

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成16年度博士課程 進学
氏名 西増 弘志
指導教員名 祥雲 弘文

論文題目 超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の糖代謝関連酵素の構造と機能

超好熱性古細菌は進化系統樹の根元に近いところに位置することから生命の起源に関する基礎研究対象として興味深い。さらに、その酵素は高度な耐熱安定性を有することから産業利用への応用面においても注目されている。超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* は特異な糖代謝経路を持つことが示唆されていたが、その詳細については不明だった。本研究では、X線結晶構造解析と生化学的解析により、*S. tokodaii* の糖代謝経路に関与する4つの特徴的な酵素の構造と機能を明らかにした。その結果、糖代謝経路は最も基本的な代謝経路の一つであるにもかかわらず、想像以上の多様性を持つことが示唆された。

(1) ヘキソキナーゼ^(1,2)

ヘキソキナーゼは、グルコースからグルコース-6-リン酸へのリン酸化を触媒する糖代謝の鍵酵素である。20年以上前に *Sulfolobus solfataricus* 菌体抽出液中に ATP 依存性ヘキソキナーゼ活性が検出されているにもかかわらず、*Sulfolobus* 属ゲノムには既知ヘキソキナーゼの相同遺伝子は見出されないことは謎だった。本研究では、*S. tokodaii* 菌体抽出液中から5段階のカラムクロマトグラフィーにより ATP 依存性ヘキソキナーゼ活性を持つタンパク質 (*StHK*) を精製し、ペプチドマスフィンガープリント法によ

り責任遺伝子 (ORF ST2354) を同定した。ST2354 は、"hypothetical protein"とアノテーションされており、ヒト由来 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) キナーゼと約 25% の配列同一性を持つことがわかった。精製した組み換え *S*tHK の機能解析により、*S*tHK はグルコースに加え GlcNAc などの複数のヘキソースのリン酸化を触媒できる新奇耐熱性ヘキソキナーゼであることが明らかになった。アミノ酸配列の類似性から、*S*tHK は *Sulfolobus* 属に特徴的なヘキソキナーゼであると示唆される。

さらに、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法または分子置換法により、*S*tHK の 4 つの異なる状態 [(1) アポ状態、(2) グルコース複合体、(3) ADP 複合体、(4) キシロース・ Mg^{2+} ・ADP 複合体] の結晶構造を 1.65–2.0 Å 分解能で決定した (図)。アポ状態と ADP 複合体は open 型構造をとるのに対し、グルコース複合体とキシロース・ Mg^{2+} ・ADP 複合体は closed 型構造をとることから、糖結合は大きな構造変化を誘導するが ADP 結合は構造変化を誘導しないことが示唆される。*S*tHK はヘキソキナーゼファミリーに特徴的なコアフォールドを持つが、基質認識に関与するループ構造が他のヘキソキナーゼファミリーのメンバーのそれと大きく異なる。*S*tHK と GlcNAc キナーゼおよびヘキソキナーゼとの構造比較から、なぜ *S*tHK はグルコースと GlcNAc の両方をリン酸化できるのかを説明することができる。さらに、キシロース・ Mg^{2+} ・ADP 複合体は、ヘキソキナーゼファミリーにおいて Mg^{2+} イオンの結合様式が可視化された初めての例であり、これまでにヘキソキナーゼにおいて提唱されていたリン酸転移機構についてより精確に理解することが可能となった。

(2) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ⁽³⁾

フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) は、フルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) からフルクトース-6-リン酸と無機リン酸への加水分解を触媒する糖新生経路の鍵酵素である。アミノ酸配列の相同性に基づいて、FBPase は 5 つのクラスに分類される。超好熱性古細菌由来 FBPase (クラス V) の立体構造はこれまで明らかになっていなかった。本研究では、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法により、*S. tokodaii* 由来 FBPase (*S*tFbp) の結晶構造を 1.8 Å 分解能で決定した (図)。*S*tFbp は新規フォールドを持ち、ホモ八量体構造をとることが明らかになった。活性部位には FBP と 4 つの Mg^{2+} イオンが結合していた。構造既知 FBPase には環状 FBP が結合するのに対し、予想外なことに *S*tFbp には直鎖状 FBP が結合していた。この観察から、

