

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西増 弘志

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く、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。本論文では、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、想像以上の多様性と新規性を持つことが示唆された。

第1章 ヘキソキナーゼ

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。第1章では、*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 (*S*tHK) を精製し、ペプチドマスフィンガープリント法によりその遺伝子 (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 25% の配列同一性を持つことがわかった。精製した組換え *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た。

さらに、セレノメチオ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。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た。*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酵素と大きく異なり、構造比較から、*S*tHK がグルコースと GlcNAc の両方をリン酸化できる分子基盤を明らかにした。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。

第2章 フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ

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。第 2 章では、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 (StFbp) の結晶構造を 1.8 Å 分解能で決定し、StFbp は新規フォールドを持ち、ホモ八量体構造をとることを明らかにした。活性部位には FBP と 4 つの Mg^{2+} イオンが結合しており、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 StFbp 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 FBPase 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 FBP を基質として利用するのではないかと推測された。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ことが示唆された。

第 3 章 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。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。第 3 章では、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。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。グリセリンの近傍に位置する 3 つの保存された酸性残基 (Asp183、Glu297、Asp339) の変異体 (D183N、E297Q、D339N) 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ことが示唆された。

第 4 章 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。第 4 章では、*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。アミノ酸配列の相同性から、StGCOR 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た。StGCOR の結晶は 2.2 Å 分解能まで X 線を回折した。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。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ている。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。したがって、StGCOR 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。

以上、本論文は、超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* の特異な糖代謝経路を構成する 4 つの特徴的な酵素について機能解析および X 線結晶構造解析を行い、特異な糖代謝経路を原子レベルで解明したものであり、学術上ならびに応用上の価値が大きい。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学術論文として価値あるものと認めた。