

# 学位論文の要約

題目     Structural study on phosphate donor specificity of kinases  
          (リン酸化酵素におけるリン酸基供与体特異性に関する構造学的研究)

氏名     永田隆平

## 序論

リン酸化酵素は、リン酸基供与体から受容体へのリン酸基の受け渡しを担う酵素である。この酵素反応は、代謝・遺伝子発現制御・シグナル伝達などの生体内における重要な場面に関わっている。ほとんどのリン酸化酵素は ATP を供与体として用いるが、稀にピロリン酸 (PPi) を供与体とする酵素も存在する。PPi は ATP の 1/1000 以下の価格で手に入るため、このような酵素は工業的な物質生産への応用も期待できる。しかし、PPi 依存性リン酸化酵素は珍しく、同定されているのは PPi-dependent phosphofructokinase, PPi-dependent acetate kinase, PPi-dependent pyruvate phosphate dikinase の 3 種類のみである。これらの酵素が PPi を特異的に利用する仕組みは、ATP 依存性のホモログとの構造比較に基づいて調べられてきたが、PPi 結合型構造がないために詳細は不明なままである。

本研究では、ATP 依存性のイノシトールリン酸化酵素 ATP-InsK の研究を通して見出された新規 PPi 依存性酵素 PPi-InsK の立体構造に基づき、PPi 特異的認識の仕組みを解明することを目指した。本論文では、初めに ATP-InsK の基質認識機構について述べる。イノシトールリン酸化酵素は珍しく、イノシトールの認識機構やリン酸化されるヒドロキシル基の位置についての知見が乏しかったため、それらを明らかにするために構造解析を行った。次に、ATP-InsK のイノシトール認識残基を有する酵素として見つかった PPi-InsK について述べる。決定した基質複合体構造や他の酵素との構造比較から、PPi 特異的認識に関わる残基を特定した。さらに、その残基を手がかりにすることでタンパク質の一次構造データベースから新たに PPi 依存性酵素を探し出した。

## 結果

ATP-InsK にイノシトールと ATP 類似体が結合した三者複合体構造を決定した。イノシトールの 6 つのヒドロキシル基は、D12, G26, Q136, R140, D219 の 5 残基によって全て認識されていた。このうち Q136 は酵素反応に不可欠なマグネシウムイオンとも相互作用し、どちらの結合に重要なのか不明であったため、Q136 を Ala に置換した変異体の活性測定を行

った。その結果、Q136はマグネシウムイオンの結合には必須でなく、イノシトールの結合に重要であることが確かめられた。一方で、イノシトールの6つのヒドロキシル基のうち3位のヒドロキシル基が、ATP類似体の $\gamma$ リン酸や触媒残基D219と最も近いことから、リン酸化を受けると予想された。このことは、NMRやキラルカラムを用いたHPLC分析によって確かめられた。生成物の特定により、ATP-InsKの代謝中での役割が示唆された。

データベース上の未知のイノシトールリン酸化酵素を見つけるために、ATP-InsKのイノシトール認識残基を有する酵素を探したところ、この5残基を持つがATP依存的イノシトールリン酸化活性を示さない酵素が見つかった。報告されていたこの酵素の基質非結合型構造とATP-InsKの三者複合体構造を比較すると、ATP結合部位がF221, R232, M266によって塞がれていた。酵素活性を調べると、本酵素はATPやADPでなくPPiを特異的に利用してイノシトールをリン酸化することが明らかになった。次に、本酵素PPi-InsKのイノシトールとPPi類似体との三者複合体構造からPPi認識に関わる残基を調べた。しかし、基質結合部位近くのR229は側鎖がディスオーダーしており、基質認識に関わるかどうか判断できなかった。一方、PPi類似体の代わりに硫酸イオンが結合した構造では、硫酸イオンがR229側鎖と相互作用しており、R229がPPi認識に関わることが示唆された。R229をAlaに置換すると比活性が低下することから、この残基が酵素反応へ関わることも確認できた。この結果やATP-InsKとの構造比較より、PPi-InsKのPPi認識残基のうちK171, R229, R232が特徴的な残基であることが分かった。さらに、同じファミリー内の他のATPまたはADP依存性酵素には、これらの3残基は保存されていない。そこで、この3残基とATP結合部位を塞いでいた残基を合わせた5残基（R229は両方に関わる）をPPi特異的認識の鍵となる残基だと考えた。この5残基をもつ酵素を一次構造データベースから探した結果、実際にPPi依存的リン酸化活性を示す酵素が、真核生物とバクテリアから見つかった。

## 考察

本研究の成果から、様々なPPi依存性リン酸化酵素を得ることができるようになると期待される。これまでに、変異導入によるATP依存性酵素のPPi依存性への改良が試みられたが、成功した例はない。これはPPi認識機構が詳しく分かっていなかったからだと思われる。本研究で明らかにしたPPi特異的認識の鍵となる5残基を利用することで、上記のような改良も可能になると思われる。また、この5残基を目印にすることで一次構造データベースから新たにPPi依存性酵素を発見できたことは、活性を確認していない5残基を有するタンパク質の中にも同様の活性をもつものがあることを示唆する。このような酵素改良やゲノムマイニングにより様々な化合物をPPi依存的にリン酸化する酵素が得られれば、有用なリン酸化化合物の安価な合成に繋がると期待できる。