

氏名	なか 中	つ 津	とおる 亨
学位(専攻分野)	博士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 927 号		
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻		
学位論文題目	Structural Studies on Asparagine Synthetase from <i>Escherichia coli</i> K-12 (大腸菌 K-12 株由来アスパラギン合成酵素の構造学的研究)		
論文調査委員	(主 査) 教授 小田 順一	教授 林 力丸	教授 江崎 信芳

論 文 内 容 の 要 旨

アスパラギン合成酵素は、アスパラギン酸とアンモニアを用いて新たに C-N 結合を形成し、アスパラギンを合成するリガーゼの一種である。本論文は、大腸菌 K-12 株由来アスパラギン合成酵素について、X 線結晶構造解析法を用いてその三次元構造を決定するとともに、得られた構造を基に同酵素の機能、特に反応機構の詳細を明らかにすることを目的として研究した成果をまとめたものである。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章ではアスパラギン合成酵素に関する一般的な諸性質を紹介するとともに、この論文における研究の目的および意義について述べている。

第 2 章では、アスパラギン合成酵素の X 線結晶構造解析を行うために必須である酵素の結晶化に初めて成功している。すなわち野性型のアスパラギン合成酵素をタンパク質工学的な手法を用いて、システイン残基をアラニン残基に変異させることにより、結晶化に適した物性を付加するとともに、X 線結晶構造解析に適した板状単結晶を得ている。その結晶化は HEPES 緩衝液 (pH7.5) 中で硫酸アンモニウムを用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により行い、その際、良質の単結晶を得るために添加剤として生成物であるアスパラギンが必須であることを見出している。また、プレセッション写真による撮影の結果、その結晶は、単斜晶系に属し、空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a=52.9\text{\AA}$ 、 $b=126.2\text{\AA}$ 、 $c=52.8\text{\AA}$ 、 $\beta=105.3^\circ$ であるとの基本的結晶学的パラメータを決定している。

第 3 章では、第 2 章で得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を行い、アスパラギン合成酵素の三次元構造を 2.5\AA 分解能で初めて決定している。構造解析は 2 種類の重原子 [$\text{Sm}_2(\text{SO}_4)_3$, K_2PtCl_4] 誘導体結晶を使用した多重同型置換法で行っている。その結果、アスパラギン合成酵素は二量体として存在し、そのサブユニットは 11 本の α -ヘリックスと 11 本の β -ストランドから構成され、その中心部分に 8 本鎖からなる β シートが存在していることを見出している。この全体構造は酵母由来のアスパラギン酸 tRNA 合成酵素の活性ドメインと非常によく似ており、両酵素のアミノ酸配列上の相合性は検出されない

ものの、三次元構造の構造比較から、アスパラギン酸 tRNA 合成酵素の活性アミノ酸残基がアスパラギン合成酵素でも多く保存されていることを発見している。また、生成物であるアスパラギンの結合部位は β シート上に存在し、この結合位置もアスパラギン酸 tRNA 合成酵素と共通であることを見出している。これらの事実から両酵素は進化的に分岐進化の関係にあることを明らかにしている。さらに基質であるアスパラギン酸の認識機構を明らかにし、 α 位のカルボキシル基の認識には Arg255, Glu120, Lys77 からなるネットワークが、 β 位のカルボキシル基の認識には Gln116, アミノ基の認識には Asp219 と Ser251 が関与していることを明らかにしている。

第4章では、アスパラギン合成酵素と生成物である AMP およびアスパラギンとの複合体の X 線結晶構造解析を 2.2Å 分解能で行うことにより、本酵素の基質認識機構および反応の第1段階である β -アスパルチル AMP 形成の反応機構の構造学的基盤を明らかにしている。すなわち、ATP の α および γ リン酸の認識には2つのアルギニン残基 (Arg100, Arg299), β および γ リン酸の認識にはマグネシウムイオンを介して、2つの酸性残基 (Asp235, Glu248) がそれぞれ重要な役割を果たしていることを見出している。また、基質であるアスパラギン酸と ATP の結合状態から、 β -アスパルチル AMP を形成するための反応は α リン原子上のインラインメカニズムで進行し、その際、Arg100 が ATP の α リン酸の求電子性を高めるとともに、生成する反応中間体あるいは遷移状態の安定化に関与していることを推定している。

第5章では、今回の研究において明らかにされた点が、まとめて述べられている。

論文審査の結果の要旨

アスパラギン合成酵素はアスパラギン酸とアンモニアからアスパラギンを合成するリガーゼであるが、その構造と機能の関係は全く不明であった。リガーゼの ATP による基質活性化機構を理解することは、生命現象の根幹に関わる化学反応を理解する上で、格好の対象となる。本論文は大腸菌 K-12 株由来アスパラギン合成酵素の構造と機能の関係を X 線結晶構造解析法を用いて解明した研究成果をまとめたものであり、評価すべき点は次の通りである。

1. 大腸菌由来アスパラギン合成酵素のシステイン残基をアラニン残基に遺伝子工学的に変異させた変異体酵素を作製し、これを使用することにより、初めてアスパラギン合成酵素の結晶化に成功した。そして得られた結晶を用いてプレセッション写真を撮影することにより、X 線結晶構造解析を行うにあたって必須となる結晶学的パラメータを決定した。

2. この結晶を用いて白金およびサマリウムを用いた2種の重原子誘導体結晶を調製し、重原子多重同型置換法を用いて、アスパラギン合成酵素の X 線結晶構造解析を行い、三次元構造を決定した。そのサブユニット構造は、11本の α -ストランドから構成され、その中心部分に1つの β シート構造が存在していることを明らかにした。この構造は、酵母由来のアスパラギン酸 tRNA 合成酵素の活性ドメインと非常によく似ており、両酵素はアミノ酸配列上の相同性は全くないにもかかわらず、三次元構造の比較から活性アミノ酸残基の多くが両酵素間で保存されていることが見出された。両酵素は基質特異性が全く異なるものの、ATP による基質の活性化については共通の化学反応機構で進行しており、この結果は、両

酵素が共通の祖先から三次元構造を保ちつつ、分岐的に進化してきたことを示唆する重要な証拠といえる。

3. 生成物すなわち AMP およびアスパラギンと酵素との複合体結晶の X 線結晶構造解析から、AMP およびアスパラギンの結合部位は β シートの上に存在することが見出された。従って、アスパラギン合成酵素の活性部位はアスパラギン酸 tRNA 合成酵素と同じ位置であることが実証された。このことから、基質であるアスパラギン酸および ATP の基質認識機構の推定が可能となり、その基質認識に重要な残基の多くが両酵素間で保存されていることが立体構造から確かめられた。そしてアスパラギン合成酵素の活性部位に存在する Arg100 が ATP の α 位のリン酸部分と結合することにより、その部分の求電子性を高め、アスパラギン酸の β -カルボキシル基の求核攻撃によって生じる反応中間体あるいは遷移状態を安定化させることにより、反応加速に関与していることを提示した。

以上のように、本論文は大腸菌 K-12 株由来アスパラギン合成酵素の構造-機能相関の解明において、酵素の活性部位の構造を原子レベルで明確にし、反応機構および酵素の基質認識機構を新規に提示し、さらに酵素の構造構築原理並びに分子進化の過程を明らかにするための重要な知見も提供しており、酵素化学、構造生物学、分子進化学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 9 年 2 月 17 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。