

氏 名	あお 青 柳 周
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1007 号
学位授与の日付	平成 10 年 5 月 25 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	グルタチオン合成酵素の時間分割X線結晶構造解析に関する研究 (Time-resolved X-ray Crystallographic Studies on Glutathione Synthetase) (主査)
論文調査委員	教 授 江 崎 信 芳 教 授 林 力 丸 教 授 池 田 篤 治

論 文 内 容 の 要 旨

シンクロトロン放射光を利用した白色X線ラウエ法の実用化により、反応に伴う酵素の三次元構造の変化を連続的に捉える方法、いわゆる時間分割X線結晶構造解析法が可能となった。この手法は、これまで捉えることのできなかった反応途中の酵素の三次元構造の時間変化を連続的に見ることであり、新しい手段として期待されている。本論文は、大腸菌B株由来グルタチオン合成酵素 (GSHase) の遷移状態アナログ阻害剤 (TSA) へのリン酸化反応に時間分割X線結晶解析法を適用することを目指し、結晶中での反応の制御が可能な系を構築するとともに、実際に構築した系の時間分割解析を行った研究成果をまとめたものである。

第1章では、時間分割X線結晶解析の概念や歴史的な位置付けおよびその問題点などについて、これまでの報告例を分析し明確にしている。また、GSHaseの構造と機能上の特徴をこれまでの研究例から述べ、今回なぜGSHaseの反応を時間分割X線結晶解析の対象としたかを説明し、本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、結晶中での反応の制御が可能な系を構築した結果について述べている。時間分割解析を行うためには結晶中での反応を同調させる必要がある。そのために、光で分解する保護基でATPを修飾したcaged-ATPに着目し、沈殿剤として硫酸リチウムを用いることによってGSHase : TSA : caged-ATP複合体の良質の結晶を得ることに成功している。次に、フラッシュホトリシス法で、結晶中のcaged-ATPを完全に光分解して、反応を同調して進行させることに成功している。さらに、結晶中のATPとADPを高速液体クロマトグラフィーによって定量する系を構築して、ATP分解の半減期を算出し、それによりTSAのリン酸化反応速度を推定している。その結果、結晶中のリン酸化反応の速度は溶液中のそれに比べて100分の1程度まで低下していること、結晶の冷却によって解析に十分な程度まで時間分解能を向上できることを明らかにしている。

第3章では、GSHase : TSA : caged-ATP複合体結晶の反応開始前と光を照射して反応を終了した後のX線結晶構造解析を2.2Åの分解能で行ない、リン酸化反応前後の酵素の活性中心付近の構造変化を明らかにしている。そして、caged-ATPは保護基の部分が大きな立体障害となるにもかかわらず、酵素の活性中心に予めTSAとともに結合していること、またその際、Gly164からGly167にかけてのグリシン残基に富んだ柔軟な小ループ部分の構造が大きく開いて、caged-ATPの保護基の部分を収容していることを明らかにしている。また、光照射で保護基が外れてATPが放出されると、結晶中でも溶液中と同じように、酵素の作用によってTSAへのリン酸転移が起こり、リン酸化されたTSAとADPが酵素に結合した状態で反応が終了することを明らかにしている。さらに、反応の前後で、活性中心付近の小ループ部分の構造に大きな変化が見られ、リン酸化が終わった後には小ループ上のGly166とGly167がリン酸部分を認識して、ADPとリン酸化されたTSAを安定化していることを明らかにしている。

第4章では、GSHase : TSA : caged-ATP複合体結晶のリン酸化反応途中の状態について、シンクロトロン放射光を使ったラウエ法による時間分割解析を行ない、得られた電子密度からリン酸化反応機構について考察している。まず、リン酸化

