

氏 名	町田 康博
(ふりがな)	(まちだ やすひろ)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番	乙 第 1198 号
学位審査年月日	令和2年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当
学位論文題名	Reaction of threonine synthase with the substrate analogue 2-amino-5-phosphonopentanoate: Implications into the proton transfer at the active site (トレオニン合成酵素と基質類似物質 2-アミノ-5-ホスホノペンタン酸の反応：活性部位におけるプロトン移動に対する意味合い)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 高井 真司 教授 朝日 通雄

学位論文内容の要旨

《背景》

トレオニン合成酵素 (ThrS) は、補酵素としてピリドキサーリン酸 (PLP) を持ち、ホスホホモセリン (OPHS) と水を L-トレオニンとリン酸へ変換する反応を触媒する。細菌や植物では、この反応はアスパラギン酸からトレオニンを生合成する最終段階であるが、動物には ThrS がなく L-トレオニンを不可欠アミノ酸として摂取するため、ThrS の阻害剤は抗菌薬開発の新たなターゲットとなりうる。そのためにはトレオニン合成酵素の反応機構を解明する必要があるが、ThrS は一般に PLP 酵素で生じる可能性のある 7 つの中間体の全てを経由することが予想されるため、PLP 酵素の中では最も複雑な反応機構を有す

ると考えられる。

トレオニン合成酵素の触媒反応過程は OPHS からのリン酸イオンの γ 脱離まで（前半部分）と、それ以降（後半部分）の 2 段階に分けられる。後半部分については、OPHS から脱離したリン酸イオンが活性部位に留まり、 β 位における水の付加反応を特異的に進行させる触媒として働く「生成物支援触媒」の機構が明らかになっている。これは前半から後半への移行部が不可逆的な過程であることを利用して、後半部分を前半部分から切り離して解析することが出来たためである。それに対して、本来の基質である OPHS を ThrS と反応させると後半まで反応が進んでしまうため、前半部分だけを解析することが難しく、前半部分の解析は進んでいない。そこで、本研究では前半部分の終了点近くで反応が停止する基質類似物質と ThrS の反応を詳細に解析することにより、前半部分の反応機構の解明を目指した。

《方 法》

Thermus thermophilus HB8 の ThrS を *Escherlichia coli* にて発現し、精製したものを酵素標品とした。2-アミノ-5-ホスホノペンタン酸 (AP5) は OPHS の δ 位の O が C に置換された類似物質であり、アセトアミドマロン酸ジエチルと (3-ブロモプロピル) ホスホン酸ジエチルをナトリウムエタノラート下で反応させ、脱保護することにより得られた。ThrS と AP5 の反応によるスペクトル変化は、Applied Photophysics SX20 ストップフロー分光分析器を用いて観察し、得られた 1 ms ごとの時分割スペクトルを pro-K II による全体的解析に供した。

《結 果》

ThrS と AP5 の反応によって、まず急速に外アルジミン中間体に由来する 412 nm の吸光度が減少し、それと同期してカルボアニオン中間体に特徴的な 482 nm の吸光度が顕著に増加した（第 1 相）。次いで、482 nm の吸光度の比較的早い減少（第 2 相）とそれに続くゆっくりとした減少（第 3 相）を認め、第 3 相においてケチミン中間体あるいはエナミ

ン中間体に由来する 320 nm の吸光度が増加した。一旦はほとんどがカルボアニオン中間体となっており、他の PLP 酵素に類を見ないカルボアニオン中間体の安定性を認めた。

PLP 酵素の伝統的な反応機構であれば、外アルジミン中間体→カルボアニオン中間体→ケチミン中間体→エナミン中間体と順次生成するため、第 2 相において 320 nm の吸光度の増加が観測されなければならないが、実際は第 2 相において 410 nm 周辺の吸光度が増加していた。この結果を説明するためには、カルボアニオン中間体から、ケチミン中間体に変化する経路の他に、第 2 の外アルジミン中間体に枝分かれする経路があると考えざるを得ず、そのモデルを構築して時分割スペクトルの全体的解析を行うと、モデルに合致した各中間体の吸収スペクトルとそれらを結ぶ速度定数を矛盾なく得ることが出来た。

