

# 博士論文

超好熱性微生物由来の無機ピロリン酸依存性ホスホフルクト  
キナーゼの結晶構造解析とリン酸供与体の認識機構

応用生命工学 専攻

氏名 宋 賢珍

指導教員 伏信 進矢

# 目次

略語表	3
序章	5
1. 超好熱菌の糖代謝	6
2. ホスホフルクトキナーゼ (PFK)	6
3. 超好熱性微生物 <i>Thermoproteus tenax</i> と <i>Thermotoga maritima</i> の 糖代謝経路とPFK	9
図表	12
第1章 <i>T. tenax</i> 由来ピロリン酸依存性 PFK (TPFP)の結晶構造解析	23
序	24
実験の目的と方法	
1-1 TPFP の発現と精製方法	28
1-2 TPFP の結晶化と構造決定	32
1-3 TPFP の変異体作成	33
1-4 TPFP の発現ベクター乗り換え	34
結果	
1-5 TPFP の精製結果	36
1-6 TPFP の結晶化条件の探索結果	36
1-7 TPFP の構造解析の結果と考察	37
1-8 TPFP の変異体の結果	43
1-9 構造に関する考察	43
本章のまとめ	46
図表	47
2 章 <i>T. maritima</i> 由来ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ (MPFP)の リン酸供与体の認識機構	77
序	78
実験の目的と方法	
2-1 MPFP のモデリング構築	79

2-2 MPFP の変異体作成 -----	80
2-3 MPFP と変異体の発現と精製 -----	81
2-4 動力学的パラメーター -----	84
結果	
2-5 MPFP のモデリング構造 -----	85
2-6 MPFP の変異体作成結果 -----	86
2-7 MPFP と変異体の大量培養と精製 -----	88
2-8 MPFP と変異体の動力学的パラメーター -----	90
本章のまとめ -----	91
図表 -----	92
付録 FBPA/P の機能解析-----	110
引用文献 -----	122
総括 -----	128
発表論文-----	132
謝辞 -----	133

## 略語

IPTG Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
KEK 高エネルギー加速器研究機構  
MAD 多波長異常分散法  
MPD 2-メチル-2,4-ペンタンジオール  
PEG Polyethylene Glycol  
PF Photon Factory 放射光施設  
PNP imidodiphosphate sodium salt、PPi のアナログ  
XAFS X-ray Absorption Fine Structure  
BbPFP *Borrelia burgdorferi* 由来 PPI-PFK  
BsPFK *Bacillus subtilis* 由来 ATP-PFK  
EcPFK *Escherichia coli* 由来 ATP-PFK  
GsPFK *Geobacillus stearothermophilus* 由来 ATP-PFK  
MaPFP *Marinobacter aquaeolei* 由来 PPI-PFK  
NmPFP *Nitrosospira multiformis* 由来 PPI-PFK  
PpPFK *Pichia pastoris* 由来 ATP-PFK  
TbPFK *Trypanosoma brucei* 由来 ATP-PFK  
TPFP *Thermoproteus tenax* 由来 PPI-PFK  
NADP<sup>+</sup>-GAPDH NADP<sup>+</sup> 依存性のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ  
PPase Pyrophosphatase 無機ピロホスファターゼ  
1,3BPG 1,3-ビスホスホグリセリン酸  
3PG 3-ホスホグリセリン酸  
AOR/ALDH アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ /アルデヒドデヒドロゲナーゼ  
DHAP ジヒドロキシアセトンリン酸  
ENO エノラーゼ  
F6P フルクトース-6-リン酸  
FBP/IMP フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ/イノシトール1-ホスファターゼ  
FBPA/P フルクトース1,6ビスリン酸アルドラーゼ/ホスファターゼ

FBPA フルクトース1,6ビスリン酸アルドラーゼ  
F16BP(FBP) フルクトース-1,6-ビスリン酸  
F26BP フルクトース-2,6-ビスリン酸  
G3P グリセルアルデヒド-3-リン酸  
G6P グルコース-6-リン酸  
G6PDH グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ  
GA グリセルアルデヒド  
GAD グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ  
GAP グリセルアルデヒド 3-リン酸  
GAPDH グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ  
GAPN 非リン酸化グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ  
GDH グルコース デヒドロゲナーゼ  
GPDH グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ  
HK ヘキソキナーゼ  
KDG グルコン酸の2-ケト-3-デオキシグルコン酸  
KDPG 2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸  
KD GK グルコン酸の2-ケト-3-デオキシグルコン酸キナーゼ  
KDPGA 2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ  
PEP ホスホエノールピルビン酸  
PEPS ホスホエノールピルビン酸シンターゼ  
PGAM ホスホグリセリン酸ムターゼ  
PGI ホスホグルコースイソメラーゼ  
PGK ホスホグリセリン酸キナーゼ  
PK ピルビン酸キナーゼ  
PPDK ピルビン酸リン酸ジキナーゼ  
PPi-PFK ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ  
TIM トリオースリン酸イソメラーゼ

# 序章

## 1. 超好熱菌の糖代謝

至適生育温度が80度以上の微生物を総称して超好熱菌 (Hyperthermophiles) と呼び、それらは、温泉や海底熱水の噴出孔などで見ついている。*Thermoproteus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*を含む古細菌が大部分であり、バクテリアの中では *Thermotoga*, *Aquifex* 属など少数が超好熱菌に属する。さらに、100度から120度の高温でも生育できる古細菌も続々見ついている。これらの古細菌は全生物系の進化系統樹の根元付近に位置していることから、原始生物は高温環境から誕生したことが推定でき(図1)、超好熱菌の代謝系には特殊なものがみられる場合がある。

解糖系は多くの生物に存在し、グルコースをピルビン酸へと分解してエネルギーを生産する重要な代謝経路で、真核生物は典型的なエムデン-マイヤーホフ (EM) 経路を利用する。原核生物は EM 経路の他にエントナー-ドウドロフ (ED) 経路があり、この片方、または、両方の経路を使ってグルコースを分解する(図2)。EM 経路の解糖系は10段階の反応を介しており、そのうち、3つの反応は不可逆であり、この経路を調節する役割を担当する。原核生物における ED 経路では、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼと2-ケト-3-デオキシグルコン酸 (KDPG) アルドラーゼによって、グルコースからピルビン酸を生成する非リン酸化経路と半リン酸化経路からなる ED 分岐経路が存在する(図1)。

## 2. ホスホフルクトキナーゼ (PFK)

ATP (アデノシン3リン酸)は生物体で用いられるエネルギー保存および利用に関与するヌクレオチドであり、すべての生物がこれを直接利用する。細胞内でエネルギー代謝の中心になる ATP は、代謝過程で遊離されるエネルギーを保存するために ADP から合成される高エネルギー化合物の一つである。一方、生体の細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を担う情報伝達分子でもあり、解糖系などから生産された ATP に保存されたエネルギーは生体物質の合成、筋肉収縮、物質の能動輸送、神経刺激伝達などエネルギー消費するのに利用されるなどの重要性から、「生体のエネルギー通貨」と考えられてきた。すなわち、ATP はエネルギー生産過程と消費過程の間でエネルギー運搬体としての役割をする。

PPi は生体内においてタンパク質、核酸、セルロースやデンプンなどの高分子合成の副産物として生成し、たとえば、ヌクレオチドがポリメラーゼにより DNA または RNA の伸長に組み入れられる時に放出される (Moochhala et al. 2008)。細胞内で高濃度に存在する場合は高分子合成反応を阻害する性質を持つ (Kulaev and Vagabov 1983)。そのため、通常は細胞内の可溶性ピロフォスファターゼ (PPase) によって速やかにオルトリン酸(Pi)に分解される。

1960年代の Calvin (Calvin 1962)と Lipman (Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis. In *The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices* (Fox, S. W., ed.), pp. 212 – 216, Academic Press, New York.)はそれぞれ初期生物系での高エネルギー供与体として PPi を提示した。その時代の原始生物は高エネルギー化合物として PPi を利用し、生物発生以前から進化してきた原始生命体で発見された反応で働くことを提案した。このように PPi は ATP が出現する「以前の原始生物のエネルギー通貨」の有力な候補である。なぜ、PPi と比較して複雑な構造を持つ ATP が現在のエネルギー通貨として利用されているのか、生物のエネルギー通貨はどのような進化を遂げてきたのか大変興味深いところである。解糖系の反応の中で ATP の代わりにエネルギー源として PPi を利用できる PPi 依存性の酵素が生物界にわずかに存在しており、その一つが PPi 依存性ホスホフルクトキナーゼ (PFK) (PPi-PFK) である。

さらに、この反応は当初、嫌気性のバクテリアと原始的原核生物で発見されたので、PPi 依存性キナーゼは原始生命に存在したメカニズムだと思われた。このような PPi に注目することは酵素の進化を考える上で非常に重要であり、とくに PPi-PFK に関する研究は活発に進んでいる。

PFK は EM 経路の上流部分という戦略的な位置を占める。ATP 依存性 PFK は、反応の不可逆性およびアロステリック制御によって、EM 経路を制御する主要な役割を担う。この酵素はフルクトース-6-リン酸 (F6P) をフルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) にリン酸化する。その触媒反応におけるリン酸供与体として ATP の他にも、ADP および PPi が知られている。

PFK は PFKA、PFKB、PFKC の3つのファミリーに分類される (Ronimus and Morgan 2001)。PFKA ファミリーはよく知られている真核生物の ATP-PFK (EC 2.7.1.11) とバクテリアおよび古細菌の ATP-PFK、PPi-PFK (EC 2.7.1.90) から構成される。普通 PFK という



のは PFKA ファミリー を意味し、PFK (PFKA)のアイソザイムである大腸菌の PFK2 は PFKB ファミリー として分類される。PFK2 は PFK の活性剤でもあり、糖新生のアロステリック酵素として働く fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase)の阻害剤である fructose 2,6-bisphosphate (F2,6BP)を生成する。FBPase は5つのグループに分類され、超好熱古細菌および超好熱性細菌は新しいグループV に属することが分かった。本研究室では、好酸好熱性古細菌である *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の FBPase の立体構造を初めて解析した (Nishimasu et al. 2004)。そして、グループV の FBPase は活性中心の構造を変えながら FBP aldolase の反応と FBP phosphatase 反応をする (FBP aldolase/phosphatase (FBPA/P)、EC 4.1.2.13 3.1.3.11)、1つの酵素が2つの反応を触媒する酵素であることを明らかにした(Fushinobu et al. 2011)。そして、PFKC ファミリー は ADP をリン酸供与体とするユニークな PFK (ADP-PFK, EC 2.7.1.146) で、*Pyrococcus* 属や *Thermococcus* 属などの超好熱性古細菌に認められる。本研究室では世界で初めて ADP-PFK のパラログである ADP-GK (グルコキナーゼ, EC 2.7.1.147)の立体構造が決定された (Ito et al. 2001)。

PPi-PFK は真核生物、原核生物、古細菌の全ての生物界から報告されており、反応を可逆的に触媒する上、非アロステリックな酵素であるという点が ATP-PFK と大きく異なる (図3)。ATP-PFK は代表的なアロステリック調節酵素で、ATP、ADP、AMP、F2,6BP、クエン酸などのエフェクターにより調節される (Goldhammer and Paradies 1979, Uyeda 1979, Sols 1981)。このような分類とは別に、PFKは Siebers らによって、アミノ酸配列に基づきグループI、II、III に分けられた (Siebers et al. 1998)(図4)。この当時(1998年)、グループI はバクテリアまたは真核生物の ATP-PFK だけが属しており、グループII には PPi-PFK だけを利用するすべての原核生物および真核生物が属していた。また、グループIII の場合は、PPi-PFK を利用する *Dictyoglomus*、*Thermoproteus*、*Amycolaptosis* のほかにATP-PFK を利用する *Streptomyces* が属していると定義された。しかし、その後、*Trypanosoma brucei* PFK の立体構造が報告され (Martinez-Oyanedel et al. 2007)、これは、ATP-PFK でありながら、構造や機能の類似性などからグループII に属したことが明らかになり、リン酸供与体によってグループI とII が分類されるわけではない。本研究で対象とする *Thermoproteus tenax* 由来の PPi-PFK (TPFP) はグループIII に属し、他のグループの PFK とのアミノ酸配列の同一性を調べると、グループII では *Borrelia burgdorferi* PPi-PFK (20%)、*T. brucei* ATP-PFK (26%)、*Nitrosospira multiformis* PPi-PFK (18.7%)、

*Marinobacter aquaeolei* P<sub>Pi</sub>-PFK(18.7%)、そして *Thermotoga maritima* P<sub>Pi</sub>-PFK (30%) である。また、グループ I では、*Escherichia coli* ATP-PFK (35%)、*Geobacillus stearothermophilus* ATP-PFK (37.9%)、*Lactobacillus delbrueckii* ATP-PFK (34%)、*Bacillus subtilis* ATP-PFK (37.9%)、*Pichia pastoris* ATP-PFK (32%)、Rabbit skeletal Muscle ATP-PFK (30.8%)、*Saccharomyces cerevisiae* ATP-PFK (30.8%) そして *T. maritima* ATP-PFK (35%) である。TPFP は P<sub>Pi</sub>-PFK にもかかわらず、同じリン酸供与体を利用するグループII よりATP をリン酸供与体として利用するグループI と似ていた。また、同じグループの *Streptomyces coelicolor* ATP-PFK とアミノ酸配列が40%一致していることは興味深い。グループIII のほとんどが放線菌で、古細菌由来のものはTPFP など少数である。一方、*Amycolatopsis methanolica* は、成長のため炭素源としてグルコースを利用する放線菌であり、ATP-PFK および P<sub>Pi</sub>-PFK と同様の生化学的特性を持つ P<sub>Pi</sub>-PFK を有する。しかし、炭素源としてメタノールのような C<sub>1</sub> 環境で成長する場合、P<sub>Pi</sub>-PFK の代わりに ATP-PFK の活性が誘導される(表1)。*A. methanolica* のATP-PFK と P<sub>Pi</sub>-PFK のアミノ酸同一性は24%で、ATP-PFK は*T. brucei* ATP-PFK と最も似てて、P<sub>Pi</sub>-PFK は *B. brufdorferi* P<sub>Pi</sub>-PFK とよく似ていることから、これは遺伝子重複ではなく、外部遺伝子の伝播により ATP-PFK 遺伝子を獲得したことを示唆する (Alves et al. 2001)。

