

|           |                                                                                                                            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | ますの なかにし つぐみ<br>増 野 (中 西) 亜 実                                                                                              |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                  |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1457 号                                                                                                               |
| 学位授与の日付   | 平 成 17 年 1 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 応 用 生 命 科 学 専 攻                                                                                                  |
| 学位論文題目    | X-Ray Crystallographic Studies on Pyruvate Phosphate Dikinase<br>from Maize<br>(トウモロコシ由来ピルビン酸リン酸ジキナーゼの X 線結晶構造解析)<br>(主 査) |
| 論文調査委員    | 教 授 坂 田 完 三    教 授 江 崎 信 芳    教 授 廣 瀬 正 明                                                                                  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) は ATP, ピルビン酸, リン酸の 3 分子から AMP, ホスホエノールピルビン酸 (PEP), ピロリン酸 (PPi) の 3 分子への変換反応を可逆的に触媒する酵素である。この反応は, 活性残基であるヒスチジン (His) がリン酸化およびピロリン酸化された中間体を経由して行われる。

これまでに細菌 (*Clostridium symbiosum*) や原虫 (*Trypanosoma brucei*) 由来 PPDK の X 線結晶構造解析がなされ, PPDK が 3 つのドメインで構成されていることが明らかになっている。ATP/AMP 結合部位は N 末端ドメインに, ピルビン酸/PEP 結合部位は C 末端ドメインに, 活性残基 His は中央ドメインに, それぞれ存在すると予想されている。ところが, その ATP/AMP とピルビン酸/PEP 結合部位が 45Å 以上離れていることから, 中央ドメインの活性 His 残基を介してリン酸を転移するためには, 中央ドメインが N 末端, C 末端ドメイン間を振り子のように大きく旋回するという説が唱えられている。しかし, X 線結晶構造解析の結果では, 細菌および原虫由来 PPDK の中央ドメインはどちらも N 末端ドメインに近い位置で静止しており, 中央ドメインが C 末端側に近づくという構造的な証拠はない。

本論文では, トウモロコシ PPDK の X 線結晶構造解析を行うことにより中央ドメイン旋回機構の解明を行った。また, PEP 複合体の結晶構造解析を行い, PEP 結合部位の構造を決定するとともに, PEP 結合に伴う全体構造および残基レベルでの変化を明らかにしたものであり, その内容は以下のようにまとめられる。

- 1) トウモロコシの葉から抽出された PPDK は, 一部リン酸化され不均一な状態であるため, 結晶化には適当でないことが判明していた。そこでまず, 大腸菌 JM109 を用いた大量発現系を構築した。次に, 菌体抽出液に対して硫酸塩析を行った後, 2 段階のクロマトグラフィーによる精製を行った。その結果, 菌体タンパク質の 10 % 以上もの収率で, SDS-PAGE で単一バンドを示す精製標品を得た。
- 2) 結晶化は, ハンギングドロップ蒸気拡散法で行い, 12-13% ポリエチレングリコール (PEG)8000 を沈殿剤とした MES 緩衝溶液 (pH 6.5) を用いることで板状の単結晶を得ることができた。初期的結晶学データから, 本結晶は単斜晶系に属し, 空間群は C2, 格子定数は  $a=108\text{\AA}$ ,  $b=100\text{\AA}$ ,  $c=108\text{\AA}$ ,  $\beta=97^\circ$  であることが分かった。また, 分解能は  $2.3\text{\AA}$  以上あり, アミノ酸側鎖を含めた詳細な立体構造決定が可能であることが判明した。
- 3) 得られたトウモロコシ PPDK の結晶の構造決定を行うために, 大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44B2 または BL45XU-PX を用いて X 線回折データの収集を行った。初期位相の決定には, 細菌 PPDK の構造をサーチモデルとした分子置換法を用いた。精密化の結果, PPDK 酵素のみの構造 (native 構造) については,  $2.3\text{\AA}$  分解能において  $R\text{-factor}=20.9\%$ ,  $R_{\text{free}}\text{-factor}=23.7\%$  で構造決定することができた。トウモロコシ PPDK も, 細菌 PPDK や原虫 PPDK と同様に 3 つのドメインで構成されていた。トウモロコシ PPDK と細菌 PPDK を比較したところ, 中央ドメイン内部に構造変化はなかった。また, リン酸化を受ける活性 His 残基の位置を比較すると, 細菌由来 PPDK では ATP 結合部位と予測されている領域付近にあるのに対して, トウモロコシ由来 PPDK ではその反対側となるピ

