

(論文内容の要旨)

本論文は、自然界に多く存在する五炭糖である L-アラビノースの微生物による代謝に関し、細菌由来の新規代謝経路に関わる 2 つの新規酵素 L-arabonate dehydratase および L-2-keto-3-deoxyarabonate (L-KDA) dehydratase について構造生物学的及び生化学的に機能及び構造を解析したものであり、以下の五章からなっている。

第一章は研究の背景のまとめである。特に、木質系バイオマスを原料として、エタノールなどのバイオ燃料の生産を工業的に実現可能にすることと、本研究の中心課題である L-アラビノースの微生物による代謝との関連について論述している。

第二章では、新規 L-アラビノース代謝経路に関与する 2 つの新規酵素である L-arabonate dehydratase 及び L-KDA dehydratase について、それらの酵素の精製と酵素遺伝子の単離を行っている。これまでに、窒素固定菌 *Azospilillum brasilense* 由来の新規 L-アラビノース代謝経路は、L-アラビノースを出発物質として、L-arabinose 1-dehydrogenase (L-アラビノース脱水素酵素; AraA)、L-arabinolactone (L-アラビノラクトナーゼ; AraB) と L-arabonate dehydratase (L-アラボネート脱水酵素; AraC) の連続した酵素反応によって、L-2-keto-3-deoxyarabonate (L-KDA) に変換され、さらに L-KDA は、L-KDA dehydratase (L-KDA 脱水酵素; AraD) によって α -ketoglutaric semialdehyde (α KGSA) に、 α KGSA dehydrogenase (α KGSA 脱水素酵素; AraE) によって α -ketoglutaric acid に変換されることが明らかにされていた。さらに、L-アラビノースを唯一の炭素源として培養した *A. brasilense* の無細胞抽出液から L-arabinose 1-dehydrogenase の精製を行い、L-arabinose 1-dehydrogenase をコードする遺伝子 (AraA) を単離した解析から、AraA が他の L-アラビノース代謝に関与する酵素と推測される遺伝子群 (AraB、AraC、AraD、AraE) とクラスターを形成していることが推測されていた。そこで、それらの知見に基づいて、L-arabonate dehydratase 及び L-KDA dehydratase を L-アラビノースを唯一の炭素源として培養した *A. brasilense* の無細胞抽出液を用いて各種クロマトグラフィーを用いて精製したのち部分アミノ酸配列を決定し、それらのアミノ酸配列を遺伝子配列より予想されるアミノ酸配列と比較することにより、AraC、AraD はそれぞれ、L-arabonate dehydratase 及び L-KDA dehydratase をコードするものである事を明らかにしている。

第三章では、L-arabonate dehydratase についての生化学的解析を行っている。L-arabonate dehydratase のアミノ酸配列分析の結果から、この酵素は ILVD/EDD (dihydroxyacid dehydratase / phosphogluconate dehydratase) プロテインファミリーに属する事を明らかにしている。このプロテインファミリーのタンパク質は酸素に対して不安定なために生化学的情報が非常に限られているが、どれも共通して鉄—硫黄クラスターを有し、茶褐色であることが知られていた。第二章で精製した L-arabonate dehydratase もまた茶褐色であったので、第二章で単離した L-arabonate dehydratase 遺伝子 (AraC) の大量発現系を、発現ベクターとして pQE-81L、発現用ホストとして大腸菌 DH5 α を用いて構築し、Ni-NTA カラムを用いて精製した L-arabonate dehydratase を使って、electron paramagnetic resonance (電子常磁性共鳴; EPR) 測定を行い、鉄—硫黄クラスターの有無を確認している。その結果、L-arabonate dehydratase は $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターを持つことを明らかにしている。 $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターは、3 つの鉄

原子がタンパク質中の3つのCys（システイン、C）と配位し、残りの1つの鉄原子は溶媒に向かっているとされている。そこで、L-arabonate dehydratase 中の機能的な Cys 残基を決定するために5つの L-arabonate dehydratase 変異体（C47A、C56A、C124A、C197A、C441A）を作製し、野生型 L-arabonate dehydratase と同様にして大量発現させ、精製している。それぞれの変異体について、L-arabonate dehydratase 活性測定及び EPR 測定を行い、それらの結果から、Cys⁵⁶、Cys¹²⁴、Cys¹⁹⁷ が鉄-硫黄クラスターの形成に必須であることを明らかにしている。