超好熱性古細菌由来 FB Pase は特異な立体構造を持ち、高温環境で多く存在すると予想される直鎖状 FB P を基質として利用するのではないかと推測される。さらに、4つの Mg^{2+} イオンに配位する 8 つのアミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した変異体解析により、保存された Asp12 が塩基触媒として働くという反応機構が推定された。

(3) グリセリン酸キナーゼ

S. tokodaii は、非リン酸化 Entner-Doudroff (ED) 経路によりグルコースをピルビン酸まで代謝する (図)。一般的な ED 経路ではグルコースの段階でリン酸化が起こるのに対し、非リン酸化 ED 経路ではグリセリン酸の段階でリン酸化が起こる。グリセリン酸キナーゼ (GCK) は、グリセリン酸から 2-ホスホグリセリン酸へのリン酸化を触媒する。これまでに少数の GCK について構造解析と機能解析が行われているが、その構造機能相関は不明だった。本研究では、Hg 誘導体を用いた重原子同型置換法により、*S. tokodaii* 由来 GCK (*StGCK*) の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定した (図)。*StGCK* の構造は既知 GCK とよく似ていたが、2 つのドメイン間のクレフトにグリセリンが結合していた。3 つの保存された酸性残基 (Asp183、Glu297、Asp339) がグリセリンの近傍に位置する。D183N、E297Q、D339N 変異体を作製し活性を測定したところ、全ての変異体において活性の著しい低下が観察された。Glu297 はグリセリンの 2-OH 基と水素結合することおよび E297Q 変異体は活性を消失したことをから、Glu297 が塩基触媒としてグリセリン酸の 2-OH 基からプロトンを引き抜くと推測される。

(4) グルセルアルデヒドオキシドレダクターゼ

非リン酸化 ED 経路において、グルセルアルデヒドからグリセリン酸への酸化を触媒する酵素についてはよくわかっていなかった。本研究では、*S. tokodaii* 菌体抽出液中から 5 段階のカラムクロマトグラフィーによりグルセルアルデヒド酸化活性を持つタンパク質 (*StGCOR*) を精製した。*StGCOR* は、3 つのサブユニット [L (89 kDa)、M (32 kDa)、S (19 kDa)] からなる三量体が 2 つ結合したヘテロ六量体で存在する。カラムクロマトグラフィーにおける溶出位置などから、*StGCOR* は、*S. tokodaii* 菌体抽出液中から以前に精製されていたインドールピルビン酸脱炭酸活性とアルデヒド酸化活性の両方を示すモリブドフラボ酵素と一致することが確認された。アミノ酸配列

の相同性から、*St*GCOR はキサンチンオキシダーゼファミリーに属し、モリブデンコファクター (Moco)、FAD、2 つの [2Fe-2S] クラスタを持つことが推測される。*St*GCOR の結晶は 2.2 Å 分解能まで X 線を回折した。*Pseudomonas putida* 由来 quinoline 2-oxidoreductase (PDB code 1T3Q) をサーチモデルとして用いた分子置換法により初期位相を計算し、現在精密化を行っている (図)。精密化の途中であるが、Moco、FAD、2 つの [2Fe-2S] クラスタに対応する明瞭な電子密度が観察される。Moco は真核生物と真正細菌で構造が異なることが知られているが、古細菌の Moco についてはこれまでに報告がない。*St*GCOR の結晶構造から、モリブデン含有酵素についての新たな知見が得られることが期待される。

