



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49498">https://hdl.handle.net/11094/49498</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	田村はるか
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CO<sub>2</sub>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CO<sub>2</sub>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-methylthiopentyl-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ーメーション変化、および活性残基のpK<sub>a</sub>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、CO<sub>2</sub>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コンホー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、CO<sub>2</sub>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-methylthiopentyl-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-methylthiopentyl-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ーメーション変化、および活性残基のpK<sub>a</sub>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CO<sub>2</sub>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CO<sub>2</sub>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コンホー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、CO<sub>2</sub>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おり、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。