

氏 名	むか 井 たか こ 向 井 貴 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1469 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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 食 品 生 物 学 専 攻
学位論文題目	X-ray Crystallographic Studies on Structure and Evolution of Inorganic Polyphosphate/ATP-glucomannokinase in <i>Arthrobacter</i> sp. Strain KM (<i>Arthrobacter</i> 属細菌 KM 株由来ポリリン酸/ATP-グルコマンノキナーゼ の構造と進化に関する X 線結晶構造学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 清 水 昌 教 授 井 上 國 世

論 文 内 容 の 要 旨

ポリリン酸は、オルトリン酸が縮重合した高エネルギーリン酸化合物であり、殆ど全ての生物に普遍的に存在する。生体内では、ATP を基質としてポリリン酸キナーゼ (PPK) により合成される。一方、ポリリン酸は、火山や原始地球を想定した環境条件下で容易に生成し、且つ、リン酸エステル結合当たりのエネルギーが ATP と等価であるため、ATP 出現以前の生化学的エネルギー担体であった可能性が指摘されている。実際、現存生物の多くは ATP 特異的キナーゼを有するが、ある種の細菌には、ATP の代わりにポリリン酸をリン酸供与体として利用するポリリン酸依存キナーゼ系が発達しており、ポリリン酸のみを利用する「ポリリン酸特異的キナーゼ」、およびポリリン酸と ATP の両方を利用する「ポリリン酸/ATP-キナーゼ」が存在する。

このようなポリリン酸依存キナーゼの存在は、ポリリン酸から ATP への生化学的エネルギー担体の化学進化に伴い、ポリリン酸特異的キナーゼ (原始酵素) から、ポリリン酸/ATP-キナーゼ (中間酵素) を経て、ATP 特異的キナーゼ (現存酵素) へと分子進化した可能性を示唆する。既に、多くの ATP 特異的キナーゼの立体構造が決定され、ATP 利用機構の解明が進展している。しかし、ポリリン酸依存キナーゼの立体構造は決定されていないため、かかるキナーゼの分子進化に関する知見は元より、そのポリリン酸利用機構やエネルギー代謝への関与についての詳細も得られていない。

本研究では、ポリリン酸のエネルギー代謝との関連、ポリリン酸依存キナーゼのポリリン酸利用機構、並びに ATP 特異的キナーゼとポリリン酸依存キナーゼの進化的・構造的相関の理解を目的として、ポリリン酸依存酵素を有する微生物の取得 (*Arthrobacter* 属細菌 KM 株)、KM 株由来新規ポリリン酸/ATP-グルコマンノキナーゼ (GMK) と他のグルコースリン酸化酵素 (GK, グルコキナーゼ; HK, ヘキソキナーゼ) との進化学的相関の解析、および GMK の X 線結晶構造解析を行った。

第1章では、ポリリン酸依存酵素を有する微生物の単離・同定を行った。土壌より高濃度リン酸耐性を指標に分離された微生物は、非運動性、非孢子形成性のグラム陽性不規則桿菌であり、形態学的・生化学的性状、16S RNA 部分塩基配列、細胞壁アミノ酸組成、および菌体の主要脂肪酸組成の解析結果から、*Arthrobacter* 属細菌と同定された。本菌を *Arthrobacter* 属細菌 KM 株と命名した。また、KM 株の細胞抽出液に、PPK、ポリリン酸フォスファターゼ、ポリリン酸依存 NAD キナーゼ、ポリリン酸依存グルコキナーゼなど既知のポリリン酸依存酵素に加えて、新たにポリリン酸依存フルクトキナーゼと GMK 活性を見出した。KM 株の PPK 遺伝子も同定した。PPK の存在は、KM 株細胞において、実際にポリリン酸が生合成され、上記のポリリン酸関連酵素が稼働していることを示唆した。

第2章では、KM 株より精製した新規酵素 GMK の酵素学的諸性質、並びに一次構造を決定した。さらに、一次構造に基づいて、GMK, GK, および HK の進化系統解析を行った。GMK は、分子質量 30kDa の単量体酵素であり、ポリリン酸と ATP の両方をリン酸供与体として、グルコースとマンノースのリン酸化反応を触媒した。至適 pH は 7.5, 至適温度

は 40-45°C であった。また、non-processive 機構（一反応毎にポリリン酸への結合・解離を繰り返す作用様式）でポリリン酸を利用した。速度論的解析（Competition plot）の結果、GMK のポリリン酸および ATP 利用部位が共有されていることが示唆された。また、一次構造を用いた進化系統解析の結果、GMK がグラム陽性細菌型 GK に属することを明らかにした。真核細胞型 HK、グラム陽性細菌型 GK、およびグラム陰性細菌型 GK は、共にグルコースリン酸化反応を触媒するが一部のモチーフを除けば、一次構造上の相同性は低く、系統樹上でも三グループに分類された。このうち、真核細胞型 HK の立体構造のみが決定されており、原核細胞型 GK（グラム陽性細菌型およびグラム陰性細菌型 GK）の立体構造は明らかにされていない。真核細胞型 HK が ATP 特異的キナーゼであるため、GMK の立体構造決定、並びに真核細胞型 HK との比較により、ATP 特異的キナーゼとポリリン酸依存キナーゼ、並びに真核細胞型 HK と原核細胞型 GK の構造的・進化的相関に関する知見が得られると考えられた。

