

## 新規酸化還元酵素の酸化ストレスによる活性制御機構の解明

辻, 幸盛

<https://hdl.handle.net/2324/2236191>

---

出版情報：九州大学, 2018, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名 : 辻 幸盛

論 文 名 : 新規酸化還元酵素の酸化ストレスによる活性制御機構の解明

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

地球上の生命活動は、酸化還元反応を基礎に成り立っている。特に、炭素及び窒素代謝は生命活動の根幹を担うため極めて重要であり、その酵素反応は生体内の環境に応じて適切に制御されることで生命活動が維持されている。しかし、これらの代謝に関わる酵素の活性制御機構やその役割の全貌は未だに明らかではない。本論文では糖代謝および窒素代謝に関わる3種の酸化還元酵素に焦点を当て、酸化ストレスによる酵素の活性制御機構の解明を趣旨とした。即ち、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH) (第2章)、アルデヒド-アルコール脱水素酵素(ADHE) (第3, 4章)、好熱性非ヘテロシスト型シアノバクテリアの窒素固定(第5章)をテーマに、酸化ストレスによる活性酸素や補酵素 A(CoA)のレドックスによる酵素活性の制御機構を検証した(図1)。以下に各章の概略を示す。

第2章では、グラム陰性菌 *Citrobacter* sp. S-77 由来 GAPDH(*Cb*GAPDH)の CoA による活性制御機構について検証した。これまでに、脂質やアミノ酸の生合成及び遺伝子発現制御を担う CoA の抗酸化分子としての性質や役割は未解明であった。*Cb*GAPDH は酸化ストレス下(NaOCl)における *in vivo* CoA 修飾の標的であることが LC-MS/MS 解析により判明した。グラム陰性菌における CoA 修飾の標的タンパク質を同定したのは本研究が初めてである。*Cb*GAPDH は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や NaOCl による過酸化に対し非常に感受性が高く、酵素は不可逆的に不活性化した。一方、*Cb*GAPDH に対して CoASSCoA または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOCl + CoA を添加すると CoA 修飾を誘発し、酵素は可逆的に不活性化した。LC-MS/MS 解析により、CoA は本酵素の活性中心システイン(Cys149)とジスルフィド結合を形成することが判明した。当結果は共有結合ドッキングシミュレーションにより裏付けられており、構造的衝突なく Cys149 が CoA とジスルフィドを形成することが示された。以上の結果から、*Cb*GAPDH の Cys149 が CoA 修飾の標的であると結論付けた。本研究により、CoA は酸化ストレス下にて *Cb*GAPDH の Cys149 を不可逆的酸化から保護し、細胞内レドックスに応じた活性制御機構として機能することが明らかとなった。本結果は、CoA の抗酸化物質としての役割を理解する上で大変重要な知見である。

第3章では、*Citrobacter* sp. S-77 由来 ADHE(*Cb*ADHE)の酵素学的特性を速度論的解析により評価した。ADHE は、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)とアルコール脱水素酵素(ADH)が融合した二機能性酵素である。しかし、本酵素の2つのドメインが融合する意義は不明であり、詳細な速度論的解析は十分に行われていない。本株のゲノム解析により *adhE* 遺伝子の存在を見出し、ALDH 及び ADH ドメインにより構成される二機能性酵素であることが確認された。*Cb*ADHE の両ドメインの触媒特性を速度論的解析に基づき評価した結果、本酵素は acetyl-CoA と高い親和性を有しており、特異性定数( $k_{cat}/K_m$ )は acetyl-CoA reductase に対して最も高値を示した。最大反応速度( $V_{max}$ )はアセトアルデヒドを消費する反応に対し高値を示し、アセトアルデヒド生成反応に比して除去反応の方が高活性

値を示す傾向が見られた。本結果より、*CbADHE* は生体内で細胞毒性を示すアセトアルデヒドの遊離を防止し、迅速に除去するのに適した性質を有することが示唆される。

