

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 侯 峰

本論文では、脂肪酸合成経路における新規エノン還元酵素 CLA-ER の基質認識機構と反応機構の解明を目的とし、X線結晶構造解析と各種変異体酵素を用いた活性測定の評価（第4章）を行い、CLA-ER の脂肪酸の認識とエノン還元反応に重要な残基を同定し、反応機構を提案している。また、構造と配列の情報に基づいて、CLA-ER の新規活性と遊離脂肪酸の認識機構を議論している。本論文は5章からなる。

第1章は序論として、脂肪酸の生理機能、代謝経路と新規エノン還元酵素 CLA-ER の特徴をまとめている。生体内には多様な脂肪酸が存在し、生体膜形成、タンパク質の機能調節、核内受容体を介した転写調節など、様々な役割を演じている。このため、脂肪酸の代謝と調節は生体にとって極めて重要である。これまでに、脂肪酸がアシル CoA やアシル ACP の状態で、不飽和化、水酸化、伸長、転移など、様々な代謝経路によって変換されることが知られている。近年、新たな脂肪酸代謝経路として飽和化経路が *Lactobacillus* 属乳酸菌 *L. plantarum* AKU 1009a において発見され、CoA などの補酵素を使わず、リノール酸を飽和化し、オレイン酸を生成できることが明らかになった。この代謝経路でエノン還元反応を触媒する酵素として 10-oxo-11(*E*)-octadecenoic acid 還元酵素 (CLA-ER) が同定され、不飽和脂肪酸のエノン部分の C=C 結合を飽和化する反応を触媒することが明らかになった。CLA-ER は、NADH oxidase/flavin reductase family に属しており、このファミリーにおいてエノン還元反応を触媒する酵素はこれまで報告されていない。そのため、CLA-ER の遊離脂肪酸の認識機構と新規エノン還元活性を解明することは学術的に非常に意義がある。

第2章では、CLA-ER と FMN 複合体の X線結晶構造解析について述べ、構造的な特徴を論じている。申請者は大腸菌発現系を用いた全長の CLA-ER の発現・精製系を構築し、高純度の CLA-ER 試料を大量調製し、様々な共結晶を取得した。分子置換法により、最終的に、CLA-ER の FMN との複合体構造を 2.10 Å の分解能で決定することに成功した。CLA-ER は7番の α -helix 間の疎水性相互作用と C 末端のドメインスワッピングにより、安定なホモ二量体を形成しており、二量体ごと、2分子の FMN が結合していることが観察された。また、プロトマーはコア領域と可変領域に分けることができる。コア領域は中心の β -sheet と周り7つの α -helix から構成される。可変領域は5番と6番の α -helix から構成され、コア領域の両側に位置するように配置していることを見出した。

第3章では、CLA-ER の FMN と基質 KetoB との複合体、FMN と生成物 KetoC との複合体の X線結晶構造解析について述べ、再構築した二量体構造と脂肪酸結合様式を論じている。脂肪酸存在下の結晶構造は二量体構造を保っており、二量体中に2分子の FMN と脂肪

酸が観察された。電子密度と配向を逆転した脂肪酸のモデルを用いて、カルボキシル基の配向を決定した。また、結晶中に見えたコア領域から外へ伸長している C 末端領域の構造は、ゲル濾過の結果とパッキングの様式に基づいて再構築した。以上の工夫をした上で、第 4 章で議論するためのモデルを構築した。

第 4 章では、CLA-ER の結晶構造と変異体の活性に基づいて、脂肪酸を認識する構造基盤とエノン還元反応を触媒する構造基盤を述べ、反応機構を論じている。脂肪酸が結合している構造と結合していない構造を比較し、脂肪酸を結合している構造の可変領域が隣接分子に向かって 45 度傾いたことを見出した。この構造変化に伴い、Phe126 の側鎖は反転し、脂肪酸のエノン部位の空間を制限した。この空間制限は脂肪酸のカルボニル基を認識している C51 と FMN と共に、脂肪酸のエノン部位の認識に寄与すると考察している。この知見は、F126A 変異体において活性が顕著に低下することにより支持されている。C51 は脂肪酸エノン部位の付近に唯一存在する親水性残基であり、極性により活性に寄与した。また、可変領域の構造変化と共に、Y101 の先端が C51 の付近に移動することが観察された。Y101 が先端の水酸基を使って活性に寄与し、C51 を介したプロトン供与の反応機構を提案した。また、C51A や Y101F の変異体では活性が完全には失われなかったため、ペプチド結合を介して水分子に電子を伝達するもう一方の反応機構を考察した。

第 5 章では、エノン還元活性を示す構造基盤に基づいて、NADH oxidase/FMN reductase family の中で CLA-ER が特異的にエノン還元酵素として機能する理由を論じ、CLA-ER が CoA などの補酵素を使わずに遊離脂肪酸を認識する機構を考察している。CLA-ER と類似な酵素を構造の特徴に基づいて分類し、脂肪酸の認識に重要である可変領域を持つ酵素を特徴づけた。さらに、活性に重要なアミノ酸残基の保存性により、CLA-ER の特徴を説明した。また、カルボニル基を持つ遊離脂肪酸の認識について、CLA-ER は結合部位の電荷分布により脂肪酸の初期認識を行い、可変領域の改変構造により脂肪酸を固定化する認識機構をまとめた。これらの研究は、新規エノン還元酵素群の発見と遊離ケト脂肪酸を認識する構造基盤のさらなる理解に貢献できる。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上・応用上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。