

Title	Structure-function studies on enzymes of the methionine salvage pathway in <i>Bacillus subtilis</i>
Author(s)	田村, はるか
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/49498
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	たむら はるか
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 22914 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用化学専攻
学位論文名	Structure-function studies on enzymes of the methionine salvage pathway in <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌のメチオニン回収経路で機能する酵素群の構造と機能に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 井上 豪 (副査) 教授 宇山 浩 教授 林 高史 教授 桑畑 進 教授 平尾 俊一 教授 今中 信人 教授 大島 巧 教授 安藤 陽一 教授 田川 精一 教授 町田 憲一

論文内容の要旨

本論文は、ほぼすべての生物に備わっている代謝経路のひとつであるメチオニン回収経路において機能する 2 種類の *Bacillus subtilis* 由来酵素についての X 線結晶構造解析、および種々のホモログタンパク質との構造比較に基づく、これらの詳細な構造-機能相関関係について述べられており、緒言、本論 2 章、および総括から構成されている。

緒言では、生体内において様々な細胞機能にかかわるメチオニンの重要性について、また代謝物からイオウ原子を回収してメチオニンを再生するメチオニン回収経路について説明している。そして、この経路中で 5-methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi)、および 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase (DK-MTP-1P enolase) として機能する 2 つの酵素について構造化学的な研究に取り組む意義について示した。特に後者は、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の祖先タンパク質であることが知られており、その分子進化的な知見を得ることによってより高い CO₂ 固定能を持つスーパー-RuBisCO を創出できる可能性についても言及している。

第一章では、*B. subtilis* 由来 M1Pi の精製、結晶化、X 線回折データ収集、およびその構造解析について述べた。本酵素については、硫酸イオン複合体、および生成物 5-methylthioribulose-1-phosphate 複合体の構造解析に成功し、M1Pi の活性部位の構造を初めて明らかにした。また、種々のホモログタンパク質との構造比較によって、M1Pi の基質認識に伴う N 末端、および C 末端ドメインのダイナミックなコンホメーション変化、および活性残基の pK_a 変化を予想し、M1Pi の触媒反応機構の詳細を明らかにした。

第二章では、*B. subtilis* 由来 DK-MTP-1P enolase (Bs-DK-MTP-1P enolase) の精製、結晶化、X 線回折データ収集、およびその構造解析について述べた。本酵素については、リガンドを含まないアポ型 (非活性化状態) での構造解析に成功した。これまでに *Geobacillus kaustophilus* 由来の同酵素 (アミノ酸相同性 60%) において種々のリガンドとの複合体構造が報告されていたため、活性化状態の異なる DK-MTP-1P enolase との構造の違いや、CO₂ 固定酵素 RuBisCO との構造類似性について比較を行った。その結果、DK-MTP-1P enolase の活性部位に位置する Lys150 が基質認識に伴って活性部位へ induced fit するメカニズムを明らかにした。この Lys150 の動きは RuBisCO では起こらず、また、活性に必須のフレキシブルなループ (loop-6) の open/closed コンホメーション変化とアミノ酸一次配列との相関関係についても言及することができた。これにより、CO₂ 固定効率の高い RuBisCO 創出への可能性を見出した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ほぼすべての生物に備わっている代謝経路のひとつである、メチオニン回収経路において機能する 2 種類の *Bacillus subtilis* 由来酵素についての X 線結晶構造解析、および種々のホモログタンパク質との構造比較に基づく、これらの詳細な構造-機能相関関係についての研究結果をまとめたものである。おもな結果を要約すると以下の通りである。

第一章では、*B. subtilis* 由来 5-methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi) の精製、結晶化、X 線回折データ収集、およびその構造解析について述べている。本酵素については、硫酸イオン複合体、および生成物 5-methylthioribulose-1-phosphate 複合体の構造解析に成功し、M1Pi の活性部位の構造を初めて明らかにしている。また、種々のホモログタンパク質との構造比較によって、M1Pi の基質認識に伴う N 末端、および C 末端ドメインのダイナミックなコンホメーション変化、および活性残基の pK_a 変化を予想し、M1Pi の詳細な触媒反応機構を解明している。

第二章では、*B. subtilis* 由来 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase (Bs-DK-MTP-1P enolase) の精製、結晶化、X 線回折データ収集について述べており、リガンドを含まないアポ型 (非活性化状態) での構造解析に成功している。本酵素は、光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の祖先タンパク質であることが知られており、その分子進化的な知見を得ることによってより高い CO₂ 固定能を持つスーパー-RuBisCO を創出できる可能性についても言及している。本酵素については、これまでに *Geobacillus kaustophilus* 由来の同酵素 (アミノ酸相同性 60%) において種々のリガンドとの複合体構造が報告されていたため、活性化状態の異なる DK-MTP-1P enolase との構造の違いや、RuBisCO との構造類似性についても比較を行っており、その結果、DK-MTP-1P enolase の活性部位に位置する Lys150 が基質認識に伴って活性部位へ induced fit するメカニズムを明らかにしている。この Lys150 の動きは RuBisCO では起こらず、また、活性に必須のフレキシブルなループ (loop-6) の open/closed コンホメーション変化とアミノ酸一次配列との相関関係についても言及している。これにより、CO₂ 固定効率の高い RuBisCO 創出への可能性を見出している。

以上のように、本論文は枯草菌のメチオニン回収経路で機能する 2 種類の酵素についてその立体構造および反応機構などを明らかにすると共に、種々のホモログタンパク質との構造比較を詳細に行うことで、それらの構造と機能に関する重要な知見を与えている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。