第4章では、*Citrobacter sp. S-77* 由来 ADHE(*CbADHE*)の活性が補酵素 A により制御される可能性について検討した。共有結合ドッキングにより、構造的衝突なく活性中心 Cys245 が CoA とジスルフィド結合を形成することが示唆された。*CbADHE* は  $H_2O_2$  による過酸化に対し感受性が高く、不可逆的に不活性化した。*CbADHE* に対して CoA の存在下で  $H_2O_2$  を添加した場合、酵素は可逆的に不活性化した。従って、CoA 修飾は酸化ストレス下にて *CbADHE* を不可逆的酸化から保護し、活性制御機構として機能する可能性が示された。CoA 修飾は近年になり提唱された新たな翻訳後修飾であり、その役割および制御機構はほとんど明らかではない。本結果より、CoA は酸化ストレス下において ADHE の活性制御に関与することが示唆される。

第5章では、新系統に分類された好熱性非ヘテロシスト型シアノバクテリア *Thermoleptolyngbya sp. O-77*(*TL. O-77*)のゲノムより窒素固定関連遺伝子群を同定し、そのニトロゲナーゼ( $N_2ase$ )活性を評価した。窒素固定能を有する好熱性非ヘテロシスト型シアノバクテリアのゲノム解析及び窒素固定活性の評価を実施したのは本研究が初めてである。ゲノム解析により、マスターレギュレーター遺伝子 *cnfR* を含む 29 個の窒素固定関連遺伝子を同定した。*TL. O-77* の窒素固定活性を評価するために無窒素源培地中、 $45^\circ C$ 、400Lux の条件下で  $N_2ase$  の発現を誘導した。その結果、 $Ar/N_2/CO_2$  の混合ガス比率が誘導に影響を与える因子であることを見出した。本株の  $N_2ase$  発現誘導後の窒素固定活性は光強度および温度に依存しており、 $40^\circ C$  および 400Lux にて最大活性値を示した。本結果は、温泉生態系における本菌をはじめとする温泉藻の進化や窒素循環における役割を理解する上で有力な情報である。また、シアノバクテリアによる窒素固定機構の解明に向けた研究を遂行する上での新規研究材料を提供した点においても有意義である。

以上、第2、3、4、5章にて得られた知見により、酸化ストレスによるチオール酵素や金属酵素の活性制御機構に対する理解がより一層進展するものと考えられる。これらは生命現象の理解を深めるのみならず、酸化ストレスが関連する各種疾患の原因解明や生体機能を巧妙に利用したエネルギー変換系構築へ向けた基礎研究として意義がある。今後、本論で述べた活性制御機構の全容解明に向けた基礎研究や応用研究が進展することを期待する。

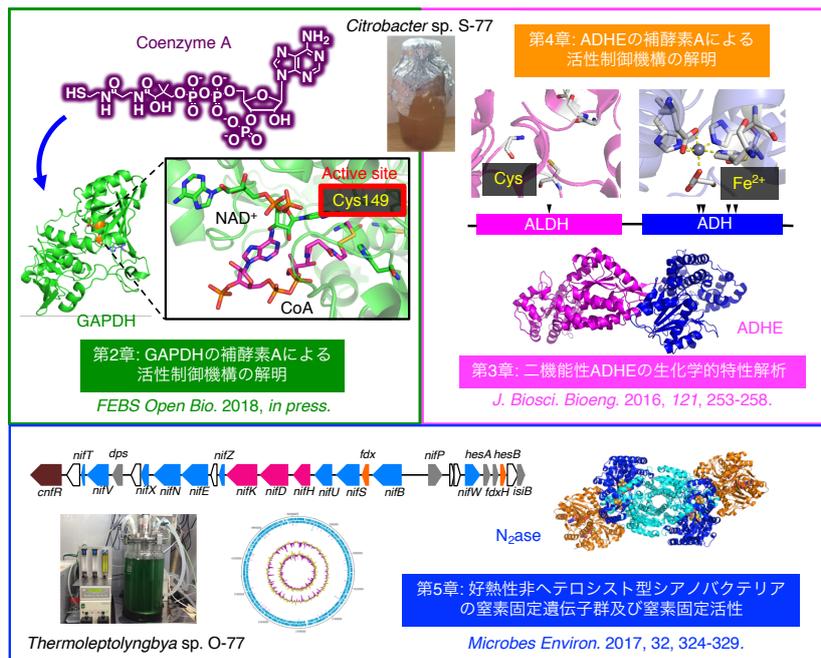


図 1. 本論文の構成.