

氏 名 赤井 翔太

学 位 の 種 類 博士 (理学)

学 位 授 与 年 月 日 平成31年3月25日

学 位 論 文 名 ホモセリン脱水素酵素の触媒反応機構及びセリンヒドロキシメチル基転移酵素の  
基質認識機構  
(Catalytic Mechanism of Homoserine Dehydrogenase and Substrate Recognition  
Mechanism of Serine Hydroxymethyltransferase)

論文審査委員 主査 教授 神谷 信夫

副査 教授 佐藤 和信

副査 教授 宮原 郁子

副査 講 師 生城 浩子 (大阪医科大学)

### 論文内容の要旨

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来ホモセリン脱水素酵素 (*T*HSD) は、アスパラギン酸経路の分岐点に存在し、L-ホモセリン (L-Hse) と NAD(P)<sup>+</sup>を基質として、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド (L-Asa) と NAD(P)H を生じる反応を可逆的に触媒する。筆者はこの酵素の触媒反応機構を解明することを目的として、*T*HSD の結晶構造解析に取り組んできた。そして、Wild-type 及び Lys99Ala(K99A)、Lys195A(K195A)変異体の計 3 種類において、L-Hse と NAD(P)H が結合した三元複合体の結晶構造、また、Wild-type については L-Asa\_NAD(P)<sup>+</sup>複合体の結晶構造を、それぞれ 2.00 Å、1.87 Å、1.93 Å、2.00 Å の分解能で決定した。L-Hse(L-Asa)\_NAD(P)H 複合体は、基質非結合型の構造と比べ、活性部位を閉じるように変化していた。他の種由来の HSD では、基質の結合による構造変化は報告されておらず、本研究によって初めて明らかとなったものであり、既報の構造と比べ酵素基質複合体をよりよく模倣した構造であると考えられる。また、2 種類の変異体の三元複合体の結果から、Lys195 は L-Hse を活性発現可能な位置に固定する役割があることや、Lys99 がこれまで報告されていない新しい酸塩基触媒残基である可能性が示唆された。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (*T*SHMT) は、ピリドキサーール 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として、L-セリン (L-Ser) をグリシン (Gly) に変換すると同時にテトラヒドロ葉酸 (THF) を 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-CH<sub>2</sub>-THF) に変換する反応を可逆的に触媒する。筆者は SHMT の触媒反応機構を解明することを目的として、時分割 X 線結晶構造解析を行い、反応中間体の獲得を目指した。その結果、L-Ser や THF、もしくは Gly や 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸が結合した結晶を 1.02-1.45 Å の分解能で決定した。THF や 5,10-CH<sub>2</sub>-THF が結合した *T*SHMT の結晶構造の獲得に初めて成功し、これらの構造は、立体構造に立脚した薬剤開発の助けとなる。また、ホルムアルデヒドが結合した *T*SHMT の結晶

構造の獲得にも成功した。このことにより、ホルムアルデヒドを反応中間体とするレトロアルドール反応を経由して SHMT の反応機構が進行することが示唆された。これらの結晶構造から、酸塩基触媒残基が推定され、特に、Glu53 と His122 は必須の残基であることが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

酵素が機能する際、反応中心をとりまくアミノ酸残基は反応の遷移状態のエネルギーを下げるように働く。この遷移状態そのものをX線結晶構造解析で捉えることは困難であるが、反応経路内の中間状態にある酵素の三次元立体構造を明らかにすることが出来る。本論文では創薬研究ターゲットとなっている2種類の酵素を用い、酵素-基質複合体のモデル構造、あるいは反応中間体の結晶構造解析に成功し、それぞれの酵素の触媒反応機構を提案している。本論文の前半では、ホモセリン脱水素酵素をターゲットとした結果について述べており、2種類ある基質のうち、1つは基質そのもの、1つは生成物を基質アナログとして使い、X線結晶構造解析により酵素-基質-生成物の三元複合体モデルを得ることに成功している。これにより、酵素が基質を結合すると活性部位を閉じるように構造変化することが明らかにされた。さらに Lys99 がこれまで報告されていない新しい酸塩基触媒残基である可能性が示唆された。本論文の後半では、セリンヒドロキシメチル基転移酵素の結晶に基質をソーキングした後に、pH をジャンプさせて反応を開始させる時分割実験を試みている。その過程において、多くの中間体もしくは基質と生成物の混合状態に関する高分解能の構造情報が得られ、酸触媒残基としては Glu53 と His122 が必須であることなど、反応機構の解明に向けて有用な知見を与えた。本論文は酵素の触媒反応機構を解明するだけでなく、構造に立脚した阻害剤開発にも貢献するものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位を授与するに値するものと審査した。