

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 伊藤 創平
指導教官 祥雲 弘文

論文題目 超好熱性古細菌由来 ADP 依存性
グルコキナーゼの X 線結晶構造解析

真核生物や多くの嫌気性真正細菌の解糖系では、最も普遍的で進化的にも起源が古いとされている Embden-Meyerhof (EM) 経路が使われており、最初にグルコースが ATP によりリン酸化されて代謝が開始される。しかし古細菌のグルコース代謝は特殊であり、超好熱性古細菌である *Thermococcus litoralis* および *Pyrococcus furiosus* の変形 EM 経路では、既知のキナーゼとは全く相同性を持たない ADP 依存性(リン酸供与体が ATP でなく ADP)のグルコキナーゼ(ADPGK)とフォスホフルクトキナーゼ(ADPPFK)の存在がわかっており、その特殊な反応機構を解明する上で立体構造に興味をもたれた。また、ADPGK と ADPPFK には相同性があり ADP 依存性キナーゼ(ADPK)ファミリーを形成しているが、興味深いことに *Methanococcus jannaschii* 由来の ADP 依存性キナーゼはグルコース、フルクトース-6-リン酸双方をリン酸化できる bifunctional な ADPGK/PFK であることが報告されている。本研究室では、*T. litoralis* と *P. furiosus* 由来 ADP 依存性グルコキナーゼ (tlGK/pfGK) の X 線結晶構造解析を行った。

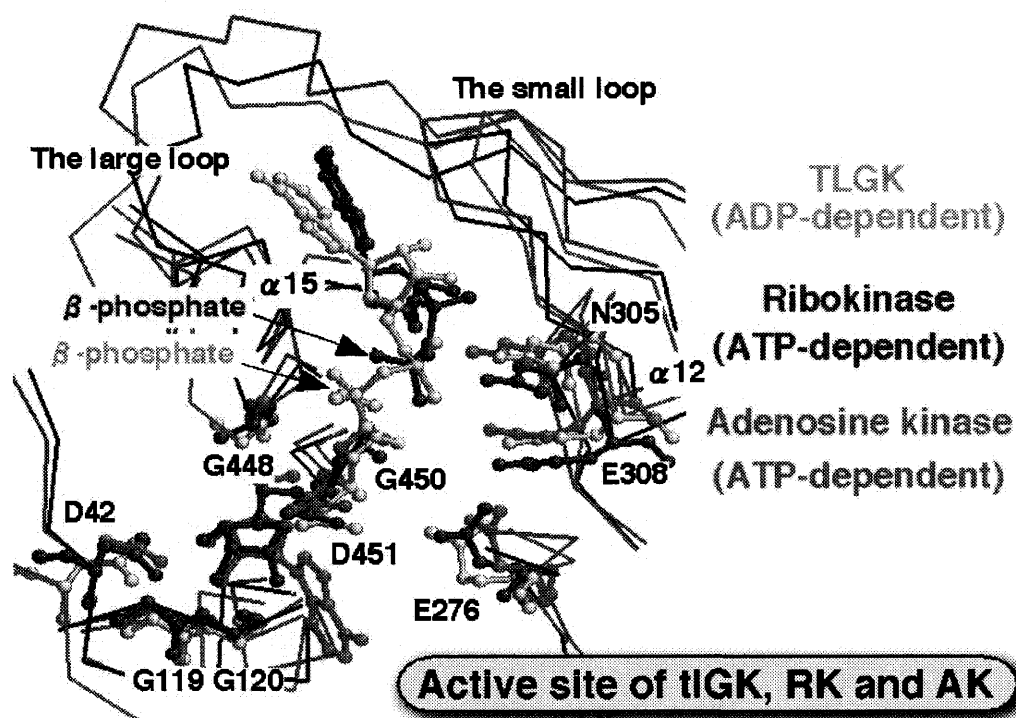
1 : 【tlGK の X 線結晶構造解析】

大腸菌にて大量発現した tlGK を、沈殿剤に塩化ナトリウムを用い ADP 存在下で結晶化を行った。位相決定は H_2PtCl_4 、Xe、 $HgCl_2$ 、の 3 種の重原子置換体を

用いた多重重原子同形置換法により行った。tIGK の最終モデルは 2.3 Å の分解能で、*R* 値 20.4 %、*R*_{free} 25.2 % で ADP を一分子含んでいる。また back soaking により ADP を除いたアポ酵素についても解析した。

tIGK 結晶構造はその一次配列の相同性から予測されたように、構造既知の ATP 依存性ヘキソキナーゼ・グルコキナーゼとは全く異なるフォールドを持ち、活性部位にも保存性は見られなかった。類似フォールドをもつ蛋白質の探索を行ったところ、ATP 依存性である大腸菌由来リボキナーゼ (RK)、ヒト由来アデノシンキナーゼ (AK) と立体構造上の相同性があった。RK、AK と tIGK の立体構造の重ね合わせをおこなったところ、活性中心を含め large ドメイン中央の β シートと small ドメインの β シートさらにそれを取り囲む α ヘリックスの一部の主鎖のトレースが類似していた。しかし立体構造に基づく一次構造のアライメントにおいても 3 者は非常に低い相同性しか示さなかった。また RK ではリボースとの複合体、アポ酵素等幾つかの結晶構造が報告されているが、tIGK は開いた構造をとっているリボキナーゼとより類似していた。また large domain に ADP が結合していた。

活性部位の構造の詳細な比較を行ったところ、RK と AK を含めたりボキナーゼファミリーで保存されている ATP アデノシン部分の認識機構は、tIGK では全く保存されておらず、結果としてヌクレオチドの認識部位がリン酸一つ分ずれていた (下図)。また反応の際リン酸を求核攻撃するために糖の水酸基 (RK、AK では