さらに、ThrS と AP5 の複合体の解離定数 K_d は pH が 1 上昇するにつれて 1 桁低下し、アミノ基が非プロトン化状態にある AP5 が ThrS に結合することが示された。一方、ThrS と AP5 の結合後の反応中間体間の速度定数には変化がなく、酵素-基質複合体形成後の活性部位におけるプロトン移動は溶液の pH に無関係であることが判明した。

《考 察》

ThrS と AP5 の反応では、反応初期に形成される外アルジミン中間体 (A2) とは異なる第 2 の外アルジミン中間体 (A2') が発見された。A2 と A2' がともに一般的な PLP アルジミンであれば、構造の差異は PLP アルジミン以外の部分になければならない。カルボアニオン中間体から A2' が形成されるには、AP5 の C α が再プロトン化されることが必要だが、上記の通り溶媒とのプロトンのやり取りがないため、この再プロトン化に関わるものとして、活性部位で C α と近距離にある残基である Lys61 の ϵ -アミノ基と AP5 のホスホノ基が候補として考えられた。しかし、AP5 のホスホノ基は Arg160 のグアニジウム基と水素結合を形成しているため、C α に渡すべきプロトンを有しているとは考えにくい。そこで、Lys61 の ϵ -アミノ基がプロトンの受け渡しを行っていると考えた。構造の差異は Lys61 の構造に由来するものとなり、そのような条件を満たす A2'の構造を分子動力学計算の結果から検索すると、Lys61 と Thr88 あるいは PLP と水素結合を形成したものが該当した。

この構造と A2 を比較すると、A2 では非プロトン化状態の ϵ -アミノ基と AP5 のホスホノ基が近接しており電氣的に反発し、エネルギー的に不利であることが考えられる。A2 の C α からプロトンが引き抜かれカルボアニオン中間体が生成されると、この電氣的な反発が解消されエネルギー的な安定化が起こる。

以上の機構が本来の基質である OPHS と ThsS の反応でも働いていると考え、OPHS のリン酸基により Lys61 の塩基性が高められ、カルボアニオン中間体の安定化が起こり、触媒効率を上げている可能性が考えられる。このことは、OPHS のリン酸基が生成物支援触媒として作用するというに加えて、基質支援触媒としても働く、という多彩な機能を有している可能性を示唆している。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

トレオニン合成酵素 (ThrS) は、細菌や植物でトレオニン合成の最終段階の反応を触媒する酵素である。動物には ThrS がなくトレオニンを不可欠アミノ酸として摂取するため、ThrS の阻害剤は抗菌薬開発の新たなターゲットとなりうる。そのため、反応機構を解明する必要があるが、その複雑な反応過程は後半部分の解析にとどまっている。そのため、申請者は、反応過程の前半部分の解明を目指して研究を行った。

これまで前半部分の解析が進まなかったのは、本来の基質であるホスホホモセリン (OPHS) と ThrS を反応させると最後まで反応が進んでしまうためであり、基質類似物質である 2-アミノ-ホスホノペンタン酸 (AP5) を用いて、反応が前半部分の最終点近くで止まることを利用した。ThrS と AP5 の反応によるスペクトル変化をストップフロー分光分析器を用いて観察し、得られた時分割スペクトルに対して pro-K II で全体的解析を行った。この結果から、ThrS と AP5 の反応過程において既存の外アルジミン中間体 (A2) と異なる外アルジミン (A2') がみられること、また、酵素-基質複合体形成後の活性部位におけるプロトン移動は溶液の pH に依存しないことが分かった。

A2' の存在は本来の反応過程を阻害するものであるが、その形成過程について考察すると、本来の基質である OPHS と ThrS の反応において、OPHS のリン酸基が Lys61 の塩基性を高め、カルボアニオン中間体の安定化が起こり、触媒効率を上げていることが考えられる。このことは、これまでに知られていた OPHS のリン酸基が γ 脱離後もその場に留まり生成物支援触媒として働くことに加え、 γ 脱離前にも基質支援触媒として働くという多彩な機能を有している可能性を示唆している。以上の内容は、目的とされた ThrS の反応過程の前半部の解析として十分なものであり、また、理論計算によるさらなる裏付けなど今後の発展も期待でき、有意義なものである。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

The Journal of Biochemistry 2020; 167: in press

DOI: 10.1093/jb/mvz100<オンライン掲載>