

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 創平

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る。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。本研は、*T. litoralis* および *P. furiosus* 由来 ADP 依存性グルコキナーゼ (tlGK/pfGK) と基質との複合体の結晶構造を明らかにしたものであり、全二章で構成される。

第一章では、tlGK と ADP の複合体の X 線結晶構造解析について述べられている。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 を加えた系で結晶化を行い、その位相決定は 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い、tlGK の最終モデルを 2.3 Å の分解能で決定している。tlGK 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が無いことを明らかにした。また類似フォールドをもつ蛋白質の探索を行い、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をもち、また RK、AK と tlGK の立体構造の重ね合わせにより、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ることを明らかにした。そして、その活性部位の構造の詳細な比較により、RK と AK を含めたリ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、tlGK 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ずれていること、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とを明らかにした。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。

第二章では、pfGK とグルコース、AMP の複合体の X 線結晶構造解析について述べられている。pfGK の位相計算を tlGK の large ドメインをサーチモデルとした分子置換法によって行い、最終モデルを 1.9 Å の分解能で決定している。pfGK の 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、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° 閉じた構造であることを明らかにした。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み、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、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であり、Glu195 は AMP のアデニン環の N6 と水素結合していることを明らかにした。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が、一方、ADPPFK の多くは GDP を基質とすることができる。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と推測している。また pfGK のグルコースの場所に F6P を組み入れて比較を行い、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を明らかにした。また興味深いことに、ADPK と相同性を持つ真核生物由来の機能未知遺伝子と tlGK と pfGK、RKfamily の一次配列のアラインメントを行い、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した。

以上、本論文は **ADP** 依存性グルコキナーゼの立体構造を **X** 結晶構造解析により明らかにした。また種々の基質との複合体の立体構造も明らかにし、その基質結合部位の詳細と変異体作成による活性中心の同定、および糖基質によるドメインの開閉機構を明らかにした。特に **ADP** 依存性のキナーゼの立体構造を明らかにしたの本研究が初めてであり、当該分野に新知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと判断した。