

博士論文要約 (Summary)

平成 28 年入学

連合農学研究科 応用生命科学 専攻

氏 名 大貝茂希

タイトル	非タンパク性アミノ酸ミモシンの合成・分解系酵素に関する研究
------	-------------------------------

キーワード (ミモシン) (PLP 依存酵素) (分子シミュレーション)

ミモシンはマメ科ネムノキ亜科に属するギンネム (*Leucaena leucocephala*) 及びオジギソウ (*Mimosa pudica*) にのみ存在する非タンパク性アミノ酸である。ミモシンの合成・分解酵素はピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を補酵素とする PLP 依存酵素ファミリーのメンバーであるが、その反応機構や分子進化に関する知見は極めて限られている。また、ミモシンは、二価金属イオンのキレート作用を持ち、また PLP 安定した複合体を形成し、様々な生物学的プロセスを阻害するため、有望な資源植物であるギンネムの有効利用の妨げとなっている。本研究においては、第二章と第三章でギンネム及びオジギソウのミモシンの合成・分解系酵素の特性を分子レベルで解析し、酵素反応機構と進化メカニズムの解明を試みた。第四章においては生物学的ミモシン除去法の開発に寄与する基礎知見を得ることを目的として、ミモシン分解能の高い細菌由来ミモシン分解酵素 (ミモシナーゼ) の特性を解析した。

第二章において、オジギソウの持つミモシナーゼと CBL のクローニングを行い、酵素学的性質の比較を行った。オジギソウミモシナーゼは CBL と同じ PLP 依存酵素であったが、ジスルフィド結合還元剤に影響を受け、ミモシンとシスタチオニンの両方を基質として認識するなど既知のミモシナーゼとは異なる特徴を有することを明らかにした。さらに分子動力学シミュレーションと部位特異的変異導入を用いた実験により、ミモシナーゼと CBL の分子進化には基質の側鎖と相互作用する残基の変異と、ジスルフィド結合の変更によるポケットサイズの変化と構造の柔軟性が関与していることを初めて指摘した。

第三章においては、更なるミモシン合成酵素の探索と分子進化メカニズムの解析のためにギンネム葉緑体のシステイン合成酵素と、オジギソウ細胞質のシステイン合成酵素のクローニングを行い、酵素学的性質の解析を行った。両酵素ともミモシンの合成は行わず、システインの合成のみが確認できたためミモシン代謝には関与していないことが明らかとなった。しかし、ミモシン合成酵素と比較的近縁である酵素との配列比較から、ミモシン合成酵素の分子進化には、報告のある 3 つの活性残基のうち 1 つの残基の変異が関与していることが示唆された。

第四章において、高いミモシン分解能を持つ細菌 *Arthrobacter* sp. Ryudai S1 をギンネム生育土壌より単離するとともに、本菌の持つミモシナーゼのクローニングに成功した。酵素学的性質を測定したところ、本酵素は既知のミモシナーゼよりも 20 倍以上も高い触媒効率を有することを明らかにした。また、系統解析の結果から本酵素は既知のミモシナーゼや、報告のある *Arthrobacter* 属の CBL とはアミノ酸配列

が比較的異なることが明らかとなった。分子動力学シミュレーションと部位特異的変異導入より、本ミモシナーゼの高い触媒効率と基質特異性には、芳香族アミノ酸による基質結合ポケットのサイズ調整や基質の側鎖と相互作用する残基の特性が大きく寄与していることが明らかとなった。

これらの成果は、動植物・細菌を問わず多様な反応性を持つ **PLP** 依存酵素の反応機構や進化の理解のみならず、有望な資源植物であるギンネムの有効活用にも大きく貢献する基礎知見である。