

Title	D-エリスルロース還元酵素の構造と機能に関する研究
Author(s)	前田, 美紀
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46073
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	まえだ みき 前 田 美 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 19640 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	D-エリスルロース還元酵素の構造と機能に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力
	(副査) 教授 小林 祐次 教授 前田 正知 教授 高木 達也

論 文 内 容 の 要 旨

エリスリトールやスレイトールのようなテトリオールはヒトの尿およびウシの胎児組織に観察されることがかねてより報告されていた。代謝系において知られている四炭糖のメンバーは D-エリスロース-4-リン酸のみであり、これだけではエリスリトールやスレイトールの生合成経路が明らかではなかったため、上原らは四炭糖の代謝系を明らかにする研究を始めた。その研究の過程で、D-エリスルロース還元酵素 (EC 1. 1. 1. 162) がウシおよびニワトリ肝臓より単離された。精製された D-エリスルロース還元酵素 (ER) は、D-エリスルロースから D-スレイトールの還元反応を触媒する金属を持たない四量体タンパク質であり、補酵素としては NADH と NADPH の両方を利用できるが、NADPH がはるかに低い Km 値で作用すること、また、糖類の中で D-エリスルロースが唯一の基質であることが報告されていた。

このように生化学的な知見は蓄積されていたものの、酵素が肝臓中に比較的多量に存在するにも関わらず、本酵素の存在意義はよくわかっていなかった。そこで申請者は、これまで未知であった ER の構造と機能を明らかにするために、下記の研究を展開した。

まず、酵素の精製法を改良し、安定量の酵素を常時精製できる状態にした後、多量の合成カルボニル化合物をスクリーニングした。その結果、本酵素がジアセチルをはじめとする α -ジケトンも還元することを発見した。ジアセチルを還元する酵素としては、ジアセチル還元酵素 (EC 1. 1. 1. 5) が知られていたが、ER は動物のジアセチル還元酵素と酵素学的に非常に類似しているもののバクテリアのジアセチル還元酵素とは非常に異なっていた。また、スクリーニングで活性を示すことが確認された α -ジケトンのうち、生体内に存在することが知られているものはイサチンのみであった。この物質は内因性モノアミンオキシダーゼ活性阻害物質として知られている。さらにジアセチルは動物体内では合成されないものの、チーズ、バターなどの食品中に含まれており、食物として摂取する可能性が高い。したがって、ER はこれらの内因性あるいは外因性の α -ジケトンの代謝に関わっていると考えられる。

次に、ニワトリ肝臓 cDNA ライブラリからニワトリ D-エリスルロース還元酵素 (cER) の cDNA をクローニングし、アミノ酸配列を決定した。その結果、cER は 246 アミノ酸からなるタンパク質であり、配列中に Short chain dehydrogenase/reductase (SDR) モチーフを持つことが明らかになった。また、ニワトリ各臓器中の酵素活性、mRNA の発現量を検出したところ、ER は酵素活性、発現量ともに、腎臓、肝臓に多く分布し、他の臓器においてもわずかながら一定量が存在することがわかった。

決定されたアミノ酸配列をクエリーにした相同性検索の結果、ER は四量体カルボニル還元酵素 (TCR) および L-

キシロース還元酵素 (XR) とともに一次構造上非常に類似していることが判明した。これらの酵素は配列全体では類似していたが、活性部位近辺のみに着目すると TCR と ER/XR の間で基質周辺残基に特徴的な違いが見られた。これら基質周辺残基に関する情報をもとにして、ER に類似した酵素活性未知であるタンパク質の構造を検討したところ、それらのタンパク質は ER/XR と TCR の2つのグループに分類されることが明らかとなった。

マウス四量体カルボニル還元酵素 (mTCR) の立体構造をもとに、cER の立体構造をホモロジーモデリングにより推定し、2つの酵素の酵素-基質複合体の構造をモデリングした。その結果、ER/XR と TCR は活性中心を除く活性部位の環境が非常に異なっており (ER/XR では親水性、TCR では疎水性)、この違いが2種類の酵素の基質選択性をもたらしていることがわかった。

ER/XR と TCR は、マウスでは類似性 72% (うち 65% のアミノ酸が一致) と高い相同性を示したが、酵素活性および存在する臓器、細胞内分布箇所が完全に異なっている。この理由を推定するため、立体構造の明らかになっている mTCR とヒト L-キシロース還元酵素 (hXR) (2つの酵素の相同性は 74%) の立体構造を用いて、キメラ酵素をモデリングにより作成し、その安定性を検討した。

まず、最初に2種類のタンパク質が同様の会合面で会合していることを確認するために、ASA (溶媒接触表面積) を利用してアミノ酸残基ごとの会合に関与する程度を検討した。ステロイド受容体リガンド結合ドメインを用いた解析の結果、この方法により、微妙なパッキングの違いによる会合面の相違を検出できることを確認した。

この結果に基づき、会合により ASA が 0.10 \AA^2 以上変化するアミノ酸残基を抽出したところ、mTCR および hXR はいずれも多数 (~8 個) のフェニルアラニンを中心とする疎水性相互作用を中心とする会合面 (AB 面) と1対のフェニルアラニンの π/π スタッキングと2対の塩橋を中心とする会合面 (AD 面) を使用していることがわかった。SDR モチーフを持つタンパク質の既知の立体構造について同様に解析したところ、これら2種類の会合面の相互作用の特徴は SDR ファミリー全体で保存されていることが判明した。

この2種類の相互作用面を各々使用した2種類のキメラ酵素 AB-CD キメラ、AD-BC キメラ (前2つが mTCR、後2つが hXR のサブユニットに由来する) を作成し、構造最適化した。得られた立体構造について会合面の ASA の差、ならびに水素結合の数を比較したところ、2つのキメラ酵素は天然型 mTCR および hXR とほとんど変わらないことがわかった。このことから、天然においても TCR と XR は各サブユニットが混合して存在する場合は、キメラとなって会合する可能性が高い。2つの酵素は完全に基質を区別しているため、生体内において活性を正確に調節するために、2つの酵素は細胞内、あるいは臓器ごとに区別されて存在していると推定された。

論文審査の結果の要旨

前田君は、四炭糖の代謝研究において見出された D-エリスルロース還元酵素 (ETR) の精製法の改良を行い、精製酵素が α -ジアセトンも還元することができることを示すとともに、ETR のクローニングに成功し、その構造を解析して構造上も酵素学的にも四量体カルボニル還元酵素 (TCR) およびジアセチル/L-キシロース還元酵素 (DAXR) と類似すること、ETR は肝臓、腎臓および精巣中で多く発現し、肝臓中では対応する遺伝子は1コピーであること、ETR の基質認識部位周辺の構造は TCR とは異なるが、DAXR とは同一であり、活性部位周辺の構造はこれらすべてと類似し、生体内では四量体を形成していることなどを明らかにした。そして、ETR と DAXA が同一酵素であることを推定し、ETR と TRC のサブユニットの多量体化表面について解析することにより、キメラ酵素形成の可能性を示した。

以上の成果は、単に糖代謝に重要な一つの酵素の生理学的意義や進化について有益な知見を与えただけでなく、酵素タンパク質の構造と機能に関する新しい解析手法を例示したものであり、学術的に高く評価され、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。