ATP-PFK と P<sub>Pi</sub>-PFK のアミノ酸配列は40%以下の同一性を示すが、活性部位に結合する基質と相互作用するアミノ酸は多く保有されている。Chi & Kemp (Chi and Kemp 2000) は、グループII に属する *Entamoeba histolytica* 由来の P<sub>Pi</sub>-PFK を用いて、ATP-PFK とのアミノ酸配列アラインメントにより、保存性の高い2つのモチーフ(グリシンモチーフ、活性部位モチーフ)から点変異体を作った。PFK に対するリン酸供与体の特異性は、ただ一つのアミノ酸残基(特にグリシンモチーフの4番目残基であるアスパラギン酸)の変異(D175G)によって、*E. histolytica* P<sub>Pi</sub>-PFK は ATP をリン酸供与体として P<sub>Pi</sub> よりも優先して利用するように変換された(表2、図5)。この結果により、初期 PFK は ATP 依存性で、進化とそれに適応する上で ATP の代わりに P<sub>Pi</sub> を利用することになったことが示唆された。

### 3. 超好熱性微生物 *Thermotoga maritima* と *Thermoproteus tenax* の糖代謝経路と PFK

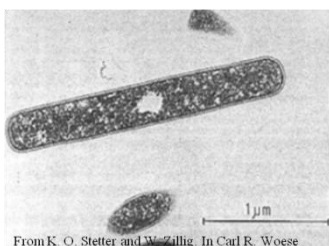
## 超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima*



イタリアの海底火山付近の地熱で温められた海底の堆積物から単離された*T. maritima* (Huber et al. 1986) は、グラム陰性通性嫌気性の超好熱性バクテリアで Thermotogale 門の中で最も広く知られている。至適生育温度は80度、最高増殖温度が90度である。

Small subunit rRNAの系統樹の系統分析によると、バクテリアの最も深い系統のうちの1つであることを示しており (Huber et al. 1986)、これは系統発生的に非常に重要である。1999年に *T. maritima* MSB8 の全ゲノム配列が明らかになり、機能未知の863個(46%)を含め1877個の open reading frame (ORF) を持ち、そのうち24%は古細菌遺伝子の水平伝達に由来すると考えられている (Nelson et al. 1999)。*T. maritima* は EM 経路を経由し、グルコースから 酢酸と乳酸を生産する (Selig et al. 1997)。多糖を含む様々な炭水化物を分解する EM 経路を調節する酵素のうち ATP 依存性 PFK (ATP-PFK;以下 MPFK と略す)が報告されており、それ以外にゲノム解析によりもう1つの PFK 遺伝子の存在が認識された。それがピロリン酸の高エネルギーリン酸結合を利用する PPi 依存性 PFK (PPi-PFK ;以下 MPFP と略す)で、2種類の PFK が働いていることが分かった。これらは Ding らによりクローニングされ、それぞれの特徴が調べられた (Ding et al. 2001)。その結果、MPFK はアロステリック酵素であるが、ホスホエノールピルビン酸のような普通の ATP-PFK のアロステリックエフェクターである citrate や phosphoenolpyruvate (PEP)により影響は受けず、PPi (表3)および polyphosphate (表4)により強く阻害された。MPFP は、リン酸供与体基質として PPi より polyphosphate (約1.5倍)のほうが親和性が高い非アロステリック酵素であることが分かった。これらの PFK 性質を比較した(表5)。PFK の系統樹から見ると MPFK はグループ I、MPFP はグループ IIに属している(図4)。

## 超好熱性古細菌 *Thermoproteus tenax*



*T. tenax* は1981年 Zillig によってアイスランドの弱酸性温泉から単離され (Zillig et al. 1981)、Siebers らによってそのゲノムが解析された (Siebers et al. 2011)。この嫌気性古細菌は至適増

殖温度が86度であり、small-subunit rRNA 解析によると、古細菌の中でも枝の深いところに位置している。ATP-PFK、PPi-PFK および ADP-PFK を利用する古細菌は多数存在しており、PFK の進化を理解するため、*Thermococcus celer* と *Thermococcus litoralis* 由来の ATP-PFK (Selig et al. 1997)、*Pyrococcus furiosus* 由来の ADP-PFK (Kengen et al. 1994) などの超好熱古細菌からの PFK に関する研究が行われていた。*T. tenax* は、生化学的研究が数多くなされており、古細菌特有の代謝能力、調節能力、耐熱適応形質を持つため、生物の進化を理解するための重要な生物である。また、炭水化物代謝には少なくとも2つの経路(変形 EM 経路と分岐 ED 経路、図6)を利用できるが、<sup>13</sup>C グルコース labeling 実験により優先的なのは変形 EM 経路であり (Siebers et al. 1997)、炭素源によりどの経路を使うかが決まる。*T. tenax* の変形 EM 経路の特徴は (i) 可逆の非アロステリック PPi-PFK、(ii) 2つの異なるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、そして (iii) ピルビン酸キナーゼのアロステリック能力の減少である (Dorr et al. 2003)。さらに、ED 経路は非リン酸化経路と半リン酸化経路に分岐することがゲノム解析により新たに確認され (Siebers et al. 2004)、*T. tenax* は糖代謝に3つの違う経路を持つことが分かった。

そして、分岐 ED 経路は半リン酸 ED 経路と非リン酸 ED 経路に分かれる。半リン酸 ED 経路は (i) グルコースデヒドロゲナーゼによる グルコースからグルコン酸への酸化、(ii) グルコン酸デヒドラターゼによるグルコン酸の2-ケト-3-デオキシグルコン酸 (KDG) への変換、(iii) KDG キナーゼによるリン酸化で KDPG を形成、(iv) 2機能性 KDPG アルドラーゼによって分岐され、グリセルアルデヒド 3-リン酸 (GAP) からピルビン酸への経路である。非リン酸 ED 経路は、KDPG アルドラーゼによりグリセルアルデヒド (GA) からグリセリン酸へ酸化し、さらに、ピルビン酸に至る経路である。タンパク質や遺伝子レベルでの ED 経路のコントロールに関してはまだ分からない。*T. tenax* の主な解糖系路である変形 EM 経路の酵素のうち、ピロリン酸を利用する PPi-PFK (以下 TPFK と略す) が存在する (Siebers and Hensel 1993)。この経路を調節する3つの酵素 (TPFK、非リン酸化型のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPN)、ピルビン酸キナーゼ (PK)) の中で TPFK は可逆的な反応を触媒し、非アロステリックであるため、典型的な酵素のタンパク質のレベルでは調節能力はおそらくほとんどない (Zaparty et al. 2008)。すなわち、PPi-PFK は ATP-PFK のアロステリック調節因子である ATP や ADP のほかにフルクトース-2,6-ビスリン酸、ホスホエノールピルビン酸、クエン酸、グルコース、ピルビン酸などに影響を受けない。

PFK に続いて2種類のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼが存在する(Hensel et al. 1987)。非リン酸化  $\text{NAD}^+$  依存性のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPN、EC 1.2.1.8)とリン酸化  $\text{NADP}^+$  依存性のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ ( $\text{NADP}^+$ -GAPDH; EC 1.2.1.13)の中で、GAPN が PFK の代わりにこの経路を調節するアロステリックな酵素として働く (Brunner et al. 2001)。この GAPN のエフェクターを表6で示す (Brunner and Hensel 2001)。

本研究は超好熱性微生物である *T. tenax* および *T. maritima* 由来の P<sub>i</sub>-PFK のリン酸供与体について、その特異性の構造的基盤 について調べた。

本論文は主に以下の2章からなる。

- 1) *T. tenax* 由来ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ (TPFP) の結晶構造解析
- 2) *T. maritima* 由来ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ (MPFP) のリン酸供与体の認識機構

-付録、超好熱菌由来糖新生二機能酵素 fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase (FBPA/P) の機能解析

表1 *Amycolatopsis methanolica* において、異なる基質による酵素活性 (Alves et al. 2001)から引用

Substrate	Specific activity (mU · mg <sup>-1</sup> )	
	PP <sub>i</sub> -PFK	ATP-PFK
Glucose (10 mM)	180	0
Fructose (10 mM)	120	0
Glycerol (20 mM)	100	0
Acetate (20 mM)	20	0
Gluconate (10 mM)	30	0
Succinate (10 mM)	20	0
Phenylalanine (10 mM)	30	0
Methanol (60 mM)	20	120
Formaldehyde <sup>a</sup> (50 mM)	10	220
Betaine (20 mM)	10	180

<sup>a</sup> Data from formaldehyde-limited continuous cultures in steady-state at a growth rate of  $D$  (dilution rate) = 0.05 h<sup>-1</sup>.

表2 *Entamoeba histolytica* PP<sub>i</sub>-PFK の変異体によるリン酸供与体の転換 (Chi and Kemp 2000)より引用

	PP <sub>i</sub>			PP <sub>i</sub> performance ( $k_{cat}/K_m$ ) <sub>PP<sub>i</sub></sub>	ATP			ATP performance ( $k_{cat}/K_m$ ) <sub>ATP</sub>
	$K_m$ PP <sub>i</sub>	$K_m$ Fru-6-P	$k_{cat}$ PP <sub>i</sub>		$K_m$ ATP	$K_m$ Fru-6-P	$k_{cat}$ ATP	
	mM	mM	s <sup>-1</sup>		mM	mM	s <sup>-1</sup>	
WT	0.026	0.101	341	13,100	2.9	2.0	0.037	0.013
D175G	0.034	0.104	0.045	1.3	0.158	0.28	6.9	44
K201G	0.019	0.088	0.073	3.8	1.4	0.082	0.142	0.101
D175G/K201G	~	~	~	<4 × 10 <sup>-4a</sup>	2.9	0.068	3.2	1.1

<sup>a</sup> No activity was detected.

表3 *Thermotoga maritima* ATP-PFK<sup>a</sup> に対する PPi と他の化合物の影響 (Ding et al. 2001)より引用

Effector	% Activity
None.....	100
0.1 mM PP <sub>i</sub> .....	20
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM ADP.....	57
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM AMP.....	22
0.1 mM PP <sub>i</sub> , 0.1 mM ADP, and 0.1 mM AMP.....	57
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM TDP.....	69
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM GDP.....	68
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM CDP.....	27
0.1 mM PP <sub>i</sub> and 0.1 mM UDP.....	47

<sup>a</sup> Experimental conditions were 0.5 mM F-6-P, 0.25 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADH, 175 mM KCl, and 30 mM Tris (pH 7.8) at 50°C.

表4 *Thermotoga maritima* ATP-PFK の基質 F6P に対する K<sub>m</sub> に対する PPi、PPPi、poly-P、citrate、PEP の影響 (Ding et al. 2001)より引用

Effector	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (U mg <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>
0.01 mM PP <sub>i</sub>	0.436	148	3.4 × 10 <sup>2</sup>
0.025 mM PP <sub>i</sub>	0.749	136	1.8 × 10 <sup>2</sup>
0.05 mM PPP <sub>i</sub>	0.983	256	2.6 × 10 <sup>2</sup>
0.05 mM poly-P	1.376	278	2.0 × 10 <sup>2</sup>
1.0 mM citrate	0.0765	224	2.9 × 10 <sup>2</sup>
5.0 mM PEP	0.315	260	8.2 × 10 <sup>2</sup>

表5 *T. maritima* PFKs の性質比較 (Ding et al. 2001)より引用

Property	PP <sub>i</sub> -PFK <sup>a</sup>	ATP-PFK <sup>b</sup>
pH optima		
Forward reaction	5.6–5.8	7.2–8.0
Reverse reaction	5.6–6.8	ND <sup>c</sup>
MgCl <sub>2</sub> optimum (mM)	0.5–7.0	1.0–10.0
Sp act (U mg <sup>-1</sup> )	203	432
Thermostability (half-life at 90°C) <sup>d</sup>	>5 h	>5 h
Apparent molecular mass (kDa)		
SDS-PAGE	48	38
Gel filtration	97	200
Phosphoryl donors (%) <sup>e</sup>	Poly-P (157), PPP <sub>i</sub> (123), PP <sub>i</sub> (100), ATP (0), ADP (0)	ATP (100), GTP (42), UTP (14), CTP (13), TTP (10), PP <sub>i</sub> (0), ADP (0)
Cation specificity (%) <sup>f</sup>	Mg <sup>2+</sup> (100) > Co <sup>2+</sup> (49) > Mn <sup>2+</sup> (40) > Ni <sup>2+</sup> (38)	Mg <sup>2+</sup> (100) > Mn <sup>2+</sup> (90) > Fe <sup>2+</sup> (34)
Sensitivity to cations (% of control activity) <sup>g</sup>		
1.0 μM Cu <sup>2+</sup>	57	72
1.0 μM Zn <sup>2+</sup>	56	72

<sup>a</sup> Experimental conditions were 1.0 mM PP<sub>i</sub>, 3 mM F-6-P, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADH, 175 mM KCl, and 30 mM bis-Tris (pH 5.8) at 50°C.

<sup>b</sup> Experimental conditions were 0.5 mM ATP, 3 mM F-6-P, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADH, 175 mM KCl, and 30 mM Tris (pH 7.8) at 50°C.

<sup>c</sup> Not detected.

<sup>d</sup> 175 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.05 mM dithiothreitol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 mM phosphate buffer (pH 7.0).

<sup>e</sup> 0.1 mM phosphoryl donors, 3 mM F-6-P, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADH, 175 mM KCl, and 30 mM bis-Tris (pH 5.8) at 50°C for PP<sub>i</sub>-PFK; 30 mM Tris (pH 7.8) at 50°C for ATP-PFK.