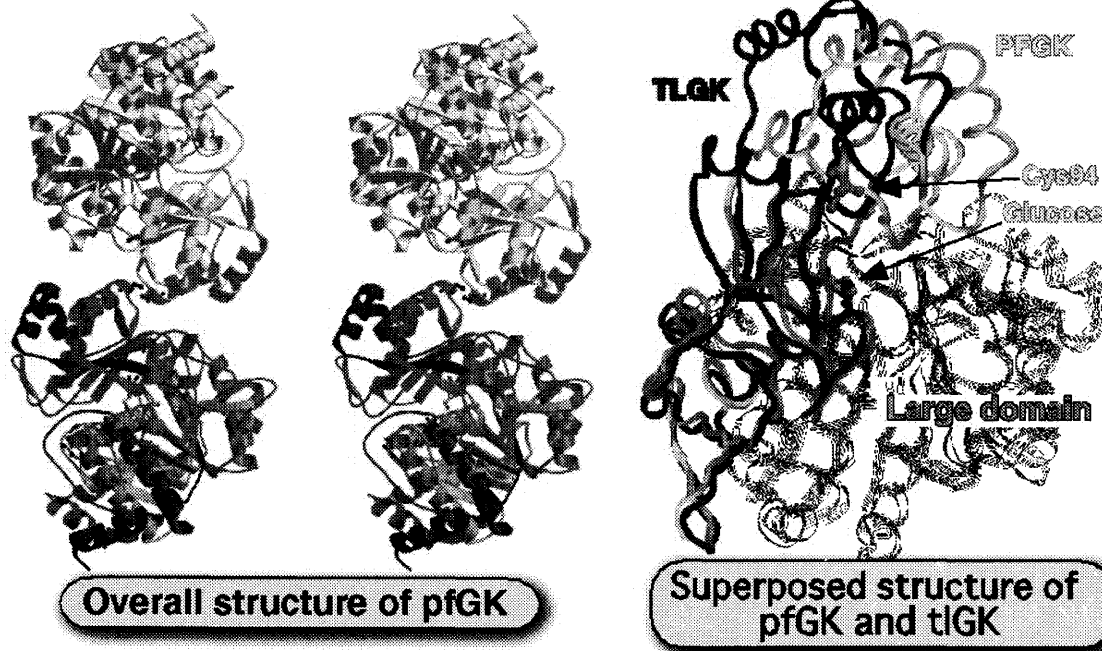


リボース C5 位、tlGK ではグルコース C6 位) から水素を引き抜く catalytic base であるアスパラギン酸を含め、リン酸 (ATP では γ リン酸と β リン酸、ADP では β リン酸と α リン酸) を認識しているグリシンとアスパラギン等の残基が保存されていた。つまり、RK、AK で ATP γ リン酸が結合する所に、tlGK では ADP の β リン酸が位置していることという単純な機構により、その極めて稀な ADP 依存性という性質を獲得していた。これらの結果から、これらキナーゼはリン酸転位反応を行うピロリン酸結合中心のみを保存しその触媒能を失うことなく広く多彩な基質特異性を獲得、進化してきたものと考えられた。

2: 【pfGK の X 線結晶構造解析】

pfGK の位相計算は分子置換法によって行い、サーチモデルとして tlGK の large domain を用いた。pfGK の最終モデルは 1.9 Å の分解能、R 値 16.8%、 R_{free} 20.5% でグルコースと AMP を含んでいる。

pfGK には二つの Cys 残基 (Cys94 と Cys174) があるが、Cys94 同士がジスルフィド結合をすることでホモダイマーを形成した (下左図)。pfGK の全体的な構造は tlGK と類似していたが、tlGK に比べ small domain が約 20° 閉じた構造になっていた (下右図)。このようにドメインが閉じることにより、グルコースと AMP 分子は完全に覆われており、さらに多数の水分子も閉じこ



められクラスターを形成していた。特に small domain の β 11 ストランドは、活性中心を直接覆う重要な領域であり、Glu195、Arg197、Ile199 といった保存性の高い残基を含んでいる。Ile199 はグルコース6員環の真上に近づき、グルコースを安定化させる働きがあると考えられた。また Arg197 はヌクレオチドの末端リン酸に近づき、リン酸ジエステル結合を解離させ、リン酸転移反応を起こす引き金となると考えられる。Glu195 は AMP のアデニン環の N6 と水素結合していた。tlGK と pfGK はリン酸供与体として ADP よりむしろ CDP を好むが (ADP の活性に対して 110-120 %)、GDP を使うことができない。一方、ADPPFK の多くは GDP を基質とすることができるが、このような違いは、Glu195 が ADPGK では保存されているが ADPPFK では Ser に置き換わっている事で説明できる。

また pfGK のグルコースの場所に F6P を組み入れて比較を行ったところ、ADPGK で保存されている Glu88、His176、Asp203 が ADPPFK では Ala、Asn、Arg に置き換わっており、これらの残基が基質の識別に重要であることが予想された。His に比べて小さい Asp と正電荷をもつ Arg 側鎖が F6P の結合に必要であると考えられる。

興味深いことに、ADPK と相同性を持つ真核生物由来の機能未知遺伝子がいくつか見つかってきている。tlGK と pfGK、RK の構造情報を元に、これら機能未知遺伝子とのアラインメントを行った結果、全体的な相同性は極めて低いが、機能的に重要な残基の多くが保存されており、また糖基質結合サイト付近のアミノ酸残基は ADPGK により類似していることが明らかになった。

Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H., Wakagi, T. (2001). "Structural Basis for the ADP-Specificity of a Novel Glucokinase from a Hyperthermophilic Archaeon." *Structure* **9** (3):205-214.