

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丸岡 慎太郎

本論文では、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の GMP 合成酵素であるグルタミンアミドトランスフェラーゼ (PH-GATase) と GMP シンターゼ (PH-GMP Synthase) の結晶構造解析を行い、その全体構造および活性部位について述べている。また、PH-GATase と PH-GMP Synthase を混合し、基質非存在下、基質存在下においてゲルろ過実験を行い、2つの酵素の相互作用機構を明らかにしている。

序論では、GMP 合成酵素は *de novo* プリン合成系においてキサントシン 5'-リン酸 (XMP) をグアノシン 5'-リン酸 (GMP) に変換する反応を触媒する酵素であり、この反応は GATase 活性と GMP Synthase 活性という二つの酵素活性からなる二段階の反応であることを説明している。GATase 活性はグルタミンを加水分解し、グルタミン酸とアンモニアが生成する反応を触媒する。GMP Synthase 活性は XMP、ATP、 Mg^{2+} と、GATase 活性により生成したアンモニアを基質として GMP を合成する反応を触媒する。この一連の反応は真正細菌、真核生物では一つの酵素の別々のドメインにおいて起こるのに対し、多くの古細菌では二つの酵素によって行われる。古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の GMP 合成酵素の構造解析および相互作用解析を行うことは、GMP 合成が二つの酵素により行われるメカニズムを明らかにするために大いに役立つものと説明している。

本論では、PH-GATase の結晶構造解析、PH-GMP Synthase の結晶構造解析、PH-GATase と PH-GMP Synthase の相互作用解析について述べている。

GMP 合成反応の第一ステップを担う PH-GATase の結晶構造は、セレノメチオン置換体を作製し、単波長異常分散法により、1.9 Å の分解能で決定した。その結果、PH-GATase は 11 本の β ストランド、5 つの α ヘリックス、1 つの 3_{10} ヘリックスよりなり、単量体であることを明らかにした。PH-GMP Synthase は溶液中においても単量体として存在することをゲルろ過クロマトグラフィーにより示した。Cys79、His166、Glu168 により活性部位トライアドが形成されていることを示し、グルタミンチオエステル中間体のモデルを作製することにより、Gly52、Pro53、Asp130 がグルタミンの認識に関わるアミノ酸残基であると推定している。

GMP 合成反応の第二ステップを担う PH-GMP Synthase の結晶構造は、*E. coli* 由来 GMP 合成酵素を分子置換のモデルとして用いることで、1.8 Å の分解能で決定している。その結晶構造から、PH-GMP Synthase は 9 本の β ストランド、10

本の α ヘリックスよりなり、二量体を形成していることを明らかにした。PH-GMP Synthase は溶液中においても二量体を形成することをゲルろ過クロマトグラフィーにより示した。得られた結晶構造を用いて反応産物 AMP、PPi との結合モデルを作製することにより、基質と相互作用するアミノ酸残基を推定しており、Val31、Asp32、Ser33、Lys166、Arg185 がピロリン酸を、Val53 がアデニル基を認識する結合モデルを提唱している。また、二量体間の相互作用を調べており、Arg292 と Asp296 が形成するイオンペアネットワークが二量体の形成において特に重要であることを示した。

PH-GATase と PH-GMP Synthase の相互作用を調べるために、基質非存在下および基質存在下の条件でゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果、PH-GATase と PH-GMP Synthase は、①基質なし、②ATP、 Mg^{2+} 存在下、③XMP、 Mg^{2+} 存在下、の三条件ではいずれも相互作用しないが、④ATP、XMP、 Mg^{2+} 存在下、の条件において相互作用することを明らかにした。この結果から、PH-GMP Synthase に基質 ATP、XMP、 Mg^{2+} が結合することにより構造変化が引き起こされ、PH-GATase との相互作用が可能になるという活性制御機構を提唱している。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、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。