<sup>f</sup> 0.1 mM cations, 3 mM F-6-P, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADH, 175 mM KCl, and 30 mM bis-Tris (pH 5.8) for PP<sub>i</sub>-PFK; 30 mM Tris (pH 7.8) at 50°C for ATP-PFK.

<sup>g</sup> Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> added in standard assay.



表6 *T. tenax* のアロステリック酵素 GAPN のエフェクター  
(Brunner and Hensel 2001)より引用

ALLOSTERIC EFFECTORS OF GAPN FROM THREE DOMAINS				
Effector	Eucarya		Bacteria <i>S. mutans</i> <sup>c</sup>	Archaea <i>T. tenax</i> <sup>d</sup>
	Spinach <sup>a</sup>	<i>C. reinhardtii</i> <sup>b</sup>		
Inhibitors	Phosphohydroxy- pyruvate	Erythrose 4-phosphate	Phosphohydroxy- pyruvate Erythrose 4-phosphate Sedoheptulose 7-phosphate	NADH NADP <sup>+</sup> NADPH ATP
Activators	NADP <sup>+</sup>	—	KCl, NH <sub>4</sub> Cl, NaCl	KPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PP <sub>i</sub> AMP ADP G1P Fructose 6-phosphate Fructose 1-phosphate Ribose 5-phosphate

<sup>a</sup> A. A. Iglesias and M. Losada, *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 830 (1988).

<sup>b</sup> A. A. Iglesias, A. Serrano, M. G. Guerrero, and M. Losada, *Biochim. Biophys. Acta* **925**, 1 (1987).

<sup>c</sup> V. L. Crow and C. L. Wittenberger, *J. Biol. Chem.* **254**, 1134 (1979).

<sup>d</sup> N. A. Brunner, H. Brinkmann, B. Siebers, and R. Hensel, *J. Biol. Chem.* **273**, 6149 (1998).

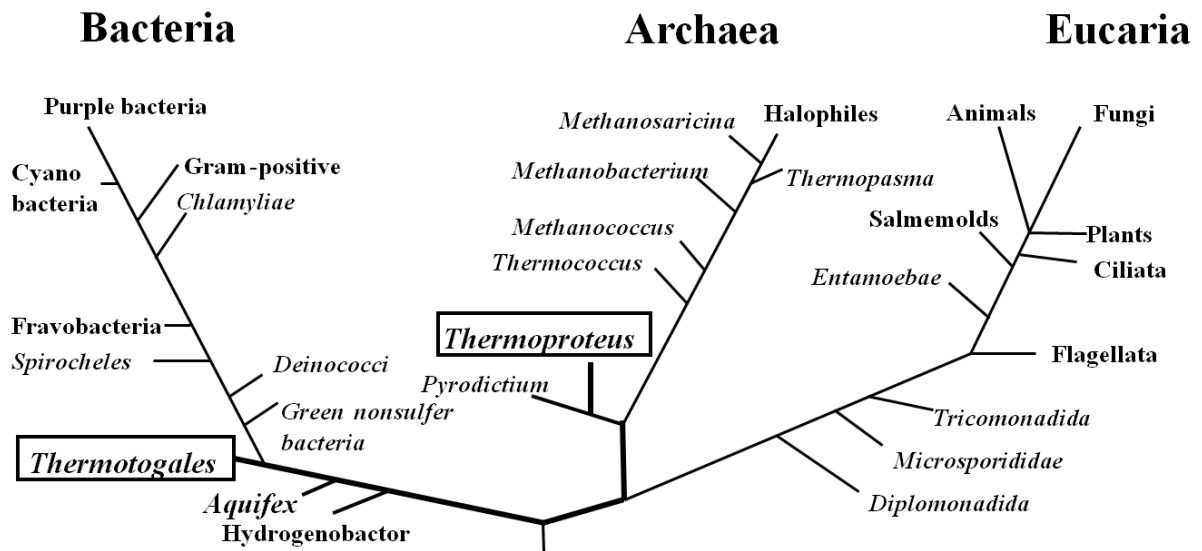


図1 全生物界の進化系統樹

Woese *et al.*, より改作した。

太線は超好熱性微生物を示し、四角で囲んだ枝に含まれる生物が本研究の対象である。

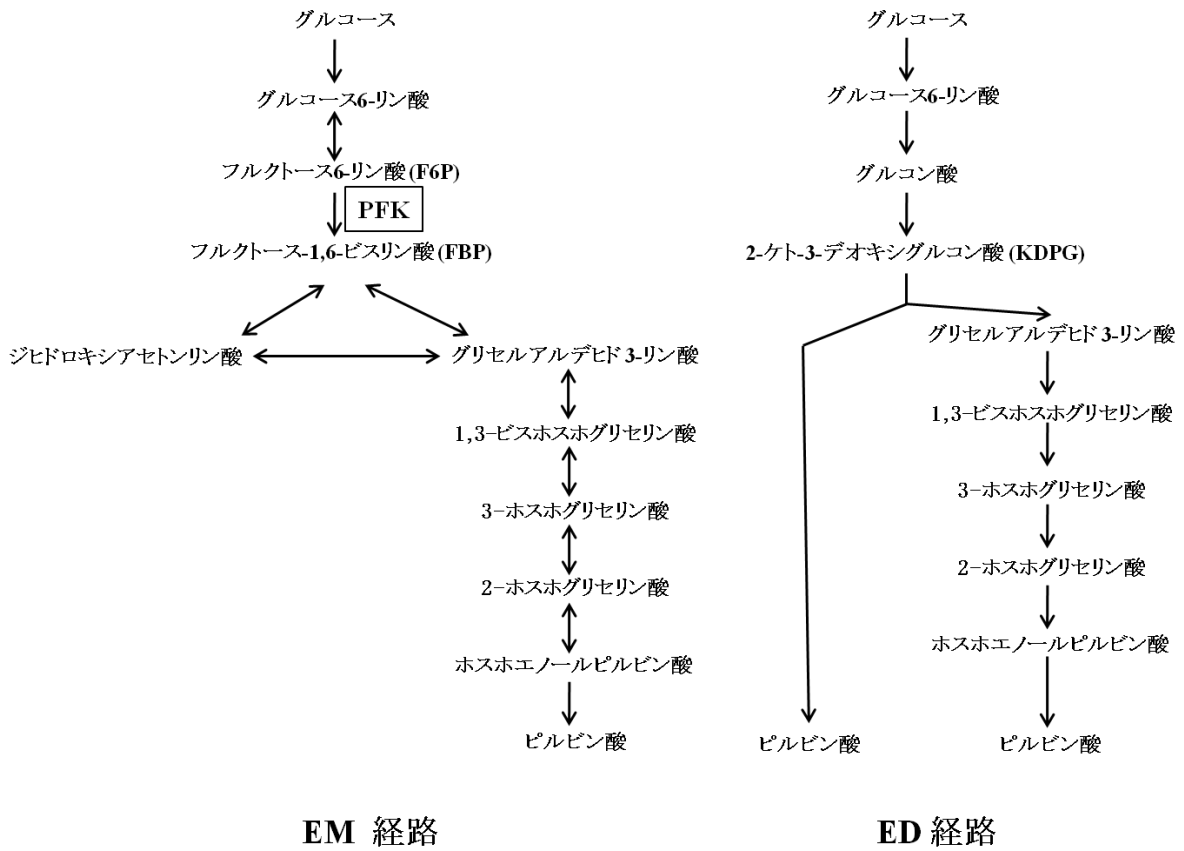


図2 典型的な EM 経路と ED 経路

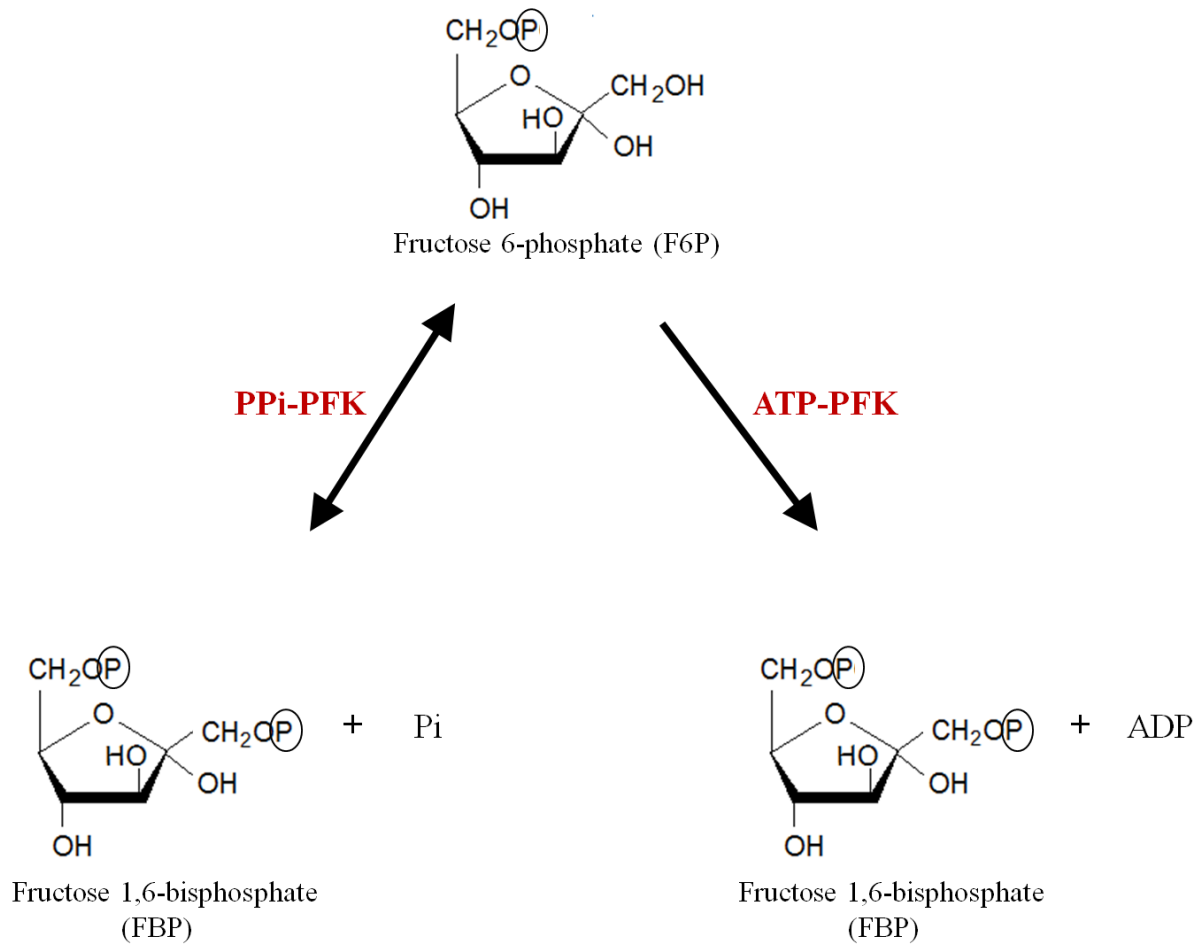


図3 2種の PFK による反応の模式図

ATP-PFK は 不可逆な反応を触媒し、EM 経路を調節するアロステリック酵素である。一方、PPI-PFK は可逆的な反応を触媒し、アロステリックな作用は示さない。

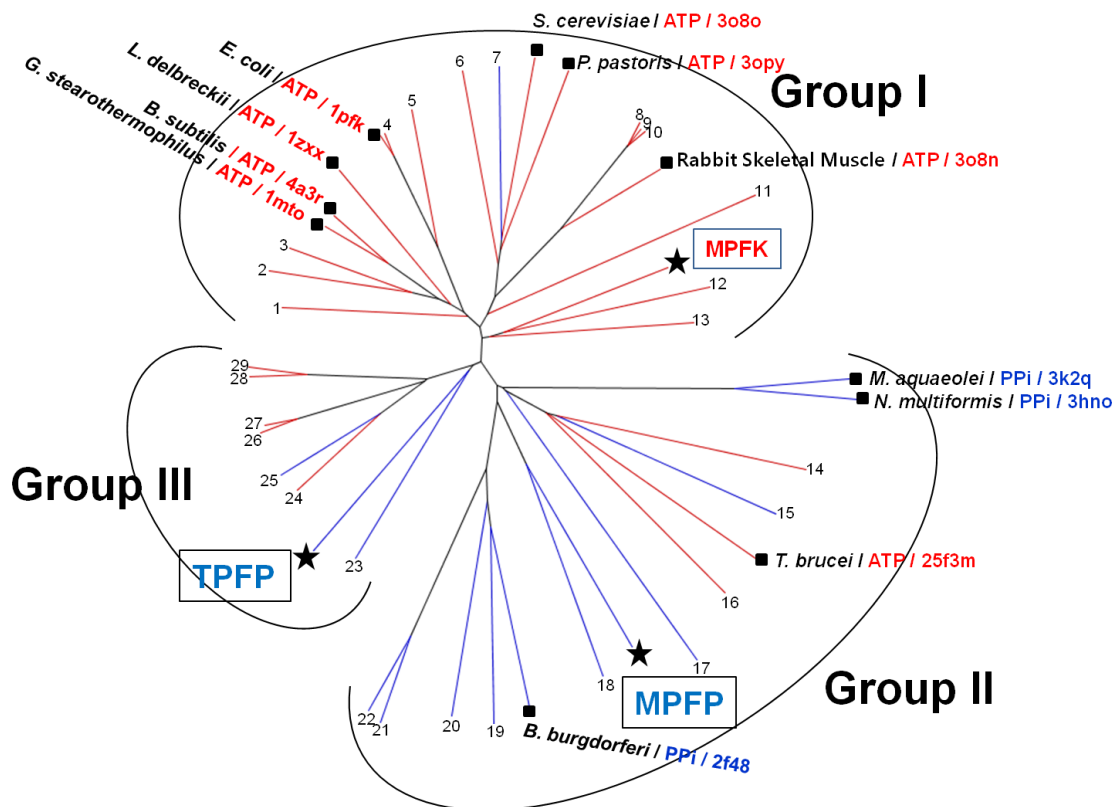


図4 既知の PFK の系統樹

PFK はアミノ酸配列に基づき3つのグループに分けられる。本論文で記述した TFPF、MPFP、MPFK は★で示し、四角で囲った。今まで、11種のPFK ( ■;グループI から7つとグループII から4つ)が構造解析済みで、生物種 / リン酸供与体(ATP-PFK は赤、PPi-PFK は青) / 代表的な PDB ID で表した。

