

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成16年度博士課程 進学
氏名 丸岡 慎太郎
指導教員名 田之倉 優

論文題目

超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 GMP 合成酵素の結晶構造解析

1. 背景

ヌクレオチドの合成は、5-ホスホリボシル-1 α -ニリン酸 (PRPP) を利用する *de novo* 合成系と、外部から摂取した物質の分解産物である遊離塩基を用いるサルベージ合成系がある。GMP 合成酵素は *de novo* プリン合成系において XMP を GMP へ変換する反応を触媒する。この変換は、グルタミンの加水分解によりグルタミン酸とアンモニアを生成する反応と、そのアンモニアを利用して XMP を GMP へと変換する反応からなる。グルタミンの加水分解を触媒するのがグルタミンアミドトランスフェラーゼ (GATase) であり、GMP を合成するのは XMP、ATP、Mg イオンを基質とし ATP ピロフォスファターゼ活性を持つ GMP シンターゼである (図 1)。バクテリア、真核生物ではこの一連の反応が一つの酵素の別々のドメインにおいて起こるのに対し、古細菌では別々に存在している二つの酵素によって行われる。

現在までに GMP 合成酵素の構造は、*E. coli* 由来のものしか知られていなかった。本研究では古細菌の GMP 合成酵素の詳細な機構の知見を得ることを目的として、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 の GATase (PH-GATase) と GMP シンターゼ (PH-GMP シンターゼ) の結晶構造解析を行った。

Pyrococcus horikoshii OT3 は、沖縄海溝内の熱水床付近より単離された絶対嫌気性の超好熱古細菌である。硫黄の存在下、88 $^{\circ}$ C \sim 104 $^{\circ}$ C (至適生育温度は 98 $^{\circ}$ C) で生育する。生

産されるタンパク質は高い耐熱性を有し、化学、食品、医薬品など産業分野への応用が期待できる。

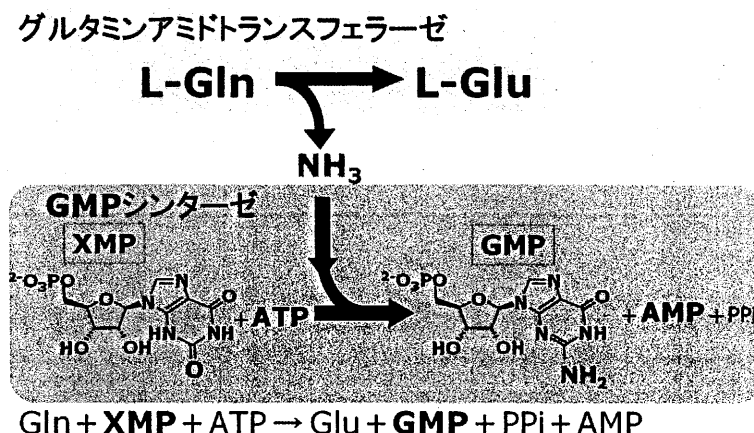


図1 GMP 合成反応

2. PH-GATase の結晶構造 (文献1)

GATase は広く生物に存在している酵素であり、GMP シンターゼだけでなく、アンモニアを必要とする多様な合成酵素 (アミノ酸、核酸、アミノ糖、補酵素、抗生物質) と共に働く酵素である。 *Pyrococcus horikoshii* OT3 は 5 つの GATase を持っている。 GMP 合成系で働く GATase は Class I に属し、 Cys-His-Glu triad を活性部位に持つという特徴がある。

PH-GATase は SAD (Single-wavelength anomalous dispersion) 法を用いて 1.9 Å の分解能でその結晶構造を決定した (図 2(a))。 PH-GATase は、 α/β 構造をとり、 11 本の β ストランド、 5 つの α ヘリックス、 1 つの 3_{10} ヘリックスよりなっていた。 活性部位の Cys78 の主鎖二面角は $\phi=55.9^\circ$ 、 $\psi=102.5^\circ$ であり、これはラマチャンドランプロットで許容されない角度であるが、 Cys-His-Glu triad の形成の際によく見られる。 結晶構造は単量体であり、 PH-GATase は溶液中でも単量体として存在していることがゲルろ過クロマトグラフィーにより確認された。

構造解析の結果、 PH-GATase は、 同じ Class I アミドトランスフェラーゼファミリーに属する *E. coli* 由来 GMP 合成酵素 (GuaA) の GATase ドメイン (アミノ酸配列相同性 34%) や *Sulfolobus solfataricus* 由来アントラニル酸シンターゼ GATase (TrpG) (アミノ酸配列相同性 33%) の構造と類似していることが明らかになった。 活性部位の重ね合わせを行った結果、 PH-GATase の Cys C _{β} -S _{γ} の方向は TrpG と同じ向きであり、 GuaA の Cys を 100° 回転した位置にあることが明らかになった (図 2(b))。 Triad の Cys はグルタミンと反応してグルタミルチオエステル中間体を形成する残基であることから、 PH-GATase のグルタミン認識機構は GuaA より TrpG に近いことが示唆された。

