

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鄭 鍾珍

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 jannaschii* 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。

本論文では、*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。本論文で決定した構造はいずれも、cupin 型 PGI としては初の立体構造である。

第 1 章では、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 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。本論文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。

第 2 章では、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 $a=40.8 \text{ \AA}$ 、 $b=82.2 \text{ \AA}$ 、 $c=125.1 \text{ \AA}$ 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。

第 3 章では、TLPFK と TLGK 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 β 3 の Glu96 を Ala に、 β 8 の His184 を Asn に、 β 9 と β 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. jannaschii* 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。

第 4 章では、TLPFK は 4 M NaCl を沈殿剤として用い、25°C の条件で結晶化した。得られた結晶は空間群 $P4_12_12$ 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 、 $HgCl_4$ 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、PFK およびそれらが属するリボキナーゼファミリと似ていることが分かった。

以上本論文は、これまで解析されていなかった、超好熱性古細菌由来の新規解糖系酵素について、酵素学的、蛋白質工学的、構造生物学的な研究を行ったもので、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認めた。