ルビン酸結合部位と予測されている領域付近にあった。このことは、中央ドメインの動きは、単純な並進ではなく回転動作を伴うことを示している。これらのことから、今回の構造解析により、中央ドメインが離れた2つのドメインの間を行き来するということが初めて構造学的に実証された。

- 4) 生成物である PEP の結合部位を明らかにするため、PEP 複合体結晶の構造解析を行った。PEP 複合体の構造は native 構造をサーチモデルとして分子置換法を用いて行い、2.3Å 分解能において  $R$ -factor=23.0%,  $R_{\text{free}}$ -factor=25.9% で決定した。その結果、PEP とともに反応に必須である Mg イオンの結合部位が判明した。PEP 結合部位はこれまで予想されていた部位とほぼ一致していた。結合している PEP の反応点の近傍には Cys836 の SH 基がある。この残基は、ピルビン酸のリン酸化に際して、ケト・エノール異性化を行うために必要な残基であることが予測されていたが、今回の解析により構造的にも裏付けられた。
- 5) トウモロコシ PPK 1 の native 構造と PEP 複合体構造におけるドメインの相対位置の比較から、中央ドメインの位置が異なっていることが分かった。残基レベルで変化した部分を探索したところ、上で述べた Cys836 付近の主鎖を含めた大きな構造変化、その周辺の水素結合の架け替え、さらには中央ドメイン付近の残基の相互作用の変化が見られた。PEP 結合に伴うこれら一連の変化は、PEP の結合が、結合部位からは遠く離れた中央ドメインの動きを誘引することを示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

トウモロコシ由来 PPK 1 を大腸菌で発現させ、精製系を確立した。その精製酵素を用いて結晶化に成功し、X 線結晶構造解析により三次元構造モデルを構築した。トウモロコシ PPK 1 と細菌 PPK 1 との構造比較から、中央ドメインの位置が異なっているが、中央ドメイン内部には構造変化がないことが分かった。これらの結果は、ドメインが一つの固まりとして回転することを示している。また、基質複合体結晶の構造解析にも成功し、基質結合部位を決定した。さらに、トウモロコシ PPK 1 において酵素のみの結晶構造と基質を共存させた結晶構造との比較から、基質結合と中央ドメインの動きを関連付ける結果が得られた。

したがって、本研究はマルチドメイン型酵素のメカニズムの新たな展開を示したものであり、評価される主な点は以下の通りである。

- 1) トウモロコシ PPK 1 は、植物体（葉）からの精製法は確立していたが、細胞内で翻訳後不均一にリン酸化修飾をうけるため、結晶化には向かなかった。そこで、トウモロコシ PPK 1 の cDNA を大腸菌に組み込み、大量に発現させ、結晶化に適した安定な精製酵素を得る系を確立した。
- 2) 広範囲に及ぶ結晶化条件を探索した結果、トウモロコシ PPK 1 の単結晶を得ることに成功した。
- 3) 大型放射光施設 SPring-8 のビームラインを用いて X 線回折データを収集し、2.3Å 分解能において全体構造を構築した。これは、植物由来 PPK 1 として初めて得られた構造である。
- 4) トウモロコシ PPK 1 と細菌 PPK 1 の構造比較から、それぞれの中央ドメインの位置を解析したところ、回転操作によりお互いに重なる位置関係にあることが分かった。今回得られた構造により中央ドメインが回転するということを初めて構造学的に示すことができた。
- 5) これまで細菌 PPK 1 では、生成物（PEP）アナログであるホスホピルビン酸との共結晶が得られていたが、本研究では基質である PEP との共結晶の構造解析に成功した。この構造から、基質結合部位を決定でき、これまで予測されていた周辺残基との反応機構も構造学的に実証することができた。
- 6) トウモロコシ PPK 1 において PEP 有無の全体構造比較から、基質結合が中央ドメインの動きに関与することが示唆された。

以上のように、本論文は PPK 1 の反応においてドメインが回転することを構造学的に証明し、基質結合部位も決定した。また、基質有無の構造比較により、基質結合がドメインの回転に寄与することを示した点で、構造生物学、酵素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16年12月9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。