1. *Staphylococcus aureus* 2. *Streptococcus mutans* 3. *Enterococcus faecalis* 4. *Klebsiella pneumonia* 5. *Vibrio cholera* 6. *Aspergillus oryzae* 7. *Candida albicans* 8. *Bos Taurus* 9. *Homo sapiens* 10. *Mus musculus* 11. *Mycoplasma pneumonia* 12. *Aquifex aeolicus* 13. *Thermus thermophilus* 14. *Arabidopsis thaliana* 15. *Entamoeba histolytica* (PP1) 16. *Acidomonas methanolica* 17. *Propionibacterium freudenreichii* 18. *Trichomonas vaginalis* 19. *Entamoeba histolytica* (PP2) 20. *Giardia lamblia* 21. *Solanum tuberosum* 22. *Ricinus communis* 23. *Dictyoglomus thermophilum* 24. *Streptomyces coelicolor* 25. *Acidomonas methanolica* 26. *Mycobacterium leprae* 27. *Mycobacterium tuberculosis* 28. *Streptomyces griseus* 29. *Streptomyces avermitilis*

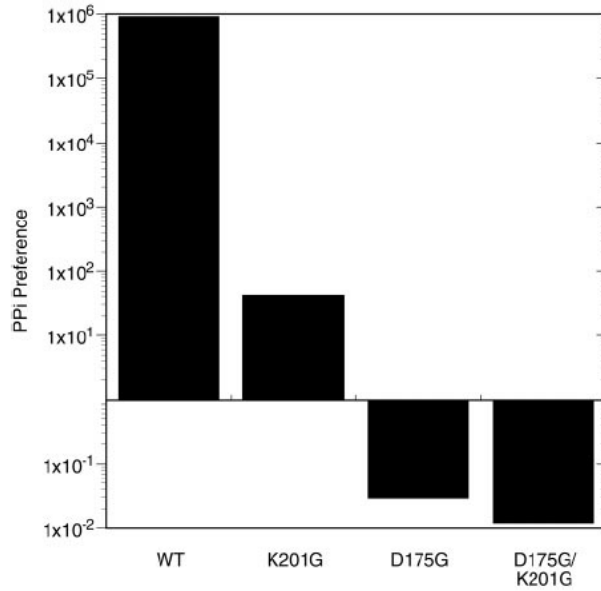


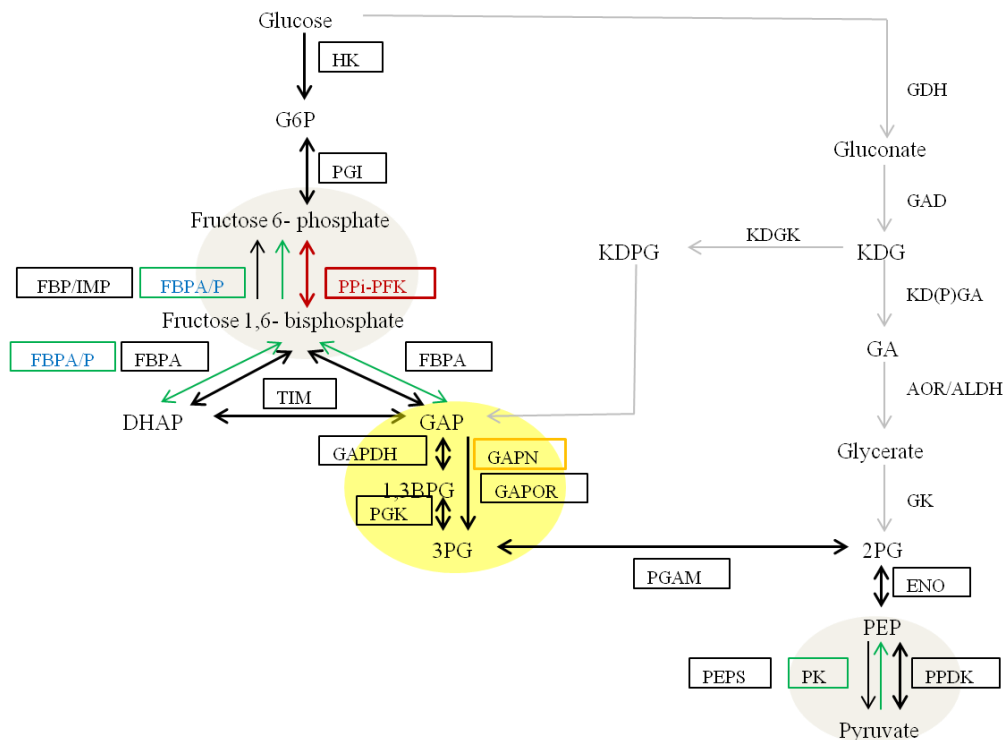
FIG. 1. Shift in substrate preference generated in mutants of *E. histolytica* PFK. Differences in the height of the histogram columns represent the degree to which preference (calculated as the ratio  $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{PPi}}/(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{ATP}}$ ) is shifted by each mutation. The PP<sub>i</sub> preference of the double mutant is a minimal value based on the assumptions indicated in the legend to Table I.

## 図5 *E. histolytica* PFK の変異体によるリン酸供与体の転換

D175G(グリシンモチーフ)の PP<sub>i</sub> Preference は2200倍低下し、ATP Preference は3800倍増加した。

**Gluconeogenesis / Modified EM pathway**

**Branched ED pathway**



**図6 *T. tenax* の糖新生/変形 EM 経路と分岐 ED (非リン酸化ED/半リン酸化ED) 経路**

*T. tenax* は解糖経路として変形 EM 経路を優先的に利用し、GAPN がアロステリック酵素として働く。

G6P、グルコース-6-リン酸 DHAP、ジヒドロキシアセトンリン酸 GAP、グリセルアルデヒド 3-リン酸 1,3BPG、1,3-ビスホスホグリセリン酸 3PG、3-ホスホグリセリン酸 PEP、ホスホエノールピルビン酸 KDG、グルコン酸の2-ケト-3-デオキシグルコン酸 KDPG、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸 GA、グリセルアルデヒド

HK、ヘキソキナーゼ PGI、ホスホグルコースイソメラーゼ FBPA/IMP、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ/イノシトール1-ホスファターゼ FBPA/P、フルクトース1,6ビスリン酸アルドラーゼ/ホスファターゼ PPi-PFK、ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ FBPA、フルクトース1,6ビスリン酸アルドラーゼ TIM、トリオースリン酸イソメラーゼ GAPDH、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ GAPN、非リン酸化グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ PGK、ホスホグリセリン酸キナーゼ GDH、グルコース デヒドロゲナーゼ GAD、グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ KDGK、グルコン酸の2-ケト-3-デオキシグルコン酸キナーゼ KDPGA、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ AOR/ALDH、アルデヒドフェレドキシシンオキシドレダクターゼ /アルデヒドデヒドロゲナーゼ PK、ピルビン酸キナーゼ ENO、エノラーゼ PPK、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ PEPS、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ PGAM、ホスホグリセリン酸ムターゼ

# 第 1 章

*Thermoproteus tenax* 由来無機ピロリン酸依存性  
ホスホフルクトキナーゼ (TPFP) の結晶構造解析



## 序

ホスホフルクトキナーゼ(PFK)は、EM 経路を制御する主要なアロステリック酵素であり、EM 経路の最も上流側で機能することから代謝戦略的に非常に重要な酵素で、フルクトース-6-リン酸(F6P)をリン酸化してフルクトース-1,6-ビスリン酸(FBP)を生成する。PFK のリン酸供与体として ATP を用いるもの(ATP-PFK、EC 2.7.1.11)以外に、ADP を用いるもの(ADP-PFK、EC 2.7.1.146)および無機ピロリン酸(PPi)を用いるもの(PPi-PFK、EC 2.7.1.90)が知られている。これらのうち、ATP-PFK と PPi-PFK は同じファミリーに分類され、さらに、アミノ酸配列に基づき、グループI、II、IIIに分けられる。今まで、グループIから7種、グループIIから4種のPFKの立体構造が決定されており、そのすべてを表1-1で表した。

グループIのPFKは、活性中心に様々なリガンドが結合した複合体の立体構造の決定により、ATP-PFKの構造的な反応メカニズムは明らかになっている。また、アロステリック酵素であるATP-PFKのエフェクター結合部位に活性化剤(PDB ID 1pfk, 4pfk, 3o8o)および阻害剤(PDB ID 6pfk)が結合した構造もすでに分かっている。

## PFK のアロステリックメカニズム

大腸菌由来のPFK(EcPFK、グループI)活性化状態(R状態)と、*Bacillus stearothermophilus*由来の不活性化状態(T状態、グループI、Phosphoenolpyruvate(PEP)結合)の構造を比較し、PFKの構造の変化によるアロステリックメカニズムが明らかになっている(Schirmer and Evans 1990)。これら2種のPFKのアミノ酸配列同一性は54%で、その単量体の構造はよく似ている。しかし、活性化剤、または、阻害剤が結合するエフェクター部位に結合するリガンドによって、R状態かT状態かは区別される。4つの同一なサブユニットからなるPFKはダイマーとして動き、PEPが結合したT状態はR状態に対して、2量体ずつダイマーが7°回転する。R状態ではダイマー同士の境界に水分子が入って、この水と水素結合するが、T状態になると水分子は除去され、直接的に水素結合することになり、これはダイマー同士の境界に結合するF6Pの結合部位を狭くさせ、結合しにくくする効果を持つ。阻害剤の結合により、R状態からT状態が安定化することにより、4つのサブユニットのF6P結合部位の構造が変わり、PFK酵素は不活性になる。この現象は、解糖系のアロステリック酵素として働くPFKの不活性化により、糖代謝が働かないように調節する

ことに直接つながっている。

アロステリック酵素ではない ATP-PFK もあるが (Hansen and Schonheit 2000, Ding et al. 2001)、多くの ATP-PFK は F6P を FBP にリン酸化する反応が不可逆であるため、アロステリック酵素として働く。しかし、PPi-PFK のリン酸化反応は可逆であり、アロステリックな働きをしない。そこで、TPFP の構造を解明することにより、グループI の アロステリック PFK と構造的な比較をすることができるため興味深い。

また、*B. burgdorferi* (ライム病) (Fraser et al. 1997)、*Giardia lamblia* (ランブル鞭毛虫) (Phillips and Li 1995)、*Toxoplasma gondii* (Peng and Mansour 1992)、*Entamoeba histolytica* (アメーバ赤痢) (Susskind et al. 1982) などの PPi-PFK は、ヒトが PPi-PFK を持たないため、PPi-PFK はその阻害剤・不活性化剤を得る目的で、創薬の有望なターゲット分子として注目されている。

## 目的

今まで、PPi-PFK の立体構造が報告されているのはグループII の3種 (PDB ID 2f48、3k2q、3hno) のみで(図4)、リン酸供与体であるPPi との複合体の構造も得られておらず、PPi-PFK の反応メカニズムはまだ解明されてない。*T. tenax* 由来の PPi-PFK (TPFP) はグループIII に属し、このグループの酵素に関しては立体構造解析の報告がないため、その解明が望まれている。本章では、他のグループと異なるグループIII の構造的な特徴、様々な複合体の立体構造解析による PPi-PFK の反応メカニズムとリン酸供与体基質の認識機構などを調べるため、グループIII に分類される TPFP の構造解析を試みた。

## 材料

制限酵素はロシュダイアグノスティクスより、プラスミドの抽出は Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System (Promega) を利用した。特に記述しない限り、大腸菌の培地にはすべて LB (Luria-Bertani) 培地(DIFCO)を用いて、オートクレーブ滅菌して用いた。試験管培地は水槽式インキュベーター(タイテック)を使用し、大量培養の場合は、低温恒温槽付回転式しんとう培養機(高杉製作所)を使用した。抗生剤(アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン)、Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)、 $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide ( $\beta$ -NADH)はすべて和光純薬より購入した。Aldolase、Triosephosphate isomerase (TIM)、 $\beta$ -glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GA3P)は Sigma-Aldrich より購入した。

## 実験器具

吸光光度計 V-550 (JASCO)、Benchmark Plus (BIO-RAD)、Nanodrop ND-1000 を活性測定、濃度測定などに使用した。超音波破碎機は BIORUPTOR UCW-201型 (COSMO BIO)、SONIFIER 250D (BRANSON) を使用した。

## 菌株および発現プラスミド

*Thermotoga maritima* 由来の ATP-PFK (MPFK)、PPi-PFK (MPFP) と *Thermoproteus tenax* 由来の PPi-PFK (TPFP) の組み換え酵素は *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL (BL21(DE3) C<sup>+</sup> RIL) 株を用いて発現した。発現プラスミド pET21a(+)/TPFP (pTPFP) は前任者である遠山が作成したものをを用いて、pET21a(+)、pET28a(+))は Novagen より購入した(図1-1)。 *T. tenax* の genomic DNA は NBRC (Nite Biological Resoure Center) より購入した。精製したプラスミドは酵素名の前に p を付けて表す。

## 組み換え大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

TPFP 発現プラスミドは DNA 溶液として保存されておらず、組み換え大腸菌のグリセロ

ールストックの形で保存されていたことから、グリセロールストックから 5 ml LB (100 µg/ml アンピシリン、50 µg/ml クロラムフェニコール入り)を用いて一晩培養した。この培養菌体からプラスミド精製を行った。

### プラスミドの確認

pTPFP は制限酵素 (BamHI、シングルカット)によりプラスミドのサイズを確認した。その DNA 配列は FASMAC の場合、300~600 ng のプラスミドと 6.4 pmol のプライマー (T7 promoter と T7 terminator)をそれぞれ混ぜて全量が14 µl になるようにし、MACROGEN JAPAN では、最終濃度 50 ng/µl 以上のプラスミドと 5 pmol/µl のプライマー (T7 promoter と T7 terminator)をそれぞれ1:0.7の比率で混ぜて全量が10 µl 以上になるように溶液を用意し、pTPFP の ORF の全塩基配列を読んだ。

