

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Golam Mustafa
審査委員	主査 山田 守 (印) 副査 松下一信 (印) 副査 右田 たい子 (印) 副査 澤 嘉弘 (印) 副査 森 信寛 (印)
題目	Functions of bound quinone in membrane-bound glucose dehydrogenase of <i>Escherichia coli</i> (大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素における結合型キノンの機能)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) は、補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) を含有するキノプロテインファミリーの一つであり、ペリプラズムにおいてグルコースをグルコン酸へと酸化し、ユビキノン (UQ) を介して、ユビキノールオキシダーゼへと電子を伝達する。本酵素は、その確立された簡単な精製方法や構造的な特徴から、呼吸鎖初発酵素 (電子伝達系脱水素酵素) の機能解析に適しており、特に、初発酵素における結合型キノン (Q) の機能解明のための良いモデルとなる。また、より安全な血糖値測定のためのセンサーとしての開発も期待されている。</p> <p>mGDH は 88 kDa の単一タンパク質で、5 回の膜貫通配列をもつ疎水性 N 末側領域と、PQQ や金属イオンが結合する超バレル構造の C 末側触媒領域とから成る。これまでに、結合 UQ が結合する Q_I 部位とバルク UQ が結合する Q_{II} 部位の二つの UQ 結合部位をもつことが明らかにされている。C 末端触媒領域の Asp-466 や Lys-493 は、PQQ に隣接し、触媒反応に直接的にあるいは間接的に関与している。本研究では mGDH の結合キノンの機能を明らかにすることを目的として、精製酵素を用いた種々の解析から、次のように多くの新しい知見を得ている。</p> <p>これまで呼吸鎖初発酵素について結合型キノンの存在は報告されているが、その機能解析はほとんど行われていない。本研究では、まず、パルスラジオリシス解析によって、結合 UQ から PQQ へ電子が移動することを見出している。この移動速度から PQQ と結合 UQ との空間的距離は 11~13 Å と予測され、その 2 者が近接していることを示唆している。この結果は、電子が PQQ から結合 UQ へ直接渡る可能性を示唆したものである。また、結合 UQ と相互作用するアミノ酸残基を特定するために、PQQ の近傍に位置する Asp-354, Asp-466, Lys-493 の変異型 mGDH について、酵素学的解析やパルスラジオリシス及び EPR 解析を行っている。これらの変異体は、脱水素酵素活性や PQQ 還元活性が大きく低下していた。CD や HPLC 解析によって、精製 K493A, D466N, D466E 変異体は、野生型 mGDH と構造的な違いはほとんど見られないが、結合 UQ 含量が顕著に減少していることを示している。また、これらの変異体は、パルスラジオリシスからの電子</p>	

によって形成されるセミキノンラジカルに違いが見られた。これらの結果は、Asp-466 と Lys-493 は結合 UQ に近接し、相互作用していることを示唆したものである。加えて、触媒活性に必要な金属イオンと相互作用すると推測される Asp-354 をアスパラギンへ置換した変異体では、金属イオンに対する特異性が変化することを示し、その推測を裏付けた。

大腸菌呼吸鎖構成成分に結合するキノンには UQ とメナキノン (MQ) とがあり、UQ は好気条件で MQ は嫌気条件でそれぞれ生合成され利用されている。また、mGDH は嫌気条件でも弱いながら発現する。そこで、次に、MQ が mGDH において結合 Q として UQ と置換できるか否か、そして同様な機能性を示すか否かを検討している。UQ または MQ、あるいはその両方を生合成できない大腸菌から mGDH を精製し、それぞれの解析結果を比較している。Q 非含有 mGDH は、UQ 含有 mGDH と比べて、グルコース脱水素酵素活性や UQ₂ 還元活性が非常に低いことが示された。Q 非含有 mGDH の脱水素酵素活性が UQ₁ の添加によって部分的に回復したことから、結合 Q が触媒反応に関与することが示唆された。また、MQ 含有 mGDH の酵素活性は UQ 含有 mGDH のものとほぼ同じであったが、セミキノンラジカルの特性は互いに異なっていた。UQ 含有 mGDH がニュートラルラジカルを形成するのに対して、MQ 含有 mGDH はアニオンラジカルを形成した。結合 Q から PQQ への電子伝達速度は、UQ 含有 mGDH が $1.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ であったのに対して、MQ 含有 mGDH が $5.7 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ であった。また、結合 MQ セミキノンの EPR シグナルは結合 UQ のものと同じであった。これらの結果から、MQ は UQ と同じ場所に結合 Q として導入されることが示された。また、UQ₁ を用いた再構成実験から結合 Q が触媒反応にも関わっていくことを示唆している。このように、UQ だけでなく MQ が結合 Q として分子内電子移動に関わっていることを初めて示すと同時に、触媒反応にも貢献していること明らかにしている。

加えて、大腸菌での mGDH の役割を考察している。大腸菌は補酵素 PQQ 合成遺伝子を欠き、PQQ を生合成できないが、mGDH を保持している。ところが、パルスラジオリシスや EPR 解析結果から、mGDH 中の結合 Q は、酸化型に加えて還元型あるいはセミキノン型で存在していることが示された。このことから、mGDH 中の結合 Q が膜中の過剰な電子をクバルク Q から受け取り、活性酸素種の生産抑制に寄与していることを予想している。

以上のように本研究は、大腸菌グルコース脱水素酵素の結合キノンの機能を詳細に解析し、分子内の局在位置や触媒反応や分子内電子移動における役割などを明らかにしている。また、単に大腸菌グルコース脱水素酵素の機能解析にとどまらず、呼吸鎖初発酵素の結合キノンの役割を確立するための重要な知見を提供すると考えられる。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。