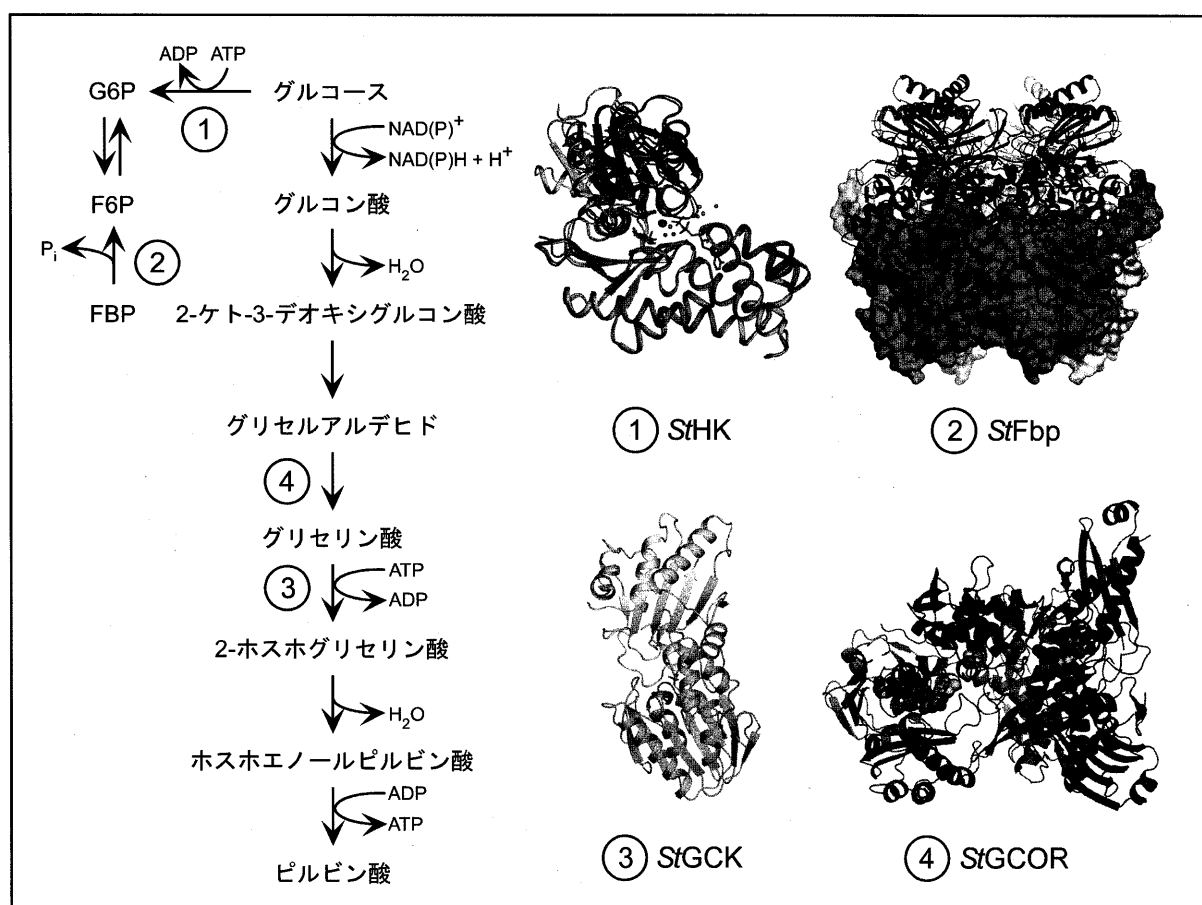


図 *S. tokodaii* の特異な糖代謝経路。①4つの状態の *St*HK 単量体構造 (重ね合わせ)。② *St*Fbp ホモ八量体構造。③ *St*GCK 単量体構造。④ *St*GCOR ヘテロ三量体構造。

参考文献

- ¹Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H., Wakagi, T. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 2014–2019
- ²Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H., Wakagi, T. (submitted)
- ³Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H., Wakagi, T. (2004) *Structure* **12**, 949–959