### 相同性検索および配列比較

相同性検索には PSI-BLAST を用いて GeneBank、EMBL を検索した。アミノ酸のマルチアラインメントは ClustalW2 の結果をもとに ESPrpt 2.2 を用いて行った。pTPFP の DNA 配列を読んだ結果は NCBI の blastn を利用して確認した。

## 1-1 TFPF の発現と精製方法

本研究の主な目的であるX線構造解析のためにタンパク質の結晶化を行う。良質の結晶を得るためには、高純度の大量のタンパク質が必要である。そのために、まず、このタンパク質が最も発現できる発現条件を検討し、大量培養と精製を行った。

### 1-1-1 TFPF の発現確認

pET21a+ を発現ベクターとして用い、大腸菌を形質転換した。TFPF の組み換え酵素の発現に、BL21(DE3)C<sup>+</sup> RIL 株を用いた。一晚培養した前培養液 30  $\mu$ l を 3 ml の LB 培地に植菌し、37°C で2時間振とう培養した後、終濃度 0.5 mM IPTG を加えた。IPTG 誘導後37°C でさらに3時間培養した後、培養液を 15,000 g 5分間の遠心して集菌し、150  $\mu$ l の 20 mM Tris-HCl (pH8.0)で懸濁した。懸濁液を10分間超音波破碎した後、15,000 g 15分間の遠心をして上清と沈殿に分けた。上清はさらに 70°C で10分間熱処理し、15,000 g 15分間の遠心の後、上清を採取した。

### 1-1-2 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (Laemmli 1970)の方法に従って行った。サンプルは泳動前にサンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl(pH6.8)、4% (w/v) SDS溶液、10% (w/v)スクロース、0.01% (w/v) BPB(ブロモフェノールブルー)、10 % (w/v) 2-メルカプトエタノール)を加えて5分間煮沸した。

### 1-1-3 TFPF の活性測定

PFK 活性の測定は Siebers (Siebers and Hensel 2001)や Ding (Ding et al. 2001)らの方法に従って行った。活性測定溶液の組成は 30 mM Buffer、175 mM KCl、1 mM F6P、0.2 mM  $\beta$ -NADH、1 mM PPI、0.3 U aldolase、10 U TIM、1 U GA3Pからなる。Buffer は測定温度である50°Cで pH に合わせるために調整して、Tris-HCl (pH7.5)を作った。この活性測定方法は、解糖系において PFK の直後に存在する aldolase、TIM や GA3P をカップリ

ング酵素として過剰量加えることで NADH による吸収を検出するものである(図1-2)。390  $\mu\text{l}$  の活性測定溶液をガラスセルにいれ、1分間50°Cで保温した。その後、10  $\mu\text{l}$  の酵素を加え反応を開始した。反応および測定は50°C温調セル内で行い、1 unit は1分間あたりの1  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -NADH を消費する酵素量と定めた。

#### 1-1-4 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA 法(BCA protein assay reagent A and B, PIERCE)によって行った。スタンダードにはウシ血清アルブミン(PIERCE)を用いて、検出にはマイクロプレートリーダーを利用し 562 nm で測定した。

#### 1-1-5 TFPF の大量発現

TFPF の組み換え酵素の発現は BL21 (DE3) C<sup>+</sup> RIL 株を用いた。100  $\mu\text{g/ml}$  アンピシリン、50  $\mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコールを含んだ1 L の培地に前培養液を10 ml 植菌し、37°Cで培養した。O.D.<sub>660</sub>が~0.6 となった時点で IPTG を最終濃度 0.5 mM となるように加えて酵素の発現を誘導し、37°Cでさらに4時間培養し、6000 gで10分間遠心して集菌した。大量培養した組み換え大腸菌体を菌体重量の10倍の緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM PMSF) に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎を行った後、14000 g、30 min、4°Cで遠心した。上清の可溶性画分を粗酵素液とした。

#### 1-1-6 TFPF の熱安定性

超好熱性古細菌である *T. tenax* 由来の酵素であるため、組み換え菌体の組抽出液を用いて70°Cで熱処理し、熱に対する安定性を調べるため、70°Cで10~30分間熱処理し、残存活性を測定した。

#### 1-1-7 TFPF の精製

水槽式インキュベーターで上清液を野生型酵素の場合は70°C、変異酵素の場合は60°C

でそれぞれ30分間熱処理を行い、14,000 gで30分間遠心して上清を回収した。これを MILLEX-HV 0.45  $\mu\text{m}$  Filter Unitを用いて微粒子を除去した後、イオン交換カラム(DEAE Sepharose)と疎水性カラム(Phenyl Toyopearl)クロマトグラフィーにより精製した。活性画分は SDS-PAGE で純度を確認した後、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて脱塩し、30K の Amicon Ultra (Millipore)を使って濃縮した。

### **DEAE Sepharose カラムクロマトグラフィー**

次の手順で行った。

- ① DEAE Sepharose Fast Flow のレジンを(GE Healthcare)をカラムに充填し、20 mM Tris-HCl (pH8.0)で平衡化
- ② 熱処理した粗酵素液を①に添加した後、20 mM Tris-HCl (pH8.0)で非吸着画分を溶出
- ③ 0.3 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH8.0) の濃度勾配を用いて吸着画分を溶出
- ④ 活性測定を行い、PFK 活性を示した画分を集めた。

### **Phenyl Toyopearl カラムクロマトグラフィー**

次の手順で行った。

- ① Phenyl Toyopearl Fast Flow のレジンを XK-16 カラムに充填し、1 M 硫酸アンモニウムを含む20 mM Tris-HCl (pH8.0)で平衡化
- ② DEAE Sepharoseカラムクロマトグラフィーの活性溶出画分に硫酸アンモニウム濃度が1 M になるよう調整したものをカラムに添加し、1 M 硫酸アンモニウムを含む20 mM Tris-HCl (pH8.0)で非吸着画分を溶出
- ③ 20 mM Tris-HCl (pH8.0)を用いて濃度勾配法で吸着画分を溶出
- ④ 活性測定を行い、PFK 活性を示した画分を集めた。

## 1-2 TFPF の結晶化と構造決定

TFPF の X 線構造解析を行うため、高分解能の回折を与える良質の結晶を得ることが必要である。そのため、精製した TFPF を用いて結晶化スクリーニングを行った。

### 1-2-1 結晶化条件のスクリーニングおよび最適化

TFPF の結晶化条件のスクリーニングに適したタンパク質濃度を決定するために、PCT Kit (Pre-Crystallization Test, Hampton Research (HR))を用いた。次に、以下に示すシッティングドロップ蒸気拡散法に基づき、Index kit (HR) を用いて第一段階スクリーニングを行った。

精製、脱塩、濃縮した 10 mg/ml 以上の酵素を用意して、

1. 96 Well Protein Crystallization Plate 各スクリーニングキットを用意
2. リザーバーチャンバーにスクリーニングキットの溶液を 100  $\mu$ l 分注
3. 96 Well Protein Crystallization Plate のドロップチャンバーに酵素溶液を 1  $\mu$ l ずつ入れる。
4. 3. にリザーバー溶液 1  $\mu$ l 入れて混合する
5. Clear Seal Film (HR) を用いて 96 Well Protein Crystallization Plate を密閉
6. 25°C に静置して結晶ができるまで観察

ここで結晶が得られた条件を出発点として、沈澱剤濃度、バッファ pH、タンパク質濃度で仕込み、再現性が良く X線回折に適した結晶が得られる条件を調べた。その後、リガンド非添加条件(リガンドフリー)と共結晶による様々な複合体を試みた。

### 1-2-2 X線回折データ収集

放射線による結晶の損害を防ぐために、95~100 K の窒素ガスでフラッシュクーリングした。また、低温での結晶の凍結を防ぐために、抗凍結剤(Cryo Protectant Buffer)としてリガンドフリー状態の結晶は 20% グリセロール、複合体の結晶は 20% MPD (2-methyl-2,4-



pentanediol)を含むリザーバー溶液に結晶を浸透させた後、1.0 Å の波長でデータ測定を行った。測定を行う前に、以下に記述する前処理を行った。

1. 3 Well Spot Plate (HR) のウェルに結晶化リザーバー溶液を 100 µl 入れた。各ウェルの抗凍結剤の濃度を少しずつ上げ、終濃度を20%にした。
2. 結晶化プレートから結晶をすくい、ウェルのリザーバー溶液に回収した。準備した5、10、20%のグリセロール及び MPD を含む結晶化溶液にステップワイズ法で順に移して結晶に抗凍結剤の濃度を上げた。
3. 結晶をクライオループ(HR)にマウントし、100K のN<sub>2</sub>ストリームの中に設置して瞬間的に冷却し、X線を照射して回折データイメージを測定した。

### 1-2-3 TFPF の初期構造構築

分子置換による初期構造決定—分子置換法 (Molecular Replacement, MR) は既知の類似タンパク質の構造とX線回折強度データを用いて位相を決定する簡便な手法である。分子置換法の第1段階は、アミノ酸配列の相同性が高い(30% 以上)、すなわち類似の構造を持っている可能性が高い既知構造をサーチモデルとして、サーチモデル分子が結晶中でどのように並んでいるのか探す。この時、結晶中に配置されたサーチモデル分子から計算される X線回折像と、実際に測定された回折像との差が小さくなるように配置する。この配置されたサーチモデルから算出される位相を初期位相とする。TFPF の分子置換を CCP4 (Bailey 1994)パッケージ中のプログラム MoLREP (Vagin and Teplyakov 1997)、BALBES (Long et al. 2008)で行った。このうち、BALBESでは TFPF のアミノ酸配列を基にサーチモデルが決定されるが、サーチモデルとして TFPF と 35% のアミノ酸配列の同一性を有する大腸菌の ATP-PFK 構造を用いられた。BALBES により得られた位相と、TFPF の回折データから得られた情報から BUCCANEER (Cowtan 2006)によって初期構造を構築を試みた。

### 1-2-4 モデルの修正と精密化

分子置換法により初期構造を決定したが、その構造は不完全であるため、Arp/wArp (Greaves et al. 1999)を用いてもう1回自動モデル構築を行った。その後、Refmac5 (Murshudov et al. 1997)で自動精密化を行い、プログラム COOT を用いて電子密度マップを可視化し、電子密度マップに合うように構造モデルを構築修正した。構築したモデルについて Refmac5 で自動精密化を繰り返して行うことによって R値および Rfree値が下がった最終構造が得られた。

### 1-2-5 構造解析

本研究で得られたTPFP の全体構造の新規性や有意性を解析するためにDali Server を用いた。また、TPFP の立体構造に関するすべての図は Pymol (DeLano 2004)を用いて描いた。

### 1-2-6 基質複合体の構造解析

基質特異性が高いTPFP の基質認識部位と反応メカニズムを明らかにするため、PFK の基質である F6P、また、TPFP のリン酸供与体基質である P<sub>Pi</sub>・Mg 、および本酵素の反応産物であるP<sub>i</sub>・Mg、と FBP の複合体の構造解析を行った。TPFP の様々な複合体は共結晶化法(結晶化前にあらかじめ基質を添加しておく方法)により行った。

## 1-3 TFPF の変異体作成

これまでの研究で用いた TFPF 全長配列が含まれるプラスミドから発現したものである。立体構造解析済みの PFK を用いてアミノ酸配列アラインメントを行い、グリシンモチーフと活性部位モチーフに属する D102、K123 と、Hairpin loop の先端に位置する Y232 の変異体を作成した。

### 1-3-1 変異体作成に用いた DNA ポリメラーゼ

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara、酵素自体が有する高いプライミング効率と独自の伸長因子の添加により、アニーリング時間と伸長時間を大幅に短縮した PCR 増幅システム) は独自のプライマー設計を行うことにより PCR の過程で PCR 産物が環状構造になる。プロトコールによるプライマー設計方法は、まず、変異部位を中心にしてオーバーラップ領域を15塩基選定し、次に変異部分から3'側に18塩基伸ばしたものをプライマー配列として選択した(表1-5A)。PCR 反応液組成は PrimeSTAR Max premix (最終濃度 1x)、プライマー1&2(各0.2 μM) とテンプレート DNA (10 pg~10 ng)からなり、これを 98°C 10秒、55°C 15秒、72°C 5秒./kb の3ステップで30回 PCR した(表1-5B)。

KOD-Plus (Toyobo、超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株由来の KOD DNA Polymerase をベースに開発された PCR 用酵素)も使用した。プライマーは PrimeSTAR® Max DNA Polymerase の場合と同じものを用いた。PCR 反応液組成は 10× PCR Buffer for KOD –Plus (最終濃度 1x)、2 mM dNTPs (0.2 mM)、25 mM MgSO<sub>4</sub> (1.0 mM)、プライマー 1&2(各0.3 μM)、テンプレート DNA (1~50 ng/50μl)、そして、KOD –Plus (1 U/50μl)からなる。そのPCR 条件は 94°C 15秒、60°C 30秒、68°C 1分./kb の3ステップで30回 PCR した(表1-5B)。

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase と KOD-Plus から変異体作成に失敗した後、試したのが PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara、増幅が困難であった GC リッチな鋳型において、バッファーの変更や特別な反応条件の設定を行う必要はない)である。PCR 反応液組成は 5 × PrimeSTAR GXL Buffer (最終濃度 1x)、dNTP Mixture (200 μM)、プライマー1&2 (各0.3 μM)、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/50 μl)、テンプレート(10 pg ~ 10 ng)からなる。そのPCR 条件は 98°C 10秒、60°C 15秒、68°C 1分./kb の3ステップで30回 PCR した(表1-5B)。

