

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
白岩有桂	主査 教授 朝 日 通 雄 副査 教授 古 谷 榮 助 副査 教授 吉 田 龍 太 郎 副査 教授 佐 野 浩 一
主論文題名 <p style="text-align: center;">Multifunctional Role of His¹⁵⁹ in the Catalytic Reaction of Serine Palmitoyltransferase</p> <p style="text-align: center;">(セリンパルミトイル転移酵素の触媒反応における His¹⁵⁹ の多機能的役割)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の背景と目的》</p> <p>セラミドに代表されるスフィンゴ脂質は情報伝達物質として、また、形質膜における脂質ラフトの構成成分として、多様な生理機能を有する重要な脂質である。セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) はスフィンゴ脂質生合成の律速段階である L-セリンとパルミトイル CoA (PalCoA) からの 3-ケトジヒドロスフィンゴシン (KDS) 合成反応を触媒する。従って、SPT の反応制御機構を解明することはスフィンゴ脂質ホメオスタシスを理解する上で必須であるが、真核生物の SPT は不安定な膜結合性酵素であるために、その解析は分子生物学的なレベルにとどまっていた。しかし、真核生物の SPT の原型にあたる細菌の水溶性 SPT が発見され、それを用いた実験系の構築に成功したことから、スフィンゴ脂質合成反応を酵素タンパク質レベルで研究することが可能となった。</p> <p>SPT はピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とする。SPT の属する I 型 PLP 酵素は全体的な形は互いに類似しているが、活性部位においては、多くの I 型 PLP 酵素で芳香族アミノ酸残基が占める PLP 近傍の位置を SPT ではヒスチジン残基 (His¹⁵⁹) が占め</p>	

ている。従って、このヒスチジン残基が SPT において特異的かつ重要な機能を果たしていることが予想される。そこで、His¹⁵⁹を芳香族アミノ酸や Ala に置換し、SPT の触媒機能に対する影響を解析することで、この残基の役割を明らかにすることを旨とした。

《方 法》

Sphingomonas paucimobilis 由来 SPT の His¹⁵⁹を Phe、Trp、Tyr 及び Ala に置換した 4 種類の変異酵素をそれぞれ大腸菌内で発現し、精製酵素を得た。酵素活性は [¹⁴C]-L-セリンを基質として生成する KDS の放射能を測定することにより定量した。高速反応の追跡はストップフロー分光分析器を用い、得られた時分割スペクトルからグローバル解析によって中間体のスペクトルと反応素過程の速度定数を求めた。

《結果と考察》

4 種類の変異酵素のうち Ala 変異酵素 (H159A) のみが活性を有した。WT と比較して H159A は V_{\max} が 16% に低下し、L-セリンに対する K_m は約 10 倍上昇していたが、PalCoA に対する K_m はほとんど変化がなかった。

全ての変異酵素において、L-セリンに対する解離定数 (K_d) は WT の数十倍であり、L-セリンの結合能が著しく低下していることが示された。また、L-セリンの添加により一旦生じた PLP-L-セリンアルジミン中間体から本来起こるはずのない abortive transamination の進行が観測された。以上の結果より、His¹⁵⁹が L-セリンの α -カルボキシル基と水素結合することによって SPT への L-セリンの結合を担い、また、第二の基質 PalCoA が入るまでに L-セリンの脱プロトン化が起こると abortive transamination が進行するので、それを防ぐために脱プロトン化が起こりにくいような配向に L-セリンを固定していることが示された。

次に H159A と L-セリン・PalCoA の反応の遷移相速度論的解析を行った。時分割スペクトルでは WT において認められなかったキノイド中間体の顕著な蓄積が観測され、

グローバル解析の結果、2種類のキノイド中間体の存在 (Q_1 、 Q_2) が明らかとなった。また、 Q_1 から縮合生成物への変換過程 (Claisen 型縮合) の速度定数が著しく低下していたことから、この過程において His¹⁵⁹ が一般酸触媒として機能することが示された。