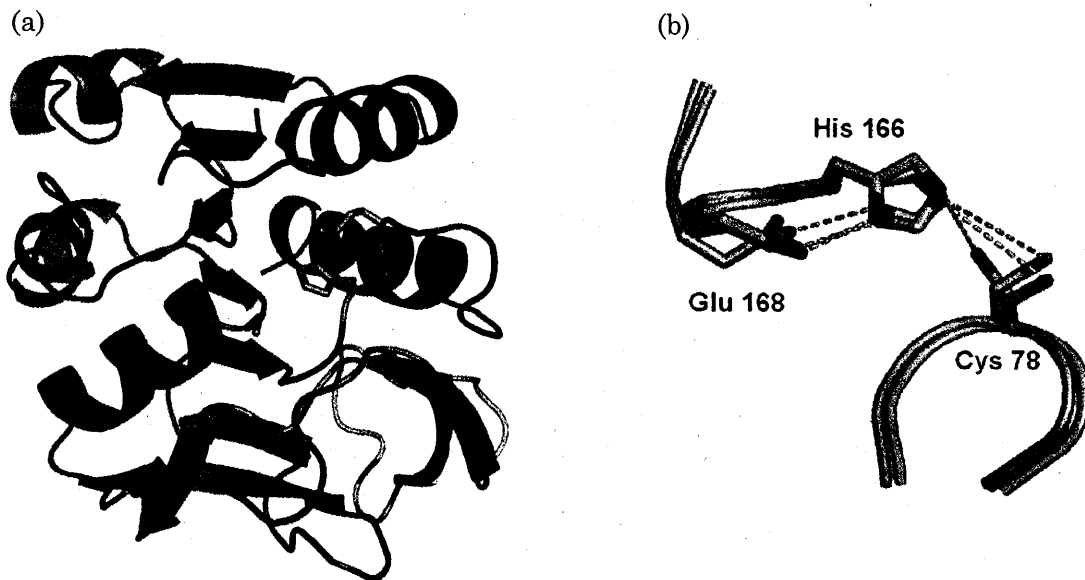


図 2 (a) PH-GATase の結晶構造 (単量体)

(b) 活性部位の重ね合わせ (PH-GATase, *E. coli* 由来 GuaA, *S. solfataricus* 由来 TrpG) 表示してあるアミノ酸残基の番号は PH-GATase の残基の番号に対応している。

3. PH-GMP シンターゼの結晶構造

PH-GMP シンターゼの結晶構造は *E. coli* GMP シンターゼの構造 (PDBid 1gpm) をモデルとして用い、MR (Molecular Replacement) 法により 1.8 Å の分解能で決定した。PH-GMP シンターゼは 9 本の β ストランド、10 本の α ヘリックスよりなっていた。PH-GMP シンターゼの結晶構造は二量体であった (図 3)。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量分析により、PH-GMP シンターゼは溶液中でも二量体で存在していることが分かった。

GMP シンターゼは N 末端側の ATP ピロフォスファターゼ (ATP-PPase) ドメインと C 末端側の二量体化ドメインからなり、この二つのドメインは Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Gly-Leu というプロリンとグリシンに富んだリンカー配列により分けられている。二量体化ドメインは C 末端側の 3 本の β シート、1 本の α ヘリックスより構成され、二量体化にともない 6 本の β バレル構造を形成していた。

A 鎖、B 鎖いずれにおいてもアミノ酸残基 131-154 の電子密度は見られなかった。この 24 残基のアミノ酸は基質がない状態ではゆらいでおり、基質が GMP シンターゼに結合したときに蓋として働くのではないかと考えられる。二量体を構成する A 鎖と B 鎖の構造を比較した結果、root-mean-square deviation (RMSD) は 0.8 Å であった。最も構造が異なっていた領域は二量体化ドメインに存在する Gly241 - Ala248 であった。これは結晶構造のパッキングによる影響であると考えられる。

PH-GATase と PH-GMP シンターゼの複合体形成能を調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィを行ったところ、その相互作用を確認できなかった。PH-GATase と PH-GMP シンターゼが溶液中で複合体を形成しなかったことから、PH-GATase により生成されたアンモニアは自然拡散によって PH-GMP シンターゼへ伝達されと考えられる。また、このことから PH-GMP シンターゼ以外の酵素も PH-GATase により生産されたアンモニアを利用することが可能である。

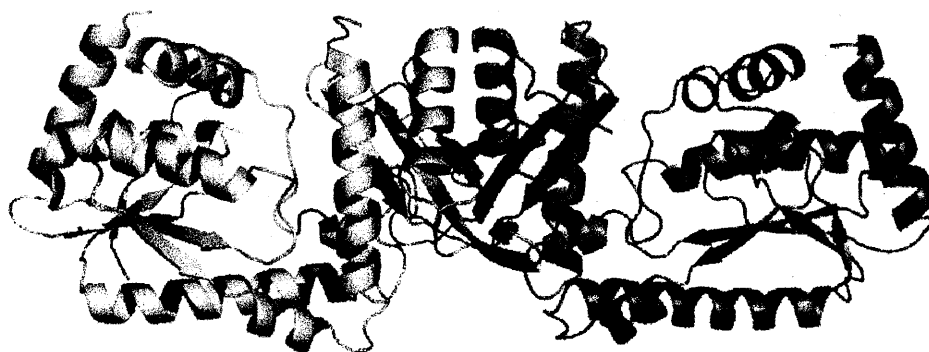


図3 PH-GMP シンターゼの結晶構造 (二量体)

4. まとめ

P. horikoshii OT3 由来 GATase および GMP シンターゼの結晶構造をそれぞれ決定した。PH-GATase の活性 site の比較により、その基質認識機構はアントラニル酸シンターゼのものと類似していることが示唆された。PH-GMP シンターゼと PH-GATase とは複合体を形成しないことが明らかになった。

文献 1)

Maruoka, S., Lee, WC., Kamo, M., Kudo, N., Nagata, K., Tanokura, M.

PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY Vol. 81(B), No. 10, pp. 459-462

“Crystal structure of glutamine amidotransferase from *Pyrococcus horikoshii* OT3”