#### 1-4 TFPF のHis タグ融合発現ベクターへの乗せ変え

In-Fusion クローニングは相同配列の融合により、目的遺伝子のPCR断片を目的ベクターに簡便・迅速にクローニングできる方法で、TFPF のベクターを pET21a+ から pET28a+ へと変えた。ベクター上の挿入したい位置の両側15塩基とそれぞれ相補的な配列を付加したインサートのプライマーを設計した(図1-3)。ベクターとインサートのプライマーを PCR で

それぞれ増幅させ、インサートをエンハンサー(PCR産物をそのまま In-Fusion 反応に使用するための前処理試薬)処理した。そして、ベクターの PCR 産物、エンハンサー処理したインサート断片、5 × In-Fusion® HD Enzyme Premix と水を加え反応させリコンビナントベクター(TPFP-pET28a+)を完成した。この時、N-、C-末にそれぞれ his tag を付けた N-his tag TPFP(N-TPFP)、C-his tag TPFP(C-TPFP) のプラスミドを作成し、In-fusion 反応させた(図1-4)。BL21(DE3) C<sup>+</sup>-RIL に形質転換し、N-TPFP、C-TPFP タンパク質の熱安定性を調べた(図1-5)。

## 結果と考察

### 1-5 TFPF の精製

TFPF の発現系は、前任者である遠山により構築されており、培養の時間 ( $OD_{660}=0.6$ 、約3時間)、タンパク質誘導の時間 (0.5 mM IPTG、4時間)などを検討した後、大量発現 (1 L)した。

熱処理、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーにより精製を行い(図1-6)、その純度を SDS-PAGE で確認した(図1-7)。そして、この精製段階における精製表を表1-6 に示した。熱処理によって大腸菌由来のタンパク質は多く除去され、続いたカラムクロマトグラフィーにより純粋な目的のタンパク質を得ることができた。

### 1-6 TFPF の結晶化条件の探索結果

リガンドフリー型結晶の場合、試したスクリーニング条件の中で得られた結晶は大きく、良質のように見えたが、できた結晶はただ1つだけで、細かく刻んだ沈澱剤濃度と pH、そして、タンパク質濃度を試して再現性のある結晶が得られる条件を探索した。しかし、再現性がよく、より良い結晶を得ることができなかつたため、さらに、スクリーニングキットを用いて結晶の条件を探索した結果、1日から4日の間で多数の結晶を得ることに成功した(図1-8)。共結晶によるリガンド複合体の結晶を得ることも成功した。すべての結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法により行い、25°Cに静置した。

リガンドフリー型 TFPF 結晶は 9 mg/ml のタンパク質 1  $\mu$ l とリザーバー溶液 (0.2 M Trimethylamine *N*-oxide、0.1 M Tris pH 8.5、20% (w/v) PEG MME 2000)を 1  $\mu$ l を混合した。3 週目で結晶が観察された(図1-8A)。

FBP 複合体の TFPF 結晶は 11 mg/ml タンパク質を用いて共結晶した。この試料溶液 1  $\mu$ l とリザーバー溶液 (0.1M tri-sodium citrate dehydrate pH 5.6、10% v/v iso-propanol、10% w/v PEG 4000)を 1  $\mu$ l 混合してから、4日目で結晶が観察された(図1-8B)。

Pi·F6P 複合体の TFPF 結晶は 13.5 mg/ml タンパク質を用いて共結晶した。この試料溶

液 1  $\mu\text{l}$  とリザーバー溶液 (0.1M tri-sodium citrate dehydrate pH 5.6、10% v/v isopropanol、10% w/v PEG 4000)を 1  $\mu\text{l}$  混合してから二日目で結晶が観察された(図1-8C)。

PPi·Mg複合体の TPFp 結晶は 13 mg/ml タンパク質を用いて共結晶した。このタンパク質溶液 1  $\mu\text{l}$  とリザーバー溶液 (0.1M tri-sodium citrate dehydrate pH 5.6、10% v/v isopropanol、10% w/v PEG 4000)を 1  $\mu\text{l}$  混合してから 二日目で結晶が観察された(図1-8D)。

## 1-7 TPFp の構造解析の結果と考察

X線回折データは高エネルギー加速器研究機構(つくば)のビームラインPF BL-5A、AR NE-3Aと 大型放射光施設 SPring-8(スプリングエイト、Super Photon ring-8 GeV、兵庫県)のビームライン BL38B1で行った。回折データの処理はHKL2000 を用いた。

### 1-7-1 TPFp の初期構造の構築

TPFP 結晶の空間群は  $P2_12_12_1$  で、溶媒含量および  $V_m$  値から、非対称単位中に4分子の TPFp の単量体を含むと見積もられた(溶媒含量38.6%、 $V_m$ 値  $2.0 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ )。

当初、既知の立体構造の中で最も高い38%のアミノ酸配列の同一性を持つグループI の *G. stearothermophilus* 由来 ATP-PFK (PDB ID 1MTO) をサーチモデルとして、プログラム MOLREPで分子置換による初期位相の決定を試みたが、分子置換の解を得られなかった。そこで Se-Met TPFp を作成し MAD法(Multi-wavelength Anomalous Diffraction method; 多波長異常分散法)による構造解析を目指したが、Se-Met TPFp は熱に不安定で、結晶を作るのに適当な純粋なタンパク質までの精製が困難であった。次に、MOLREPとは異なるアルゴリズムを用いるプログラム BALBES を用いて分子置換を試みた。

BALBES は TPFp のアミノ酸配列の情報を利用し、PDB からもっとも適切なサーチモデルを選択した後、そのアミノ酸配列を TPFp のものに置換したものをサーチモデルとして分子置換を行った。その結果、TPFP と35%のアミノ酸配列の同一性を持つグループI の大腸菌 ATP-PFK (EcPFK)が選択された。BALBES により分子置換に成功し非対称単位に3分子のEcPFK が入った解が得られた。しかし、溶媒含量および溶液中の存在状態から

TPFP の非対称単位中には4分子が含まれることが見込まれたため、プログラム MOLREP を用いて更に大腸菌 ATP-PFK 分子を置換したところ、4分子目の解が得られた。初期位相を決定し、プログラム BUCCANEER で主鎖構造を構築した後、側鎖構造を帰属した。

### 1-7-2 各 TPFP の構造データ

非対称単位中には4つの TPFP 分子(A~D) が含まれ、これらのサブユニットには特筆すべき構造の違いは見られなかった (root mean square deviation (RMSD) < 0.3 Å)。野生型 TPFP とその変異体の X 線回折データ測定と精密化の統計値を表1-2に示す。

1. リガンドフリー TPFP の構造は空間群  $P2_12_12_1$  (格子定数  $a = 68.9 \text{ \AA}$   $b = 128.6 \text{ \AA}$   $c = 133.1 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) に属し、2.35 Å 分解能まで回折し、 $R$  因子は18.9% ( $R_{\text{free}} = 26\%$ )まで精密化した。最終モデルには、4つのサブユニットの中で、A には1-333、Bには1-225、228-334、C には1-225、229-337、そして D には1-333の残基と362個の水分子が含まれている。
2. FBP 複合体は空間群  $P2_12_12_1$  (格子定数  $a = 68.9 \text{ \AA}$   $b = 129.2 \text{ \AA}$   $c = 132.5 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) に属し、1.8 Å 分解能まで回折した。 $R$  因子は18.9% ( $R_{\text{free}} = 24.6\%$ )まで精密化した。最終モデルには、4つの各サブユニットに FBP 分子が結合し、A、C、D のサブユニットは Na 分子を含んでいる。また、A サブユニットは1-333、B は1-225、228-333、C は1-337、そして D は1-333の残基と MPD 分子は5個、そして717個の水分子が含まれている。FBP は A と C、B と D 2つのサブユニットの境界に位置し、サブユニット間の相互作用をする。リガンドフリー状態の構造との違いは特になかった。
3. Pi と F6P の複合体は空間群  $P2_12_12_1$  (格子定数  $a = 68.9 \text{ \AA}$   $b = 129.6 \text{ \AA}$   $c = 132.7 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) に属し、1.9 Å 分解能まで回折した。 $R$  因子は16.7% ( $R_{\text{free}} = 21.7\%$ )まで精密化し、各サブユニットに Pi と F6P が結合している。また、A サブユニットは1-334、B は1-334、C は1-337、そして D は1-333の残基と6個の MPD 分子、659個の水分子が含まれている。5 mM F6P、2 mM PNP (imidodiphosphate sodium salt、PPi のアナログ)、1 mM  $\text{MgCl}_2$ を入れた共結晶により得られた結晶であったが、PNP が分解されてしまったのか、電子密度では Pi だけが見えた。また一緒に入れたマグネシウムも濃度が低かったためか、電子密度は見えなかった。

4. PPI とマグネシウムの複合体も同じ空間群  $P2_12_12_1$  (格子定数  $a = 69.5 \text{ \AA}$   $b = 128.3 \text{ \AA}$   $c = 133.0 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ )に属し、 $1.6 \text{ \AA}$  分解能まで回折した。 $R$  因子は19.7% ( $R_{\text{free}}=22.9\%$ )まで精密化し、各サブユニットには PPI とマグネシウムが結合している。また、A サブユニットは1-334、B は1-333、C は1-337、そして D は1-333の残基と 6個 MPD 分子、714個の水分子が含まれている。

複合体構造に結合しているすべての MPD 分子は拮抗剤(cryo-protectant buffer)から来たものである。

1)リガンドフリー状態、2) FBP との複合体、3) Pi と F6Pの複合体、4) PPI とマグネシウムとの複合体、4つの異なる TFPF 複合体構造を決定した。TFPF の全体構造およびドメインなど構造の新規性や有意性を解析するために Dali Server を用い、その結果は表1-3である。

### 1-7-3 リガンドフリー状態 TFPF 全体構造

TFPF のリガンドフリー状態は、非対称単位中に TFPF 四量体存在し、これを形成する4つのサブユニットに構造の違いは見られなかった(root mean square deviation (RMSD) $< 0.3 \text{ \AA}$ )。TFPF の構造は  $\alpha/\beta/\alpha$  フォールドの N 末ドメイン(残基番号1-128、271-317)と C 末ドメイン(残基番号129-270、318-337)からなっている(図1-9)。C 末ドメインからは PFK グループII の特徴と思われた Hairpin loop(*B. burgdorferi* 由来の PPI-PFK 構造(Moore et al. 2002)から名付ける)があり、このループの先端に位置する Y232 は N 末ドメインまで達している。リン酸供与体に対して確実に異なるアミノ酸を持つ2つのモチーフ(グリシンモチーフ(GGXX)と活性部位モチーフ(PXTIDND)は N 末ドメインに含まれ、C 末ドメインとの境界に位置し、すべての PFK に強く保存されている。

TFPF を含め、今まで構造が解かれている11種の PFK とのアミノ酸配列のアラインメントにより、グリシンモチーフの4番目のアミノ酸は、ATP-PFK ではグリシンであり、PPI-PFK ではアスパラギン酸である。また、ATP-PFK ではほぼグリシン(アラニンの場合もある)であり、PPI-PFK の場合はリジンになっている(図1-10)。DALIサーバーを用いた類似構造検索により、TFPF は分子置換した*Geobacillus stearothermophilus* と最も似ている(PDB ID 3pfk、Z スコア=40.5、対応する312残基の  $\text{Ca}$ 原子に対する RMSD=1.7  $\text{\AA}$ )が(表1-3)、ここ



では TPFp との構造的な特徴を調べるため、グループI の中で最もよく研究されており、各種の主要な基質およびリガンドとの複合体の構造が報告されている *E.coli* 由来の PFK (ATP-PFK、EcPFK ; PDB ID 1pfk ; ADP、Mg、FBP 複合体、Z スコア=39.8、対応する 312残基の C $\alpha$ 原子に対する RMSD=1.8 Å)と比較した(図1-11)。EcPFK は非対称単位中には2量体を形成しているが、生物学的単位は4量体である。TPFP と EcPFK の重ね合わせにより、TPFP の Hairpin loop の先端に位置する Y232 は EcPFK に結合している ADP のアデニンと立体障害を起こし、そして、グリシンモチーフの4番目アミノ酸 D102 の側鎖も ADP の  $\alpha$ -リン酸と立体障害を起こす。そのため、大きい分子である ATP が結合できる構造的な空間を Y232 と D102 により制限されるので、リン酸供与体として PPi-PFK であると考えられる。

#### 1-7-4 FBP 複合体の TPFp

リガンドフリーTPFP と FBP 複合体の全体的な構造の違いは特になかった。FBP は2つのドメイン(N、C 末ドメイン)の間の空間に結合していて、隣接のサブユニットとも相互作用をする。FBP に対応する明瞭な電子密度が確認され(図1-12)、このリガンドと直接的に水素結合し相互作用する残基として R70、T124、D126、G169、R170、E220、H263、R266 と隣接のサブユニットからの R161 と R257 を確認した。これらの多くは、PFK に保存されるアミノ酸で、1988年に報告された EcPFK に結合したリガンド FBP を認識するアミノ酸残基 (Shirakihara and Evans 1988)とも一致した。そして、グループI の EcPFK、GsPFK (*G. stearothermophilus* 由来 ATP-PFK )と グループII の BbPFK (*B. burgdorferi* 由来 PPi-PFK)、TbPFK (*T. brucei* 由来 ATP-PFK)と TPFp とのアミノ酸アラインメントを示し、EcPFK に結合した ADP・Mg・FBP と相互作用するアミノ酸を表した(図1-13)。すべての PFK に強く保存される D128、M168 は FBP と水分子を介して水素結合を形成する(図には示さない)。ここでは、改めて TPFp の FBP と直接に相互作用するアミノ酸残基とグループI とグループII からの PFK とのアミノ酸比較を表1-4Aに示した。その結果、グループI (EcPFK、GsPFK)とは該当するすべての残基が一致することが分かった。

