフィド結合を形成し、キノンなどの電子伝達体の結合サイトとなる可能性が示唆されていた。しかしながら、実際の構造中では、確かにジスルフィド結合は形成されていたものの、細胞外側領域に完全に露出していた。このため、ジスルフィド結合がキノンの結合サイトとなる可能性はやや低いと考えられる。

最後に、これまでに得られている知見と今回の構造に基づき、生体内でのヘムA合成反応について考察をおこなった。基質であるヘムOはヘムO合成酵素(HOS)から直接HASに渡されることが知られている。HOSの構造も未だに不明であるが、同じファミリーに属するタンパク質の既知構造を利用してホモロジーモデリングをおこなうことで、HOSのモデル構造を作成することができた。得られたHOSとHASの構造、およびHOS-HASの複合体構造から、ヘムO結合機構を提案した。この機構では、はじめにヘムOのヒドロキシエチルフェルネシル基がHASと相互作用する。これにより、HASの膜貫通ヘリックスの構造変化が誘起され、引き続いてヘムOとヒスチジンが相互作用する。これにより、ECL1は完全に細胞外側へと移動し、触媒残基であるGlu57がヘムOのメチル基と相互作用可能な状態になる。

また、ホルミル化反応機構についても考察をおこなった。HASの触媒する反応においては、一酸素添加反応が連続して起こること、ホルミル基の酸素源が水分子であることが知られている。こうした生化学的研究の結果から、他の研究グループよりこれまでに2通りの反応機構が提案されてきた。そこで、こうした知見と今回の構造から新たに2通りのホルミル化反応機構を提案した。この4つの反応機構のうち、今回の構造から最も確からしいと思われるのは基質ヘムから電子受容体へ電子伝達が起こることで反応が開始する機構である。この機構ではヘムOのメチル基がGlu57とエステル架橋構造を形成し、引き続いて加水分解が起こることで一酸素添加反応が実現される。

HASのさらなる研究のためには活性を保った状態でのHASの単離と活性測定系の確立が必須であり、これは今後の大きな課題となる。一方で、今回得られた構造は、ヘムA生合成反応解明のための新たな実験の指針となることが期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文で、申請者は枯草菌由来ヘムA合成酵素の結晶構造解析をおこなった。ヘムA合成酵素は好気呼吸をおこなう生物にとって重要な酵素であるにもかかわらず、ヘムA合成酵素の担うホルミル化反応の反応機構は解明されていなかった。加えて、ヘムA合成酵素の立体構造、触媒残基も不明であった。今回の研究により、基質非結合型の立体構造に加え、基質結合型のモデル構造を構築することができた。得られた構造から、それまで不明であった触媒残基の推定をおこなうことができた。さらに、構造を用いて過去の実験結果を再解釈し、ホルミル化反応に必要な因子を考察した。最終的に、得られた構造と知見から基質結合機構、ホルミル化反応機構を提案した。本研究で得られた結果は、ヘムA生合成反応解明のための新たな実験の指針となることが期待される。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年1月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降