

氏名	まつ だ けい こ 松 田 敬 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2426 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	立 体 構 造 の 進 化 的 類 縁 関 係 に も と づ く 蛋 白 質 の ファ ミ リ ー 分 類

論文調査委員 (主査) 教授 西岡孝明 教授 郷 信廣 教授 泉井 桂

### 論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質のドメインは構造と機能の単位とされているが、ドメインの構造と機能との関係については不明の点が多い。構造モチーフが機能を共通とするドメインに見つかることから、これまでこのように小さな構造単位で構造と機能との関係が解析されてきた。それに対して、ドメイン立体構造のグローバルフォールドと機能との関係の解析はほとんど進んでいない。本論文は ATP 結合ドメインの立体構造と機能との関係を、微視的構造からグローバルフォールドのレベルで解析した結果をまとめたものである。本論文の成果の主要な点を以下に示す。

1. 大腸菌由来グルタチオン合成酵素の活性至適 pH7.5 トリス塩酸緩衝液中で結晶化をおこない、2.0 Å 分解能で結晶構造解析をおこなった。これまで報告されていた pH6.0 で結晶化された立体構造と比較して、至適 pH では 2 量体形成におけるヘリックス間相互作用の安定化やドメイン移動、Arg210 残基側鎖の脱溶媒和などが ATP 結合に有利に作用していると推定した。
2. グルタチオン合成酵素の ATP 結合ドメインには、それまでに知られていた ATP 結合ドメインを特徴づける構造モチーフがなかった。そこで、立体構造データベース PDB に収集されている代表的な 291 立体構造を対象に検索したところ、グルタチオン合成酵素、D-Ala : D-Ala ligase, succinyl-CoA synthetase, acetyl-CoA synthetase biotin carboxylase subunit, pyruvate orthophosphate dikinase の ATP 結合ドメインは 2 次構造要素の空間配置とトポロジーが保存されていることがわかった。さらに、触媒する酵素反応はいずれも同じ反応機構で進行することから、これら 5 つの ATP 結合ドメインは共通の祖先に由来するものと推定した。
3. これら 5 つの ATP 結合ドメインでは  $\beta$ -シートのトポロジーが保存されていたことから、ドメインの主要  $\beta$ -シートのトポロジーによって蛋白質の進化的類縁関係を表現することにした。ドメイン立体構造データベース CATH に収集されている 1,011 ドメインについて、主要  $\beta$ -シートのトポロジーを調べたところ、ストランド数 2 から 18 で構成される 424 トポロジーであった。主要  $\beta$ -シートのトポロジーが同じドメインをベータトポロジーグループと定義した。
4. これらのトポロジーの外側のストランドを 1 つあるいは 2 つ削除したトポロジーもまたドメインに見つかることが多かった。そこで、互いにこのような関係にあるベータトポロジーグループをそれぞれ kinship 1, kinship 2 ペアと定義した。このようなペアをつなぎ合わせると、1 つのネットワークを形成した。
5. ドメイン類縁関係ネットワーク上に 282 ATP あるいは GTP 結合ドメインからなる 93 ベータトポロジーグループをマップしたところ、同一スーパーファミリーに属するベータトポロジーグループは互いに kinship 3 以内で結ばれた。このことから、このネットワークはドメイン立体構造の類似性にもとづく進化的類縁関係を表現していることになる。このネットワーク上で互いに kinship 3 以内で結ばれ、6 つに分類した触媒反応カテゴリーが同じ酵素群を、superfamily を越える遠い類縁関係をあらわす fold-based evolutionary family と定義した。

## 論文審査の結果の要旨

蛋白質は機能と構造の単位であるドメインを組み替えることによって様々な機能を獲得してきたと考えられている。しかし、ドメインが機能を獲得し、進化してきた過程には不明な点が多い。ドメインの立体構造は多様であるため、その比較や類似性の定量的取り扱いが難しく、立体構造と機能との関係を明らかにするためには立体構造と生物学的機能を客観的かつ網羅的に表現して、比較する解析方法の開発が必須である。本論文は ATP を利用する酵素蛋白質を対象にしてドメイン立体構造のグローバルフォールドと機能との関係を解析する新しい方法を提案し、ドメインが機能を獲得し進化してきた過程について考察したものであり、評価される主な成果は以下のとおりである。

1. 大腸菌由来グルタチオン合成酵素の活性至適 pH7.5 における結晶構造解析をおこなった。これまで報告されていた pH6.0 における立体構造と比較して、至適 pH では 2 量体形成におけるヘリックス間相互作用の安定化とドメインの移動、Arg210 残基側鎖の脱溶媒和などが ATP 結合に有利になっていると推定した。
2. グルタチオン合成酵素, D-Ala:D-Ala ligase, succinyl-CoA synthetase, acetyl-CoA synthetase biotin carboxylase subunit, pyruvate orthophosphate dikinase の ATP 結合ドメインは互いに類似した  $\beta$ -シートのトポロジーをとり、酵素反応も同じ反応機構で進行することから、これらは共通の祖先に由来するものと推定した。
3. 多様な立体構造をとる 1,011 CATH ドメインを主要  $\beta$ -シートのトポロジーによって 424 ベータトポロジーグループに分類し、 $\beta$ -シートのトポロジーの類似性によって kinship 1, kinship 2 ペアを定義した。これらのペアを互いに結合すると、1つの大きなネットワークを形成した。
4. このネットワークに 282 個の ATP あるいは GTP 結合ドメインを含む 93 ベータトポロジーグループをマップすると、進化的類縁関係があるものは互いに近くにあった。すなわちこのネットワークは立体構造の類似性によってドメインの進化的類縁関係を表わしていることになる。
5. ネットワークは異なる類縁関係が重なりあっているが、同じ化学的機能をもつドメインは明瞭なクラスターを形成したことから、同じクラスターに属するドメインを fold-based evolutionary family と定義した。これは客観的手続きにもとづくドメインのグローバルフォールドと機能の関係であり従来の superfamily よりも遠い進化的類縁関係の定義である。

以上の成果は、部分的な機能を担う小さな構造部分が集まってドメインの立体構造を作り上げることによってドメインの機能が生み出されたというよりむしろ、ドメイン立体構造上に生物学的機能が生成し、進化の過程で保存されたことによって構造と機能との関係が生じたという考えかたを提案したものであり、蛋白質科学、酵素化学、進化学、遺伝学、細胞生化学、分類学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月21日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。