### 1-7-5 Pi・F6P 複合体の TFPF

精製された TFPF の濃縮液に酵素反応基質である F6P、PNP (imidodiphosphate sodium salt、PPi のアナログ)と MgCl<sub>2</sub> を入れ、共結晶化を行った。得られた結晶は F6P と PNP の複合体の結晶であると期待されたが、F6P と Pi に対応する明瞭な電子密度だけが確認された(図1-14B)。Pi と水素結合するアミノ酸は G100、D102、T103、そして K123 が確認された。リン酸供与体基質の一部の Pi の結合は FBP 複合体構造との比較により全体構造には大きな変化は示さなかったが、K123 だけが Pi と直接的に結合することになり、活性中心の方に少し引っ張られていた。K123 は PPI-PFK の反応後の Pi の安定的な結合に寄与したり、または、F6P の水酸基よりプロトンを引き抜く一般塩基として働く D126 と共に、K123 は PPI にプロトンを供与し、PPI-PFK 反応を促進すると考えられた (Xu et al. 1994)。Pi・F6P 複合体の構造決定により PPI-PFK の反応後の Pi の安定的な結合に寄与する構造的な証拠が得られた。R70、D126、G169、E220、H263、R266 と隣接のサブユニットからの R161、R257 が F6P と水素結合していた(図1-14C)。特に、FBP の1位リン酸(1-Pi)、6位リン酸(6-Pi)と、Pi・F6P 複合体構造から反応後の Pi (Distal Pi と名付ける)の3つのピロリン酸位置が初めて特定できた(図1-15A)。

### 1-7-6 PPI・Mg 複合体の TFPF

TFPF は PPI-PFK としては4番目に解かれた構造で、グループIII では初めてであり、さらに、基質 PPI と金属イオンMgが結合した構造としても初めてである。PPI と Mgに対応する明瞭な電子密度が確認された(図1-16B)。PPI・Mg の結合位置は EcPFK に結合している ADP・Mgから説明できる。Distal Pi は ADP の β-Pi のところに位置し、Proximal Pi は FBP の1-Pi に位置した(図1-17)。

PPI・Mg 複合体構造もリガンドフリー、FBP 複合体、そして Pi・F6P の複合体との全体的な構造の違いは特に示さない。ただ、結合したリガンドに対する B-factor を調べたところ、リガンドフリーよりは複合体が、そして、リン酸供与体の基質が結合した場合がもっとも安定であることが分かった(図1-18)。また、Pi・F6P 複合体構造では Distal Pi と直接的に結合した K123 は、水分子を介して PPI と結合することが分かった。

PPI はG10、R70、T103、T124、D126、そして R170 が直接に水素結合している。マグネ

シウムは P<sub>Pi</sub>、D101と周りの3つの水分子と結合していた。P<sub>i</sub>・F6P と FBP との結合するアミノ酸比較により R170、T124 が Proximal P<sub>i</sub> を認識し、K123 は Distal P<sub>i</sub> を認識に直接的に相互作用することが分かった。

この複合体構造から分かった P<sub>Pi</sub>・Mg と直接に相互作用するアミノ酸残基とグループI とグループII からの PFK とのアミノの酸比較を表1-4Bに示した。また、TPFP の分子表面からは、Hairpin loop が活性中心を完全に覆っていることが分かった(図1-19)。

### 1-7-7 他の PFK との比較

TPFP と他のグループの PFK と活性部位を比較した。

P<sub>Pi</sub>・Mg 複合体のTPFP と ADP・Mg(M2)・FBP 複合体の EcPFK(グループI) の活性部位を重ね合わせた(図1-20A)。TPFP の Distal P<sub>i</sub>、Mg(M1)、Proximal P<sub>i</sub> はそれぞれ EcPFK のβ-リン酸、Mg(M2)、FBP の1-リン酸と相応する位置であることが分かった。また、TPFP のグリシンモチーフの3番目のアスパラギン酸(D101)は M1 と水素結合することが分かった。D101 はマグネシウムが結合してない時は、活性中心から約80°外側に向いている。

P<sub>Pi</sub>・M1 複合体の TPFP と ATP・Mg(M3)複合体の TbPFK(*T. brucei* 由来 ATP-PFK、PDB ID 3f5m、グループII) の活性部位を重ね合わせた(図1-20B)。M1 は P<sub>Pi</sub> と周りの3つの水分子、そして D101 と水素結合し、EcPFK の M2 も同様であった。しかし、TbPFK に結合した M3 は M1 に対して3.9 Å離れたところに位置し、ATP の3つのリン酸と Hairpin loop に属する D343 と水素結合した。グループI のPFK は Hairpin loop を持たないため、結合したリガンドが ATP・Mg の場合でも TbPFK のような様子は考えられない。TbPFK はグループII に属し、Hairpin loop を持ち、このループの先端にはセリンが位置する。

P<sub>Pi</sub>・M1 複合体の TPFP と FBP 複合体の BbPFK (*B. burgdorferi* 由来 P<sub>Pi</sub>-PFK、PDB ID 2f48、グループII) の活性部位を重ね合わせた(図1-20C)。TPFP と同様に、Hairpin loop の先端に位置する H384 (TPFP の場合は Y232)と、グリシンモチーフの4番目のアミノ酸 D177 により ATP が結合する場合、立体障害を起こす。

リガンドフリー、FBP 複合体、P<sub>i</sub>・F6P 複合体、そして、P<sub>Pi</sub>・Mg 複合体の構造を決定に

より、酵素反応の過程で各リガンドを認識するアミノ酸は 1988年に報告された EcPFK に結合したリガンドを認識するアミノ酸と一致することを確認した。さらに、基質 PPi を認識するアミノ酸残基 (Distal Pi ; K123、Proximal Pi ; T124、R170)も特定できた。

### 1-7-8 TFPF の反応メカニズムの推測

本研究では、PPi・Mg 複合体を含む各種の複合体構造を決めることで PPi-PFK の反応機構のすべてのステップの構造を推定することに成功した(図1-21)。

1998年、Siebers ら (Siebers et al. 1998)の可逆的な反応をする TFPF の kinetic parameter の報告があった。この報告によると、正反応と逆反応は同様の親和性を示し、PPi、F6P、Fructose 1,6-bisphosphate (FBP)に対する  $K_m$  はそれぞれ、0.023、0.053、0.033 mM であり、Pi に対する  $K_m$  は1.43 mM で親和性が低いことが分かった。PPi-PFK の kinetic mechanism は高速平衡ランダム Bi Bi 機構であると報告している (Reeves et al. 1982, Phillips and Li 1995)。

本研究の TFPF の様々なリガンド結合の構造を高い分解能で決定したことによって、TFPF の反応メカニズムを推測可能になった。正反応の基質である PPi および F6P に対する  $K_m$  値、また、逆反応の場合、PPi と F6P に対する  $K_m$  値に大きな違いがなく、TFPF 酵素の反応はシーケンシャル bi bi 反応機構であり、もっと詳しくいうと高速平衡ランダム Bi Bi 機構であると予想できる。すなわち、TFPF に対して基質 A と B はランダムで結合可能であるが、C と D の順番は決まっていると考えられる。

## 1-8 TFPF の変異体の結果

前任者は PFK アミノ酸配列のアラインメントによりグリシンモチーフ、活性部位モチーフからの D102G、K123A の変異体を作成しており、これをグリセロールストックから引きつけた。大量培養(1 L)の後、熱処理(70°C、30分)した TFPF の活性は熱処理前に比べ約 25%で、さらに、イオン交換カラムクロマトグラフィー(DEAE Sepharose)によって精製したら活性はなくなった。そこで TFPF のプラスミドを精製して BL21(DE3)C<sup>+</sup> RIL に形質転換し、小培養(5 ml)した TFPF とグリセロールストック状態の変異体を培養してそれぞれ70°C

と60°Cで10分間熱処理して比較した(図1-22)。D102G の場合、37kDa の位置にバンドも見え、熱にもある程度は安定のようだったが、ATP-PFK、PPi-PFK どちらの活性も示さなかった。K131A の場合は、37kDa でバンドが見えず、これら変異体のプラスミドを精製してアミノ酸配列を確認するために、全 ORF の配列のシーケンシングを試みたが、配列を読めなかった。そこで、PPi から ATP への基質特異性の変換を起こすと期待される D102G と、TPFP の構造解析から分かった Hairpin loop の先端に位置する Y232 の変異により基質変換または PPi に対する活性の大きな影響を期待し、まず、この2つのアミノ酸の変異体を作成した。

### 1-8-1 変異体の作成

TPFP の全遺伝子配列の GC 含量は約71%であり、変異対象の配列を含むプライマーの配列も特に GC リッチで変異体作成は困難であった。そこで、3種の DNA ポリメラーゼによる PCR 反応液組成および反応条件の中で、テンプレートの濃度やアニーリングと伸長の温度と時間を変えながら、グリシンの4つのコドン(GGT、GGA、GGC、GGG)とアラニンのコドン(GCT、GCC、GCA、GCG)を全部試してみた。多くの条件で PCR した結果は6.4 kb サイズのバンドは見えず、ほぼ同じパターンの2つのバンドが見られた(図1-23)。TPFP は構造からも確認できたが、その配列に異常はなかったので、ベクター(pET21a+)に問題がある可能性を考えた。それで、pTPFP を制限酵素 NdeI、BamHI、EcoRI、HindIII、XbaI でそれぞれシングルカットした(図1-24)。BamHI でカットしたバンドと残り4つの酵素でカットしたバンドの様子が違い、ベクターに何か問題があるのは確かなので、ベクターを変えることにした。

In-fusion 法により新しく作成した N-TPFP、C-TPFP のプラスミドから PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、KOD-Plus、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase を用いて、色々な条件で変異体を作成した。その変異体(D102G、Y232A、Y232G)を大腸菌に形質転換したが、発現できなかった(図1-25)。

## 1-9 構造に関する考察

TPFP の活性中心部位は N と C 末ドメイン間の境界に位置しており、PPi・Mg は N 末ドメインに近い場所に結合する。PPi・Mg 複合体と Pi・F6P 複合体 (Pi は表さない) を合わせて F6P と PPi・Mg の結合した構造を作り、EcPFK の ADP・Mg・FBP 複合体との重ね合わせした。その結果、PPi・Mg は ADP の  $\beta$ -リン酸と、Mg は Mg と、F6P は FBP とほぼ一致した (図1-17)。TPFP の反応産物および生成産物のすべての複合体構造が決定された (図1-21)。これらのリガンドと相互作用するアミノ酸は PFK によく保存されていることが改めて確認され、特に、Gly10、Arg170、Thr124 は Proximal Pi を認識し、Lys123 は反応後の Distal Pi と直接的に相互作用することで安定させる。活性中心を覆うような Hairpin loop のため TPFP の表面からは中はまったく見えない。

また、Arg70 は TPFP の3つの複合体のそれぞれのリガンドと相互作用しており、このアミノ酸は2つの基質を連結する。隣接からの Arg161、Arg257 は F6P (または、FBP) の6-リン酸と相互作用しており、このタンパク質の構造安定にも役割をしている。TPFP は可逆反応をし、アロステリック酵素でないため EcPFK などに存在するエフェクター結合部位は持たないと予想できる。EcPFK と TPFP の全体的な立体構造はよく似ているため、これらのエフェクター結合部位を比較してみた (図1-26)。PFK の活性化剤 ADP・Mg は EcPFK エフェクター結合部位の親水性のアミノ酸残基を水素結合しているが、TPFP の構造では、疎水性のメチオイン (M)、ロイシン (L)、トリプトファン (W) などが位置していることが分かった。

また、PFK はこのエフェクター部位に結合するリガンドにより、活性化状態 (R 状態) と不活性化状態 (T 状態) の構造を取る。T 状態では、R161 と R243 により F6P が結合できない構造になることが分かった。そこで、これら2つの残基に対応する TPFP の残基と比較した結果、TPFP は R 状態の構造であることが分かった (図1-27)。

## 本章のまとめ

超好熱性古細菌 *T. tenax* 由来のピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ (TPFP) の X 線構造解析は、グループ III の PFK として初めて成功し、既知の PFK と構造的な比較が可能になった。TPFP の立体構造はグループ I と同様の  $\alpha/\beta/\alpha$  フォールドの2つのドメイン、N 末ドメインと C 末ドメインからなり、さらに、グループ II の特徴と思われていた Hairpin loop を持つことを明らかにした。グループ III に属する他の ATP-PFK および PPi-PFK のアミノ酸配列からこのループはグループ II と III の特徴であると確認できた。また、グループ I と異なる、グループ II と III だけの特徴として K123 がある。立体構造解析済みの PFK だけのアミノ酸配列の比較と、この残基の役割に関する報告により、グリシンモチーフの D102 と共に K123 は PFK のリン酸供与体の特異性に重要であると考えた。

また、様々な TPFP 複合体構造の決定により、この残基の役割は反応後の Distal Pi の安定的な結合に寄与することが分かった。

TPFP の活性部位と他のグループの PFK の活性部位の比較から、リガンドを認識し、結合する周りのアミノ酸はよく保存されており、構造的にもほとんど同じく位置することが分かった。様々なリガンド結合の構造を高い分解能で決定することによって、他のグループの PFK のリガンド結合構造と比較するとにより、TPFP の構造的な反応メカニズムが推測可能になった。

表1-1 既知 PFK のリスト

Group	由来	リン酸供与体	Oligomer	PDB ID	結合リガンド
I	<i>Escherichia coli</i>	ATP	Tetramer	1pfk	ADP, Mg <sup>2+</sup> , FBP, activator
				2pfk	-
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATP	Tetramer	1mto	F6P
				3u39	-
				6pfk	PGA
				3pfk	phosphate ion
				4pfk	ADP, Mg <sup>2+</sup> , F6P, activator
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATP	Tetramer	4a3s	-
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	ATP	Tetramer	1zxx	-
	<i>Pichia pastoris</i>	ATP	Dodecamer	3opy	ATP
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP	Octamer	3o8o	F6P, F2,6BP
	Rabbit skeletal muscle	ATP	Tetramer	3o8l	ATP, ADP, Pi
	II	<i>Borrelia burgdorferi</i>	PPi	Dimer	2f48
1kzh					sulfate ion
<i>Trypanosoma brucei</i>		ATP	Tetramer	3f5m	ATP, Mg <sup>2+</sup>
				2hig	-
<i>Marinobacter aquaeolei</i>		PPi	Trimer	3k2q	-
<i>Nitrosospira multiformis</i>		PPi	Tetramer	3hno	-



