

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	大橋 一登
論文題目	Functions of human and budding yeast NAD kinases and their structural determinants for discrimination of substrates (ヒトおよび出芽酵母由来NADキナーゼの機能と基質識別の構造要因)		
(論文内容の要旨)			
NADキナーゼ (NADK) は、NAD⁺のリン酸化によるNADP⁺の合成反応を触媒する生体に必須の酵素である。出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のNADK (Pos5) や植物シロイヌナズナNADK (NADK3) は、NADK活性よりも強いNADHキナーゼ (NADHK: NADHのリン酸化反応によるNADPH合成反応を触媒する) 活性を有するため、NADHKと呼ばれることもある。出芽酵母では、ミトコンドリア局在性のPos5がミトコンドリアでのNADP⁺合成を担う。一方、ヒトでは、細胞質局在性のヒトNADKの遺伝子しかゲノム上に存在しないと考えられており、ミトコンドリアにおけるNADP⁺合成系は不明であった。本論文では、ヒトNADKの活性調節機構、ならびにPos5とヒトNADKの基質識別の構造要因を明らかにした。また、ヒトのミトコンドリアにおけるNADP⁺合成系の解明に資する重要な知見を得た。さらに、出芽酵母においては、NAD⁺合成中間体キノリン酸 (QA) の分泌と再利用が、細胞内NAD⁺濃度の維持に大きく寄与することを明らかにした。本論文の内容は以下のように要約される。 第一章では、ヒトNADKの大腸菌を宿主とした大量発現系を構築し、精製酵素を簡便かつ大量に調製する方法を確立した。本精製酵素を用いて、ヒトNADKのNADK活性はNADHおよびNADPHにより拮抗阻害されるが、NADP⁺によっては阻害されないことなどを明らかにした。ヒトNADKのNADK活性はNADP⁺ではなくNADPHにより阻害されるという本結果から、NADPHによるNADK活性阻害が、NADP⁺合成の抑制を介してNADPH濃度の制御に寄与するという、細胞内NADPH濃度の調節機構に関する新たな知見を得た。 第二章では、X線結晶構造解析により、Pos5とNADHの複合体の立体構造を分解能2.0 ÅでNADHKとしてはじめて決定した。また、本立体構造に基づき、Pos5のArg-293がPos5の基質 (NAD⁺とNADH) 識別ならびに高いNADHK活性の構造要因であることを明らかにした。また、ヒトNADKのHis-351 (Pos5のArg-293に相当) も基質識別の構造要因であることを明らかにした。 第三章では、一次構造上にNADKモチーフおよび推定ミトコンドリア輸送配列を有するヒトの機能未知タンパク質C5orf33をNADK3 (シロイヌナズナNADHK) ホモログとして見出した。C5orf33はミトコンドリアに局在することを、出芽酵母を用いた系で明らかにした。大腸菌で発現させ、精製したC5orf33は、ポリリン酸およびATPに依存したNADK活性を示した。また、精製C5orf33は、ヒト細胞の生理的NAD⁺濃度では精製ヒトNADKと同程度のNADK活性を示した。さらに、多くのヒトの臓器 (12種類の臓器中9種類) において、C5orf33遺伝子はヒトNADK遺伝子よりも多く転写されていることを、定量的PCRによる絶対定量法で確かめた。以上の結果より、C5orf33はヒトの新奇なNADKであることが明らかになった。また、C5orf33はヒトのミトコンドリアに局在し、不明であったヒトのミトコンドリアのNADP⁺合成を担う可能性を示した。 第四章では、出芽酵母がQAを分泌および再利用する現象を見出し、同現象に基づいた高感度なQAのバイオアッセイ法を確立した。また、細胞外QAは、高親和性ニコチン酸トランスポーター (Tna1) により細胞内に取り込まれることを示す結果を得た。さらに、トリ			

プトファンからQAを経由してNAD⁺を合成するキヌレニン経路のみならず、本経路で合成されるQAの分泌と再利用も、細胞内NAD⁺濃度の恒常性維持に機能していることを明らかにした。一方で、分裂酵母はキヌレニン経路を持たないにも拘らず、QAをNAD⁺前駆体として利用することを見出した。即ち、QAはTna1ホモログを有する真菌類において、普遍的なNAD⁺前駆体として利用される可能性を示した。

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)

NADキナーゼ (NADK) は、 NAD^+ のリン酸化による NADP^+ の合成反応を触媒する生体に必須の酵素である。なお、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のNADK (Pos5) は、NADK活性よりも強いNADHキナーゼ (NADHK: NADHのリン酸化反応によるNADPH合成反応を触媒する) 活性を有するため、NADHKと呼ばれることもある。

本論文は、ヒトおよび出芽酵母に由来するNADKの機能および基質識別の構造要因を明らかにしたものである。また、ヒトの機能未知タンパク質C5orf33が不明であったヒトのミトコンドリアにおける NADP^+ 合成を担う可能性も示した。さらに、出芽酵母が NAD^+ 合成中間体であるキノリン酸 (QA) を分泌し、再利用する現象の解析も行った。評価すべき点は、以下の通りである。

1. ヒトNADKの大量調製法を確立し、ヒトNADKのNADK活性は NADP^+ ではなくNADPHにより拮抗阻害されることを明らかにした。本結果から、NADPHによるNADKの活性 (NADP^+ の合成) 阻害によりNADPHの合成が制御されるという、細胞内NADPH濃度の調節機構に関する新たな知見を示した。
2. X線結晶構造解析により、出芽酵母由来NADHK (Pos5) とNADHの複合体の立体構造を分解能 $2.0 \text{ \AA}$ でNADHKとしてはじめて決定した。
3. 決定された立体構造に基づき、Pos5のArg-293およびヒトNADKのHis-351が基質 (NAD^+ とNADH) 識別の構造要因であることを明らかにした。
4. ヒトの機能未知タンパク質C5orf33は、ヒトの新奇なNADKであることを示した。さらに、C5orf33はヒトのミトコンドリアに局在し、不明であったヒトのミトコンドリアの NADP^+ 合成を担う可能性も示した。
5. 出芽酵母によるQAの分泌と再利用を見出し、本現象を応用した高感度なQAの検出法を確立した。一方で出芽酵母により分泌されたQAは、高親和性ニコチン酸トランスポーター (Tna1) により出芽酵母内に再度取り込まれ、細胞内 NAD^+ 濃度の恒常性維持に寄与することを明らかにした。
6. QAがTna1ホモログを有する真菌類において、普遍的な NAD^+ 前駆体として利用される可能性を示した。

以上のように、本論文は、NADKおよびNADHKの機能および基質識別の構造要因を明らかにするとともに、ヒトのミトコンドリアのNADKを発見し、不明であった NADP^+ 合成系の解明に資する重要な知見を示した。また、NADKの基質である NAD^+ の合成系および NAD^+ 合成中間体QAの代謝に関する新しい知見も示した。本研究で得られた結果は、生化学、酵素化学、生物機能変換学、分子生物学、構造生物学、および微生物学の発展に寄与するところが多い。

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24年1月16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) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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