

論文の内容の要旨

論文題目

ヌクレオチド代謝酵素の立体構造からみる基質特異性, および, 自然免疫応答の分子基盤

(Molecular basis for substrate specificity of nucleotide-metabolizing enzymes involved in innate immune response)

氏名 加藤 一希

酵素は「鍵と鍵穴」に例えられるように基質を厳密に認識することで, 様々な生体反応を適切に触媒している. 本研究では以下に示すようなヌクレオチド代謝酵素に着目し, X線結晶構造解析を用いてこれらの立体構造を決定することで, 酵素が基質を厳密に認識して生理機能を制御する分子基盤の解明を試みた.

Enpp ファミリータンパク質の基質特異性の構造基盤

Enpp ファミリータンパク質は, 高等真核生物に保存された細胞外ホスホジエステラーゼで, 様々な生体分子を加水分解して多彩な生理機能に関与する. 中でも Enpp1 はヌクレオチド三リン酸を加水分解してピロリン酸を産生し, 骨の形成を阻害する役割を持つ. 本研究では精製したマウス由来 Enpp1 を用いて生化学的な解析をおこない, Enpp1 が ATP を特異的に加水分解して, ピロリン酸を産生することを明らかにした. この Enpp1 による ATP 特異的な認識機構を理解するために, Enpp1 と様々なヌクレオチドの複合体構造を 2.7-3.2 Å 分解能でそれぞれ決定した. ヌクレオチドは活性部位に存在する挿入ループによって形成されたポケットに収容され, アデニン塩基特異的に認識されていた. さらに Enpp1 と Enpp2 の構造比較において, 活性部位の挿入ループは Enpp2 では欠失していた. 挿入ループを欠失した Enpp1 変異体は Enpp2 様の LysoPLD の活性を示したことから, 挿入ループが Enpp ファミリー間で異なる基質特異性を規定していることを明らかになった. 本研究における発見によって, Enpp

ファミリータンパク質は各々の基質を加水分解して多彩な生理機能に関わるように構造的に進化してきたことが推察された。

Cyclic GMP-AMP 合成酵素の構造機能解析

Cyclic GMP-AMP (cGAMP) はアデノシンとグアノシンが2つのホスホジエステル結合によって環状につながった分子で、生体のセカンドメッセンジャーとして働く。哺乳類では cGAS と呼ばれる酵素がウイルス由来の DNA を認識して活性化し、2'-5'ホスホジエステル結合を含む cGAMP (2'-5' cGAMP) を産生し、宿主の免疫系を活性化する。本研究では cGAS によるウイルス DNA の認識機構を解明するために、ヒト由来 cGAS の apo 型構造を 1.9 Å 分解能で決定した。結晶構造から cGAS は活性部位の反対側に正電荷の溝、および、ジンクフィンガー構造を持つことがわかった。構造に基づいた変異体解析によって、2 つの構造的特徴は cGAS が dsDNA を適切な配向で結合し、STING を介したシグナル伝達に必須であることを明らかにした。さらに cGAS 依存的な STING の活性化は IRF3 のみならず NF-κB 経路も活性化することを明らかにした。

一方で *Vibrio cholerae* では DncV が両方のホスホジエステル結合が 3'-5' でつながった cGAMP (3'-5' cGAMP) を産生し、病原性の制御に関わる。cGAS と DncV 間で異なる cGAMP の触媒機構を解明するために、*Vibrio cholerae* 由来 DncV-ヌクレオチド複合体の pre-reaction state における結晶構造を高分解能で決定した。DncV-GTP 複合体と 3'-dATP 複合体の構造比較から、DncV は acceptor ポケットに ATP を、donor ポケットに GTP をそれぞれ結合することによって 3'-5' cGAMP を産生することが明らかとなった。さらに DncV と cGAS 間の pre-reaction state における構造比較によって、acceptor ヌクレオチドの配向が cGAS と DncV 間で異なる cGAMP (2'-5' vs 3'-5') の産生を規定していることを明らかにした。