最後に生成物 KDS との逆反応を調べた。WT では PLP-KDS アルジミン中間体が生じたが、H159A においては PLP-KDS アルジミン中間体から派生する Q_2 が一過性に蓄積し、時間経過に伴い abortive transamination が進行した。H159A では KDS のカルボニル酸素が His¹⁵⁹ によって固定されないためにアルジミン中間体が不安定となり、 Q_2 の蓄積につながったと考えられた。すなわち、His¹⁵⁹ は PLP-KDS アルジミン中間体からのキノイド中間体の生成を抑制することでこの段階での副反応の進行を抑え、生成物の酵素からの遊離を促進していることが示唆された。

《結 語》

SPT の特徴的な残基 His¹⁵⁹ は SPT の活性には必須ではなく、Ala 残基によって代替が可能である。ところが、副反応が起こらないように触媒反応を厳密に制御するためには His 残基でなければならないことが判明した。本研究の結果は、触媒性残基のみならず反応特異性を司る残基を見出し解析することも酵素の活性制御機構の解明に重要であることを示している。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	白 岩 有 桂
論文審査担当者		主 査 教 授 朝 日 通 雄	
		副 査 教 授 古 谷 榮 助	
		副 査 教 授 吉 田 龍 太 郎	
		副 査 教 授 佐 野 浩 一	
主論文題名			
Multifunctional Role of His ¹⁵⁹ in the Catalytic Reaction of Serine Palmitoyltransferase			
(セリンパルミトイル転移酵素の触媒反応における His ¹⁵⁹ の多機能的役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>スフィンゴ脂質は細胞膜の構成要素であるのみならず多様な生理機能を有する脂質である。セリンパルミトイル転移酵素 (SPT) はスフィンゴ脂質生合成の初発反応であり律速過程である L-セリンとパルミトイル CoA (PalCoA) の縮合反応を触媒するため、その活性発現・制御機構の解明はスフィンゴ脂質のホメオスタシスを理解する上で重要である。従来本酵素の解析は分子生物学的レベルのものが中心であったが、ようやく最近になって酵素タンパク質レベルでの解析が可能になった。</p> <p>SPTをタンパク質分子として見たときにまず注目されるのは、同様の構造を持つI型ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存性酵素のほとんどにおいて PLP のピリジン環に芳香族アミノ酸残基の側鎖が接しているのに対し、SPT ではこれがヒスチジン残基に置き換わっていることである。申請者はこのヒスチジン残基 (His¹⁵⁹) が SPT において特異的かつ重要な役割を果たしているのではないかと考え、His¹⁵⁹を他のアミノ酸残基に置換した酵素を解析することによってこの残基の機能を明らかにしようとした。</p> <p>その結果、申請者は His¹⁵⁹ が①第二の基質パルミトイル CoA の有無に応じて基質の</p>			

配向を変化させることによって副反応の進行を抑えていること、②一般酸触媒として Claisen 型縮合反応及び脱炭酸反応を促進していること、さらに③生成物からの副反応の進行を抑え、生成物の遊離を促進していることを明らかにした。特に①の機能は、副反応が起こらないように触媒反応の進行に合わせてL-セリンの脱プロトン化を制御するということを意味しており、他のI型PLP酵素では見られないような二基質の縮合反応を特異的に進行させるためにSPTはこの場所にヒスチジン残基を有していることを申請者は明らかにした。

SPT においては His¹⁵⁹ が存在しなくとも目的の生成物は作られるが、abortive transamination のために多量の PLP を要求する。従来、触媒性残基の変異は酵素活性を消失させるということで酵素反応機構や病態の解明において重要視されてきたが、申請者の研究は触媒性残基のみならず反応特異性を司る残基を見出し解析することも酵素の活性発現・制御機構の解明に重要であることを示しており、その意義は大きい。

以上により、本論文は本学大学院学則第11条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 Biological Chemistry 284(23): 15487–15495, 2009