

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成12年度博士課程入学
氏名 鄭鍾珍
指導教官 祥雲 弘文

論文題目

Structure and function of the enzymes in unique glycolysis system from hyperthermophilic archaeon
(超好熱性古細菌の特殊解糖系酵素の構造と機能に関する研究)

Thermococcus litoralis は超好熱性古細菌で、嫌氣的従属栄養であり、通常の生物と異なる解糖系(変形 Embden-Meyerhof (EM) 経路)によって解糖をするのが特徴である。まず、グルコキナーゼ (ADP-GK) とホスホフルクトキナーゼ (ADP-PFK) が ATP 依存性ではなく ADP 依存性であることが特徴として挙げられる。両者間には相同性があり、新規な ADP 依存性キナーゼファミリー (PFKC ファミリー) を形成している。PFKC ファミリーの酵素は既知の ATP 依存性キナーゼとは全く相同性が認められず、この代謝経路に特異的な酵素である。また最近、*Methanococcus janaschii* には、GK/PFK の両機能をもつ酵素が報告されている。さらに、同じく超好熱性古細菌である *Pyrococcus furiosus* の変形 EM 経路のホスホグルコスイソメラーゼ(PGI)も既知の PGI とは全く異なるアミノ酸配列からなり、cupin superfamily に属していると報告された。

本研究では、まず、*T. litoralis* 由来の cupin 型 PGI(TLPGI)の金属結合部位に関する解析を行い、その立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。さらに、ADP 依存性キナーゼの糖基質結合部位の機能改変を目指して *T. litoralis* 由来の ADP-PFK(TLPFK)と ADP-GK(TLGK)のアミノ酸置換変異体の解析を行い、TLPFK の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。本研究で決定した構造はいずれも、cupin 型 PGI および ADP-PFK としては初の立体構造である。

(1) Characterization of the cupin-type phosphoglucose isomerase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*

TLPGI は cupin superfamily に属しており、既知の典型的な PGI とは全く相同性がない。Cupin 型 PGI は古細菌でも *P. furiosus* PGI 以外には報告されていない。また、cupin superfamily は金属結合モチーフ (モチーフ 1: G(X)₅HXH(X)_{3,4}E(X)₅G, モチーフ 2: G(X)₅PXG(X)₂H(X)₃N) を持っているという特徴がある。本研究ではこれまで測定されていない古細菌由来 cupin 型 PGI の金属含量を、TLPGI を材料に用いて測定した。さらに、金属結合部位のアミノ酸残基の変異体を作成し、金属含量の変化を調べた。その結果、TLPGI 1 分子に対して Fe 原子は 1.25 個、Zn は 0.240 個含まれていた。TLPGI の中で金属結合部位と予想される三つの His 残基と一つの Glu 残基に site-directed mutagenesis の方法で変異を加え、His89Ala、His91Ala、Glu98Val、His137Ala を作成した結果、これらの変異体はいずれもほとんど活性が無いことが分かった。これらの変異体では、ほとんど Fe と Zn は検出されなかった。TLPGI の四次構造はホモ 2 量体であり、1 サブユニットあたり Fe が平均 0.63 個だけ含まれていると思われる。活性測定の際に Fe を加えると、活性は 156%まで上昇した。

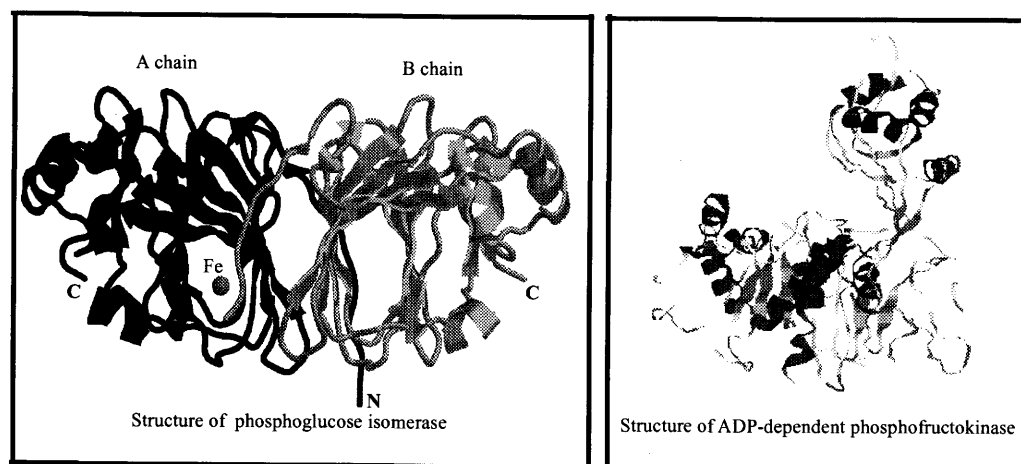
(2) The X-ray crystal structure of phosphoglucose isomerase from *Thermococcus litoralis* at 2.18 Å