第四章では、L-KDA dehydrataseの生化学的及び構造生物学的解析を行っている。アミノ酸配列の相同性分析の結果から、L-KDA dehydrataseはdihydrodipicolinate synthase (DHDPS) / N-acetylneuraminatase lyase (NAL) プロテインファミリーに属する事をまず示している。さらに、分子系統樹を描くことにより、このプロテインファミリーの他の酵素は1つのクラスターを形成するが、L-KDA脱水酵素はどのサブクラスにも属さないことを明らかにしている。このファミリーに属する酵素はL-KDA dehydratase以外はLys残基と基質との間に“Schiff-base（シッフ塩基）”を中間体として形成し、基質のC-C結合やC=C結合の開裂に関与することが知られている。L-KDA dehydrataseはこのような結合の開裂は行わず、脱水反応を触媒する酵素である。このようにDHDPS/NALプロテインファミリーの中で特異的であるL-KDA dehydrataseの立体構造解析を行う事によって新たな知見を得られる事を期待し、X線結晶立体構造解析を行っている。L-arabonate dehydrataseと同様にL-KDA dehydratase遺伝子（AraD）発現ベクターとしてpQE-81L、発現用ホストとして大腸菌DH5 α を用いて大量発現系を構築している。Ni-NTAカラムとゲル濾過カラムを用いて精製した酵素を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行っている。結晶化条件を検討した結果、緩衝液；50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、添加剤；0.4M NH₄H₂PO₄、沈殿剤；5 % 2-プロパノール、温度18°C、L-KDA dehydratase濃度；4 – 10 mg/mlという条件下において、空間群P3₁21、格子定数はa=b=78.91、c=207.71 Åの結晶を得ている。大型放射光施設SPring-8において、100 Kで2.0 Å分解能までのX線回折強度データを収集したのち、さらに、0.5 Mのヨードカリウム溶液へのソーキング法により重原子誘導体を調製し、single-wavelength anomalous dispersion（単波長異常分散法；SAD）法を用いて位相を決定し、2.1 Å分解能において構造精密化を行っている（R=0.183、R_{free}=0.217）。その結果、DHDPS/NALプロテインファミリーに属する他の酵素と同様に、(β/α)₈ バレル構造も持つことを明らかにしている。さらに、ピルビン酸との複合体結晶をソーキング法により調整し、1.8 Å分解能での構造決定を行うことにより（R=0.197、R_{free}=0.238）、L-KDA dehydrataseのLys¹⁷¹残基は活性部位に存在し、ピルビン酸と“Schiff-base（シッフ塩基）”を形成している事を明らかにしている。

第五章は、本研究について総括している。以上、本論文では、長年假想経路であったバクテリア由来新規L-アラビノース代謝経路に関与するL-arabonate dehydrataseおよびL-KDA dehydrataseに関して分子生物学的方法でこれらの酵素遺伝子を単離し、さらに、それぞれの酵素について、生化学的解析及び構造生物学的解析を行うことにより、L-アラビノース代謝研究の進展に貢献する結果がまとめられている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は自然界に多く存在する五炭糖である L-アラビノースの微生物による代謝に関し、細菌由来の新規代謝経路に関わる 2 つの新規酵素に関して、構造生物学的および生化学的解析を行ったものである。本研究では、

1、新規 L-アラビノース代謝経路に関する仮説説明を行い、仮説に従って新規酵素を単離精製に成功した。既知 L-アラビノース代謝経路では途中の変換様式は異なるものの最終的に同じリン酸化化合物を生じるが、本論文で扱った新規代謝経路では合計 5 つの未知の酵素(遺伝子)により α ケトグルタル酸が生成することを明らかにした。

2、この経路の 3 番目に位置する L-アラボン酸脱水酵素 (AraC) に関して生化学的解析を行った。AraC は L-アラボン酸を L-2-ケト-3-デオキシアラボン酸に変換する脱水反応を触媒する酵素であるが、本経路を有する細菌から精製した AraC を基にそれをコードする遺伝子を単離、さらに大腸菌による組み換えタンパク質の発現系を構築し、電子常磁性共鳴解析によって AraC が活性中心に 4Fe-4S クラスターを有することを明らかにした。また、部位特異的変異法により本クラスターに配位する 3 つのシステイン残基の同定にも成功した。AraC の属するタンパク質ファミリーの立体構造、さらには活性部位を含む詳細な反応機構は全く未解明であったが、本結果により、はじめて、触媒部位のクラスターに関与するアミノ酸残基を明らかにした。

3、AraC の次の反応である L-2-ケト-3-デオキシアラボン酸から α -ケトグルタリクセミアルデヒドへの脱水反応を触媒する L-2-ケト-3-デオキシアラボン酸脱水酵素 (AraD) に関して、単離した遺伝子から推定されるアミノ酸配列解析の結果、AraD はピルビン酸とアルデヒドを生ずるアルドラーゼと進化的相関があることを明らかにした。さらに、本酵素の反応機構を目的に結晶化を行い、重原子同型置換法により放射光施設 SPring-8 を用いて酵素本体及びピルビン酸との複合体の構造を各々決定した。その結果、ピルビン酸と酵素のリシン残基との間にシッフ塩基を形成していることを明らかにした。同様の中間体はアルドラーゼでも見られることから、今後 AraD に特異的な活性残基を同定しそれを置換することでアルドラーゼに変換できる可能性が示唆された。

以上、本研究は、L-アラビノース経路の代謝酵素の単離に成功したのみならず、生化学・分子生物学・生物物理学・構造生物学など幅広い手法を駆使し、未知の反応機構解明にも取り組んだものである。また、L-アラビノースはバイオエタノールの次世代原料である木質系バイオマスにも含まれる主要五炭糖でもあり、本代謝経路を用いた将来的な微生物によるエタノール変換への応用も期待できる。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 2 月 25 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。