反応前と反応終了後の状態の同複合体結晶が、良好なラウエ回折像を与えることを明らかにしている。そして、実際にリン酸化反応途中の状態をラウエ法によって解析し、反応開始直後にはリン酸化されていないTSAが、時間の経過とともにリン酸化を受け、小ループと2つの Mg^{2+} イオンの構造がそれに伴い固定されていく様子を電子密度の変化として捉えることに成功している。また、反応開始直後にはATPの γ -リン酸基の電子密度は不明瞭であることも明らかにしている。この結果と、第2章の反応速度解析、第3章の結晶構造解析の結果を合わせ、反応開始直後では、酵素に結合しているATPの γ -リン酸基と Mg^{2+} イオンは固定されず、小ループも柔軟性の高い構造をとっていると推定している。そして、時間の進行に伴って、 Mg^{2+} イオンは核酸のリン酸部分と静電相互作用をするようになり、小ループではループ上のGly残基が核酸のリン酸部分およびArg233との間で静電相互作用をするようになる。その結果として、ATPのリン酸部分の配向性が決定すると推定している。すなわち、この小ループと Mg^{2+} イオンの構造変化により、ATPの γ -リン酸がTSAへ転移しやすいin-lineの空間配置を形成することが、リン酸転移反応の加速に重要であり、その配置が形成された途端に、リン酸転移反応が起こることを明らかにしている。

第5章では、今回の研究において解明された点をまとめて述べている。

論文審査の結果の要旨

酵素の機能発現のメカニズムを構造的な基盤から捉える手段として、X線結晶解析法は最も有力な手法であるが、測定対象は酵素が静止した状態に限られてきた。しかし、近年、酵素が動いている状態を見ることの重要性が指摘されるようになり、反応途中の酵素の構造変化を連続的に捉えることが可能な新しい手法として、時間分割ラウエ法が注目されるようになった。

本論文は、大腸菌B株由来GSHaseによるTSAのリン酸化反応を時間分割ラウエ法を用いて解析するため、時間分割解析に適した反応系の構築および実際に時間分割解析を行った研究成果を取りまとめたものであり、評価すべき点は次の通りである。

1. 時間分割解析に向けて、結晶中での反応制御が可能な系を構築することに成功し、基質ATPの代わりにcaged-ATP、さらにTSAを用いて、反応が単一回転で終了することが可能な系を設計している。時間分割解析にとって重要な結晶中での反応の同調は、フラッシュホトリシス法でcaged-ATPを光分解することで達成している。さらに、結晶中の反応速度の掌握、結晶の温度調整による時間分解能の向上といった問題を解決し、この系が時間分割解析に適していることを明らかにしている。

2. リン酸転移反応に伴う、酵素の活性部位構造の原子レベルにおける構造変化を解明するために、GSHase : TSA : caged-ATP複合体結晶のリン酸化反応の前と終了後の静的なX線結晶解析を行い、結晶中でも溶液中と同じようにリン酸化反応が起きることを確認している。さらに、リン酸化反応前と終了後の活性部位の構造変化を追跡して、反応の前後で、活性部位に存在するグリシン残基に富んだ柔軟な小ループ、 Mg^{2+} イオンおよび核酸のリン酸部分を認識しているアミノ酸残基の構造が変化することを見出ししている。特に、この小ループと Mg^{2+} イオンは、リン酸転移終了後の構造を安定化しているだけでなく、リン酸転移反応に重要な役割を果たしていることを解明している。

3. ラウエ法による動的な酵素反応の解析を行い、リン酸転移反応が始まろうとしている状態では、その活性中心が秩序だった安定な構造をとらず、リン酸転移は起こらないことを示している。そして、小ループ構造と Mg^{2+} イオンが、時間の経過とともに一定の構造に安定化するにつれ、ATPの γ -リン酸の空間配置が決定され、 γ -リン酸がin-lineの配置になる時に、リン酸転移反応が起きることを明らかにしている。これまで、別の酵素：基質複合体の結晶解析から、小ループは、リン酸化反応途中だけではなく反応終了後もリン酸部分を安定化していることが予想されていたが、この研究により、その一連の構造変化を初めて原子レベルで連続的に捉えることに成功している。

以上のように、本論文は、大腸菌B株由来GSHaseの反応に、時間分割ラウエ法を適用して、その解析に成功した少ない例であり、リン酸化反応に伴う構造変化を原子レベルで明らかにするとともに、本反応における小ループの機能に関する重要な知見を新規に提示しており、酵素化学、構造生物学およびタンパク質工学の分野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10年4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。