PGI はグルコース-6-リン酸 (G6P) とフルクトース-6-リン酸 (F6P) 間の異性化反応を触媒する。G6P と F6P は主に閉環構造で存在し、従来の PGI では、保存されている Lys, His, Glu の働きにより、開環、異性化、閉環の順に反応が進むことが分かっている。TLPGI は従来の PGI とは全く異なる 立体構造・反応機構を持つと予想されたため、X線結晶構造解析を行った。

TLPGI は 24 % PEG 8000 を沈殿剤として用い、5 °C の条件で結晶化した。得られた結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数は $a=40.8$ Å, $b=82.2$ Å, $c=125.1$ Å であった。セレンメチオニラ

ベルした結晶を用い、多波長異常分散法によって位相を決定した。

阻害剤である 6-ホスホグルコン酸との共結晶による複合体の構造解析も行った結果、基質結合に関わる残基が明らかとなった。また、基質 G6P と F6P の複合体も共結晶から得られた。これらの複合体は F6P の直鎖型中間体になっていた。阻害剤の 6-ホスホグルコン酸と比べ、C1 の向きは同じであるが短くなっていた。金属結合部位の中心にある Fe にこの基質や阻害剤が結合していた。



(3) Interconversion of the sugar binding sites between the ADP-dependent glucokinase and phosphofructokinase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*

TLPFK を含む ADP-PFK は、ADP-GK と同じ PFKC ファミリに分類されており、これまでよく知られている PFK のファミリとの相同性は全くない。TLPFK は、ADP-PFK 同士では 65–70%、ADP-GK とは 25–30% の相同性がある。現在、本研究室の伊藤創平が、*T. litoralis* の ADPGK(TLGGK)と *P. furiosus* の ADPGK(PFGK)の双方で立体構造及を解明し、PFGK ではグルコース基質結合部位の構造を明らかにしている。本研究では、TLPFK と TLGGK の糖基質結合部位

のアミノ酸の相互置換を行い、その糖基質特異性の変化について検討した。TLGK では $\beta 3$ の Glu96 を Ala に、 $\beta 8$ の His184 を Asn に、 $\beta 9$ と $\alpha 8$ の間の Asp211 を Arg に置換した。TLPFK では Ala76 を Glu に、Asn167 を His に、Arg198 を Asp に置換した。また、その置換体にさらに 6-9 の アミノ酸を置換したキメラを作成した。その結果、TLGK では Glu96 がグルコキナーゼ(GK)活性の維持に重要であり、TLPFK では Asn167 がホスホフルクトキナーゼ(PFK)活性の維持に重要であることを確認した。そして、TLGK の His184Asn、Asp211_1Arg(キメラ)の変異体が野性型 GK に比べて各々4.3、3.9 倍高い PFK 活性を示し、TLPFK の Ala76_1Glu(キメラ)の変異体は野性型 PFK に比べて 15 倍高い GK の活性を示した。TLGK の Asp211_1Arg(キメラ) が Asp211Arg より PFK 活性が高い理由としては、Arg 以外に *M. janaschii* で保存されている Val と Glu の 2 つのアミノ酸残基も重要である可能性が考えられる。Ala76_1Glu(キメラ)がさらに高い GK 活性を示すのは、Ala と Glu が GK において重要な結合部位であるためと考えられる。

(4) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of ADP-dependent phospho-fructokinase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*

TLPFK は 4 M NaCl を沈殿剤として用い、25℃の条件で結晶化した。得られた結晶は空間群 $P4_12_1$ に属し、格子定数は $a=b=85.4 \text{ \AA}$, $c=163.9 \text{ \AA}$ であった。PFK ファミリの中で ADP-PFK の立体構造はこれまで明らかになっていなかったため、重原子 K_2PtCl_4 , $H AuCl_4$ を soaking した重原子置換体結晶を用い、多重同形置換法(MIR)によって位相を決定した。この初期位相を基にモデルを構築し、分解能 2.5 \AA で立体構造をある程度精密化した。この結果、TLPFK は large domain と small domain の 2 つのドメインからなり、その全体構造は TLGK, PFGK およびそれらが属するリボキナーゼファミリーと似ていることが分かった。現在精密化の途中であるため、詳細な構造は判明していないものの、基質結合部位が PFGK のグルコース結合部位と一致することが分かった。