第 3 章では、GMK の X 線結晶構造を決定した。1.8Å までの X 線回折データを用いて精密化した GMK の最終モデル（ $R=19.1\%$ ）は、506 個のアミノ酸残基と 373 個の水分子、2 分子のグルコース、および 4 分子のリン酸を含んでいた。GMK は、 $\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造を基本骨格として持つ二つのドメイン（N ドメインと C ドメイン）から成り、ドメイン間のクレフトに 1 分子のグルコースと 2 分子のリン酸が結合していた。GMK の両ドメインは、一次、二次、および三次構造において極めて高い相同性を示した。以上の結果に基づき、GMK が一つのドメインに対応する遺伝子の重複・融合によって形成された可能性を示唆した。また、GMK（原核細胞型 GK）と真核細胞型 HK（ヒト由来 HK-I の触媒活性を担う C 末端側半分子）の立体構造の比較に基づき、両者が一次、二次、三次、およびグルコース結合部位の微細構造において高い類似性を示すことを明らかにした。さらに、GMK のポリリン酸結合部位を推定し、原核細胞型 GK と真核細胞型 HK が GMK 様の構造を示すポリリン酸依存タンパク質から分岐進化した証拠も示した。

論文審査の結果の要旨

ポリリン酸は、オルトリン酸が縮重合した高エネルギーリン酸化合物であり、火山や原始地球を想定した環境条件下で容易に生成し、且つ、リン酸エステル結合当たりのエネルギーが ATP と等価であるため、ATP 出現以前の生化学的エネルギー担体であった可能性が指摘されている。現存生物の多くは ATP 特異的キナーゼを有するが、ある種の細菌には、ポリリン酸をリン酸供与体として利用するポリリン酸依存キナーゼ系が発達している。既に、多くの ATP 特異的キナーゼの立体構造が決定され、ATP 利用機構の解明が進展している。しかし、ポリリン酸依存キナーゼの高次構造に関する研究は遅れている。

本研究は、ポリリン酸のエネルギー代謝との関連、ポリリン酸依存キナーゼのポリリン酸利用機構、並びに ATP 特異的キナーゼとポリリン酸依存キナーゼの進化的・構造的相関の理解を目的として、ポリリン酸依存酵素を有する微生物の取得（*Arthrobacter* 属細菌 KM 株）、KM 株由来新規ポリリン酸/ATP-グルコマンノキナーゼ（GMK: ポリリン酸と ATP の両方をリン酸供与体としてグルコースとマンノースをリン酸化する）と他のグルコースリン酸化酵素（GK, グルコキナーゼ; HK, ヘキソキナーゼ）との進化的相関の解析、および GMK の X 線結晶構造解析を行ったものである。評価すべき点は、以下の通りである。

1. 多様なポリリン酸依存酵素を有する *Arthrobacter* 属細菌 KM 株を単離・同定し、本菌がポリリン酸依存酵素の分子生物学的、構造生物学的、並びに進化生物学的解析に好適な微生物であることを明らかにした。
2. KM 株から精製した新規酵素 GMK の酵素学的性状、および一次構造を決定し、GMK がグラム陽性細菌型 GK（原核細胞型 GK）に属することを明らかにした。
3. GMK の X 線結晶構造を決定し、本酵素が $\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造を基本骨格として持つ相同性の高い二つのドメイン（N ドメインと C ドメイン）から構成されていることを明らかにした。また、GMK が一つのドメインに対応する遺伝子の重複・融合によって形成された可能性を示した。
4. GMK（原核細胞型 GK）と真核細胞型 HK（ヒト由来 HK-I の触媒活性を担う C 末端側半分子）の立体構造の比較から、両者が一次、二次、三次、およびグルコース結合部位の微細構造において高い類似性を有することを初めて明らかにした。

5. GMK のポリリン酸結合部位を推定し、そのポリリン酸結合部位が真核細胞型 HK, 原核細胞型 GK, および特定の ATP 特異的タンパク質（アクチン, ヒートショックプロテイン, アセテートキナーゼなど）に広く保存されている phosphate-1 モチーフに存在することを明らかにした。

6. 原核細胞型 GK と真核細胞型 HK が, GMK 様の構造を示すポリリン酸依存タンパク質から分岐進化した可能性を示した。

以上のように, 本論文は, 細菌の新規ポリリン酸依存キナーゼ GMK の酵素科学的・構造生物学的・進化生物学的特性を明らかにすることによって, 生化学的エネルギー担体の進化とそれに連動した酵素と遺伝子の進化, 並びにポリリン酸依存キナーゼと ATP 特異的キナーゼの構造・機能相関, およびポリリン酸利用機構に関して多くの新しい知見を与えた。特に, 原核細胞型 GK と真核細胞型 HK の立体構造的類似性を初めて証明し, 両酵素の進化的相関に関する明確な結論を導いた。これらの結果は, 応用微生物学, 酵素科学, 構造生物学, および進化生物学の発展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17年1月14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。