

氏 名	たか はし て ら だ あき こ 高 橋 (寺 田) 彰 子
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 46 号
学位授与の日付	平 成 17 年 5 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	トウモロコシ C ₄ 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の立体構造情報に基づく部位特異的変異導入による PEPC 活性発現と活性化機構の研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 泉 井 桂 教 授 山 本 憲 二 教 授 竹 安 邦 夫

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC; EC 4.1.1.31) は C₄ 光合成の初期炭酸固定に関わる重要な酵素である。近年、著者の所属する研究グループは大腸菌 PEPC (EcPEPC) とトウモロコシ C₄ 型 PEPC (ZmPEPC) の X 線結晶構造解析に世界で初めて成功した。本研究では、立体構造情報に基づいて PEPC の活性発現と活性調節機構の解明を目標として、酵素への部位特異的変異導入による解析を行った。

(1) 植物 PEPC におけるフレキシブルループ (ループ II) の触媒機能における役割——両酵素に共通して、触媒部位近傍には塩基性残基に富むフレキシブルループが存在する (ループ II; EcPEPC の ⁷⁰¹AKRRPTGG⁷⁰⁸, ZmPEPC の ⁷⁶¹AKRRPGGGI⁷⁶⁹)。一般に触媒部位を覆うループ構造は活性発現に重要であることが多いが、実際、著者らの研究室での先行実験では EcPEPC のループ II が基質である HCO₃⁻ の結合に関与していることが示唆され、この構造に塩基性残基を増やすことで触媒活性を増強できることが示されている。しかし、細菌の PEPC と高等植物 PEPC のループが同一機能を持つかどうかは不明であった。本研究では、ZmPEPC のループ II への種々の部位特異的変異導入の結果、ループ II は両酵素に共通して、HCO₃⁻ の結合ならびに反応中間体の溶媒による加水分解からの保護などの役割を持つことを明らかにした。しかし ZmPEPC では EcPEPC のような塩基性アミノ酸残基の導入による触媒機能の向上は認められなかった。ZmPEPC では HCO₃⁻ の K_m 値が EcPEPC の 1/5 とすでに低く、HCO₃⁻ に対する親和性が向上しなかったのは、高等植物 PEPC ではループ II に加えて他の部分も HCO₃⁻ の結合に重要な寄与をしているためではないかと推測した。

(2) アロステリック活性化因子であるグルコース 6-リン酸 (Glc-6-P) の結合部位の同定——結晶化した ZmPEPC にはサブユニット当たり 1 分子の硫酸イオン (SO₄²⁻) が結合し、その結合部位はサブユニット同士の接触面に存在していた。解明された ZmPEPC の立体構造は活性化状態の構造と推測され、SO₄²⁻ は本来リン酸基が結合する部位に擬似的に結合することから、この部位が Glc-6-P の結合部位ではないかと考えた。SO₄²⁻ 結合部位周辺の 4 つの塩基性残基 (アルギニン残基) (Arg183, Arg184, Arg231 および隣接サブユニット由来の Arg372) をそれぞれ中性残基のグルタミン (Gln) と置換した変異型酵素は Glc-6-P に対する感受性を低下または喪失した。このとき、単子葉 PEPC のアロステリック活性化因子であるグリシン (Gly) に対する感受性は残っていた。これらのことから SO₄²⁻ 結合部位が Glc-6-P の結合部位であり、Gly 結合部位とは独立に存在することを示した。立体構造情報と本研究による知見に基づき、Arg183 と Arg231 は Glc-6-P のリン酸基と結合しうる残基であり、サブユニット内のアロステリックな構造変化を伝達する役割を持つと推測し、一方、Arg184 と Arg372 は Glc-6-P の六炭糖と結合しうる残基であり、サブユニット間の構造変化を伝達する役割を持つと推測した。またこれらの変異型酵素を *F. trinervia* 由来の PEPC kinase でリン酸化したところ、すべての変異型酵素は野生型酵素と同等にリン酸化されるにもかかわらず、リン酸化によるリンゴ酸阻害感受性の低下などリン酸化に伴う活性調節能が喪失していることを見出した。

論文審査の結果の要旨

本論文において、著者は PEPC における活性発現機構と活性調節機構の解明を目的として、二つの側面から研究を行った。

(1) 細菌と植物の PEPC に共通して存在する触媒部位近傍のフレキシブルループ構造（ループⅡ）に着目し、トウモロコシ PEPC のループⅡへの系統的な部位特異的変異導入による機能解析を行った。植物 PEPC の HCO_3^- に対する K_m 値は非常に小さく、これを測定するには空気からの CO_2 の混入を避けるための特別の注意を要するが、著者はよくこの比較的難しい実験を達成している。得られた実験結果を、大腸菌 PEPC についての先行実験結果と比較し、このループⅡの塩基性クラスターとグリシンクラスターがバクテリアと植物 PEPC とで共通した役割を担っていることを明らかにした。その一方で、プロリン領域は異なる役割を担っていることを示唆する知見を得ている。触媒部位近傍のフレキシブルループはエノラーゼをはじめとして様々な酵素で存在していることが報告されており、その機能解析が進められているが、本研究のようにクラスター毎の詳細な部位特異的変異導入による解析や、種間での機能の共通性および相違性を調べた研究は非常に稀であり、重要かつ意義のある知見である。

(2) 活性型として立体構造が明らかとなったトウモロコシ PEPC の硫酸イオン結合部位に着目し、この部位が PEPC のアロステリック活性化因子である Glc-6-P の結合部位であると推定した。実際に近傍の 4 つの Arg を部位特異的変異導入によりそれぞれ Gln に置換した変異酵素を作製し、詳細な機能解析をおこなうことで、 SO_4^{2-} 結合部位が Glc-6-P の結合部位であることを明らかにした。これまで、Glc-6-P の結合部位は全く未知であったので、この知見は PEPC の構造と機能の研究において非常に大きな発見であるといえる。近年明らかとなったアロステリック阻害因子結合部位との位置関係が明確になったことにより、PEPC のアロステリック活性化機構とフィードバック阻害機構の相関関係を明らかにするための手がかりが得られた。これによって、将来 PEPC が複数個のアロステリック調節因子をもつ重要なモデル酵素として更に注目されることになるであろう。また、著者はリン酸化による活性調節機構がアロステリック活性化機構と相関関係があることを発見した。従来 PEPC においてはリン酸化による活性化とアロステリック活性化は全く互いに異なる分子機構によるのではないかと考えられていたため、この発見は注目に値する。リン酸化による活性調節機構が進化の過程でどのようにして獲得されてきたかを今後明らかにしていく上で大変示唆に富む知見であるといえる。

以上のように本研究は C_4 光合成における初期炭酸固定酵素 PEPC の活性発現と活性調節の機構を解明する上で基礎的かつ重要な知見となるものであり、生化学、植物生理学などに寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成17年3月8日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。