

氏 名	にし 谷 優 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3280 号
学位授与の日付	平 成 20 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Structural studies of <i>N</i> -acetylglucosamine-phosphate mutase, a member of the α -D-phosphohexomutase superfamily (α -D-六炭糖リン酸基転位酵素スーパーファミリーに属する <i>N</i> -アセチルグルコサミンリン酸基転位酵素の構造研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 杉 山 弘 教 授 藤 井 紀 子

論 文 内 容 の 要 旨

UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) は UDP 糖の一種であり、解糖系中間生成物である Fructose 6-phosphate を起点に合成される。UDP-GlcNAc は生物に必要不可欠な代謝産物であり、真菌の細胞壁合成や真核生物の糖タンパク質合成における前駆体となる。*N*-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1) は UDP-GlcNAc の合成過程において必要なリン酸基の転位反応を触媒する酵素であり、*N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc-6-P) を *N*-acetylglucosamine 1-phosphate (GlcNAc-1-P) へと変換する。AGM1 の活性を抑制すると UDP-GlcNAc が合成されなくなり、それを前駆体とする細胞壁も合成されないため、真菌は死滅する。したがって、病原性真菌由来の AGM1 阻害剤は、細胞壁合成阻害を利用した新しいタイプの抗真菌剤候補になると期待されている。本研究では、AGM1 の基質認識機構ならびに反応機構を明らかにするため、また、生物種による本酵素の構造上ならびに基質認識機構の差異に基づいて選択的な阻害機構の詳細を議論するため、病原性真菌カンジダ由来 AGM1 (CaAGM1) ならびにヒト由来 AGM1 (HsAGM1) の立体構造情報を X 線結晶構造解析によって得ることを目的とした。

大腸菌を用いた大量発現系により、2 種類の AGM1 の効率的な発現を試みた。低温で発現誘導を行うことにより、封入体とならずに可溶性成分を得ることができた。精製手法としては、融合タンパク質として大量発現を行っていることから、付随した GST タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製を行った。その後プロテアーゼによるタグ切断を行い、最後に高速液体クロマトグラフィー装置を利用した高純度精製を行った。結晶化のスクリーニングを行った結果、CaAGM1 について、ポリエチレングリコールを沈殿剤とする条件で結晶を得ることに成功した。放射光施設 SPring-8 ならびに Photon Factory における回折実験で、良質の回折データを得ることができた。位相決定は重原子誘導体結晶を用いた多重同型置換法によって行った。また、基質や生成物を含む溶液に結晶をソーキングすることにより、基質複合体および生成物複合体を調製し、それらの結晶構造を決定することにも成功した。

CaAGM1 の立体構造は 4 つのドメインから構成され、その全体はハート形をしていた。4 つのドメインのうち、ドメイン 1, 2, 3 は基本的に同じフォールドを取っていた。スーパーファミリーに属する他の酵素との構造比較を行ったところ、全体的なフォールドはよく一致しているが、ドメイン 1 においては円循環変異が起きていることが明らかになった。活性部位であるクレフト部分は、それぞれのドメインからの 4 つのループによって構成されていた。活性部位には基質の他に金属イオンが存在しており、この金属イオンによって、反応に必要なリン酸イオンが基質に供給されることが分かった。基質複合体と生成物複合体とを比較すると、基質と生成物それぞれの持つ単糖リングが 180° 逆向きの関係に位置していた。また、酵素と基質の *N*-acetyl 基との結合状態などから、基質特異性に関わる 2 つのアミノ酸残基を特定した。これらのことから、スーパーファミリーに属する他の酵素と同様に、AGM1 における反応機構を理解することができた。すなわち、まず、金属イオンの近くに存在するホスホセリンのリン酸基が基質と結合して、基質はリン酸基を 2 つ持つ状態になる。次に、こ

の反応中間体が活性部位の外に出て180°回転し、2つのリン酸基の位置が入れ替わる、さらに、反応中間体が活性部位へ戻って、金属イオンの近くへと移動したリン酸基がセリン残基へと転移する。AGM1においては、このような転位反応が起こっていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、病原性真菌カンジダおよびヒト由来の *N*-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1) の X線結晶構造解析に取り組み、カンジダ由来の酵素で明らかになった立体構造から、その反応機構を考察したものである。AGM1 は *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc-6-P) を *N*-acetylglucosamine 1-phosphate (GlcNAc-1-P) へと変換するリン酸基転位反応を触媒し、UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) を合成する過程において必要不可欠な酵素である。UDP-GlcNAc はさまざまな物質の前駆体の一つとして、生体内での重要な物質となっている。AGM1 は糖のリン酸基の転位反応を触媒する酵素ファミリーに属し、ファミリー内の酵素についてはいくつかの構造が明らかになっているが、AGM1 に関してはこれまで立体構造の報告例はなかった。AGM1 の基質認識機構ならびに反応機構を明らかにするためにも、立体構造を決定することはきわめて重要である。また、病原性真菌由来の AGM1 阻害剤は、細胞壁合成阻害を利用した新しいタイプの抗真菌剤候補になることが期待され、ヒト由来 AGM1 の研究は、生物種の違いによる立体構造ならびに基質認識機構に基づいて選択的な阻害機構の詳細を解明するために重要なものとなる。

本研究においては、カンジダおよびヒト由来 AGM1 の大量発現、精製に成功しており、またカンジダ由来 AGM1 については、基質非結合型のアポ酵素、基質複合体および生成物複合体という三種類の結晶構造を決定することに成功している。その結果、AGM1 の構造は4つのドメインから構成され、そのうち3つのドメインは同じフォールドを取っていることを明らかにしている。また、ファミリー内での構造と比較することによって、ドメイン1においては円循環変異が生じていることも明らかにしている。基質複合体および生成物複合体の構造からは、金属イオンによって反応に必要なリン酸イオンが基質に供給されることが分かり、さらに、基質と生成物が持つ単糖リングが180°逆向きの関係で位置すること、酵素と基質の *N*-acetyl 基との結合状態などから基質特異性に関わる2つの特定のアミノ酸残基を有することを明らかにしている。これら三種類の結晶構造における構造の特徴に基づいて、同じファミリーに属する他の酵素の場合と同様の解釈によって、リン酸化を受けた基質が活性部位の外に出て180°回転し、再び活性部位へと戻った後に転位反応が起こるという反応機構を提唱している。

以上のように、本研究は結晶構造解析によってカンジダ由来のリン酸基転位酵素の立体構造を決定し、得られた構造情報からこの酵素が関与する反応の分子機構を考察することに成功したものと評価することができる。これらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。