表1-2 TPFs の X 線回折データ測定と精密化の統計値

	TPFP			
	Ligand free	FBP complex	Pi-F6P complex	Mg <sup>2+</sup> -PPi complex
<b>Data collection statistics</b>				
Beamline	PF BL-5A	PF AR -NE 3A	PF AR -NE 3A	Spring-8 BL38B1
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Space group		<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>		
Unit-cell (Å)				
a, b, c	68.9, 128.6, 133.3	68.9, 129.2, 132.5	68.9, 129.6, 132.7	69.5, 128.3, 133.0
Resolution(Å)	50.00-2.35 (2.39-2.35)	36.54-1.8 (1.83-1.8)	50.00-1.9 (1.93-1.9)	50.00-1.6 (1.66-1.6)
Total reflections	341,525	707,748	586,723	1,100,666
Unique reflections	50,544	106,484	92,597	157,112
Completeness(%)	99.9(99.8)	97.1(90.2)	97.5(94.0)	99.9(99.7)
Redundancy	6.8(6.7)	6.6(5.9)	6.3(5.7)	6.6(5.9)
Mean <i>I</i> /σ	21.7(3.2)	30.5(2.7)	17.7(2.2)	19.3(5.3)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	10.1(41.9)	6.4(37.7)	10.1(43.4)	4.1(43.6)
<b>Refinement statistics</b>				
<i>R</i> -factor / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	18.9/26	18.9/24.6	16.7/21.7	19.7/22.9
Bond lengths(Å)	0.017	0.022	0.024	0.022
Bond angles(deg)	1.68	2.0	1.97	2.00
Ramachandran Plot (%)				
Favored	95.53	96.59	96.47	97.00
Allowed	3.48	2.65	2.48	2.03
Outlier	0.98	0.76	1.05	0.98

表1-3 Dali server<sup>c</sup> サーチの結果<sup>a</sup>

	PDB ID	Z-score <sup>b</sup>	RMSD (Å)	対応残基 (a.a)	総残基 (a.a)	配列同一性 (%)	由来	グループ
1	3pfk	40.5	1.7	312	319	38	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	I
2	1mto	40.4	1.6	312	319	38	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	I
3	4pfk	40.4	1.8	312	319	38	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	I
4	1pfk	39.8	1.8	312	320	35	<i>Escherichia coli</i>	I
5	4a3s	39.7	1.8	312	319	38	<i>Bacillus subtilis</i>	I
6	1zxx	39.7	1.9	312	319	34	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	I
7	6pfk	39.6	1.7	311	319	37	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	I
8	2pfk	37.9	1.6	297	301	38	<i>Escherichia coli</i>	I
9	3f5m	37.4	2.3	423	458	26	<i>Trypanosoma brucei</i>	I
10	3o8o	36.4	2.0	314	763	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	I
11	3o8l	36.3	2.0	313	748	33	Rabbit skeletal muscle	I
12	3hno	34.9	2.0	310	395	21	<i>Nitrosospora multiformis</i>	II
13	3k2q	34.7	2.1	308	392	23	<i>Marinobacter aquaeolei</i>	II
14	1kzh	34.1	2.0	326	550	24	<i>Borrelia burgdorferi</i>	II
15	3opy	26.6	2.1	313	936	25	<i>Pichia pastoris</i>	I

<sup>a</sup>クエリーとして、リガンドフリー状態 TFPF の構造を用いた。

<sup>b</sup>Z-score は構造類似性の指標である。

<sup>c</sup>[http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)

表1-4 TFPF に結合したリガンドと直接に相互作用する  
アミノ酸の比較

A. FBPと直接的に相互作用するアミノ酸の比較

アミノ酸番号	TFPF	BbPFP	TbPFK	EcPFK	GsPFK
70	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
124	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
126	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
169	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
170	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
220	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
263	His	Tyr	Tyr	His	His
266	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
161*	Arg	Lys	Try	Arg	Arg
257*	Arg	Val	Lys	Arg	Arg

B. PPIと直接的に相互作用するアミノ酸の比較

アミノ酸番号	TFPF	BbPFP	TbPFK	EcPFK	GsPFK
10	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
70	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
100	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
101	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
102	Asp	Asp	Gly	Gly	Gly
103	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser
124	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
126	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
170	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg

アミノ酸番号はTFPF の残基番号である。TFPF と比べて異なるアミノ酸は赤字で示した。

\*は隣接サブユニットの残基を示す。

PFK 活性中心のアミノ酸はよく保存されていた。BbPFP、*Borrelia burgdorferi* PPI-PFK、TbPFK、*Typanosoma brucei* ATP-PFK、EcPFK 大腸菌由来 ATP-PFK、GsPFK、*Geobacillus stearothermophilus* ATP-PFK

表1-5 TFPF の変異体のプライマー設計と PCR 反応

A		変異体		primer	
	D102G	5'	GCGACGGAACGTTGGGCGCCCGGA	3'	CACCGGTATCCCCGCTGCCTTGCAAC
	Y232A	5'	GATGAAGCCGGTCACTCGAGGCTGGGG	3'	CCTCCGGGTTCTACTTCGGCCAGTG
	Y232G	5'	GATGAAGGCGGTCACTCGAGGCTGGGG	3'	CCTCCGGGTTCTACTTCGGCCAGTG

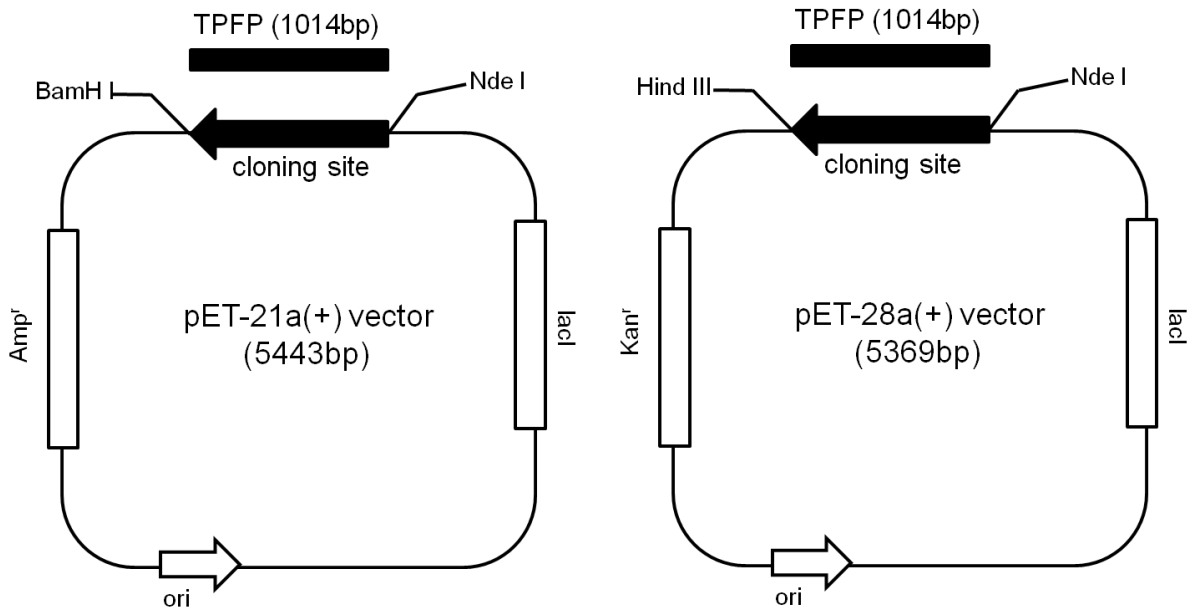
  

B		PCR 反応液組成		PCR 条件	
1	PrimeSTAR Max premix (x2)	25 $\mu$ l	1X	95°C 1 min	} x 30
	Primer 1 (5 pM)	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M	98°C 10 sec	
	Primer 2 (5 pM)	2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M	55°C 15 sec	
	Template (100 pg/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l		72°C 5 sec./kb	
	H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l		4°C	
2	10× PCR Buffer for KOD –Plus	5 $\mu$ l	1X	94°C 1 min	} x 30
	2 mM dNTPs	5 $\mu$ l	0.2 mM	94°C 15 sec	
	25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l	1.0 mM	3 step 60°C 30 sec	
	Primer 1 (5 pM)	3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M	68°C 1 min./kb	
	Primer 2 (5 pM)	3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M	or 4°C	
	Template	1 $\mu$ l	1~50 ng/50 $\mu$ l	94°C 15 sec	} x 30
	KOD –Plus (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 U/50 $\mu$ l	2 step 68°C 1 min./kb	
	H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l		4°C	
3	5 × PrimeSTAR GXL Buffer	10 $\mu$ l	1X	94°C 1 min	} x 30
	dNTP Mixture	4 $\mu$ l	0.2 mM	98°C 10 sec	
	Primer 1 (5 pM)	3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M	60°C 15 sec	
	Primer 2 (5 pM)	3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M	68°C 1 min./kb	
	Template	1 $\mu$ l	10 ng/50 $\mu$ l	4°C	
	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 $\mu$ l	1.25 U/50 $\mu$ l		
	H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l			

1. PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、2. KOD-Plus、3. PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase の PCR 反応液組成と条件

表1-6 TFPF の精製表

Pi-PFK	Total protein (mg)	Total unit (U)	Specific activity (U/mg)
crude	132	3690	27.9
Heat treatment (70°C 30 min)	44.4	1670	37.6
DEAE Sepharose	10.5	968	92.1
Phenyl Toyopearl	2.4	516	215



**図1-1 TFPF の発現用ベクターpET21a(+) と pET28a(+)**

ori ; 複製起点、Amp<sup>r</sup> ; アンピシリン耐性遺伝子、Kan<sup>r</sup> ; カナマイシン耐性遺伝子  
 pET21a+ は前任者から引きついたTFPF の発現ベクターであり、 pET28a+ はベクターを  
 乗り換えるためIn-fusion に用いた。

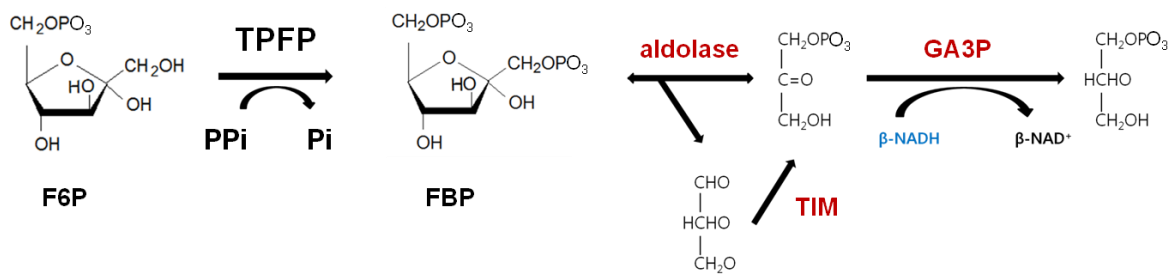


図1-2 TFPF の活性測定方法

F6P ; fructose-6-phosphate

FBP ; fructose 1,6-bisphosphate

TIM、トリオースリン酸イソメラーゼ GA3P、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

活性測定は赤字で示したカップリング酵素を加え、青字の NADH の消費を 340 nm の吸収で観測した。





PrimeSTAR DNA polymerase により遺伝子 (インサート&ベクター)を PCRで増幅



インサートのエンハンサー処理  
インサート 5  $\mu$ l + エンハンサー 2  $\mu$ l 37  $^{\circ}$ C 20 min、80  $^{\circ}$ C 15 min



In-fusion 反応 ; 50  $^{\circ}$ C 15 min

5 x In-fusion HD enzyme premix	2 $\mu$ l
PCR 産物ベクター	1 $\mu$ l
エンハンサー処理したインサート	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ l



形質転換

図1-4 In-fusion 法

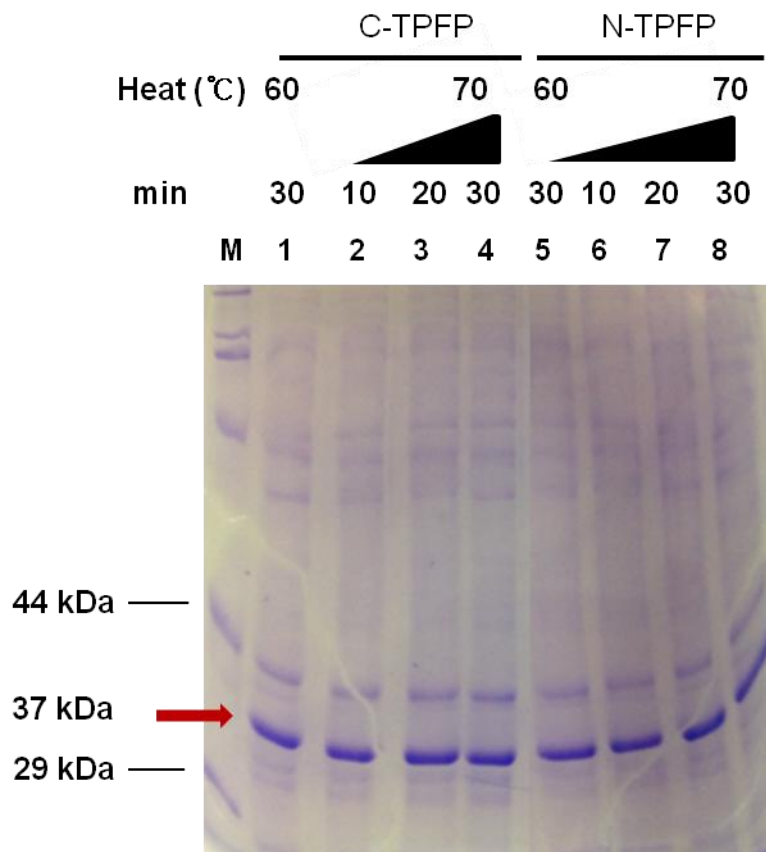


図1-5 C-TPFP、N-TPFP の耐熱性確認

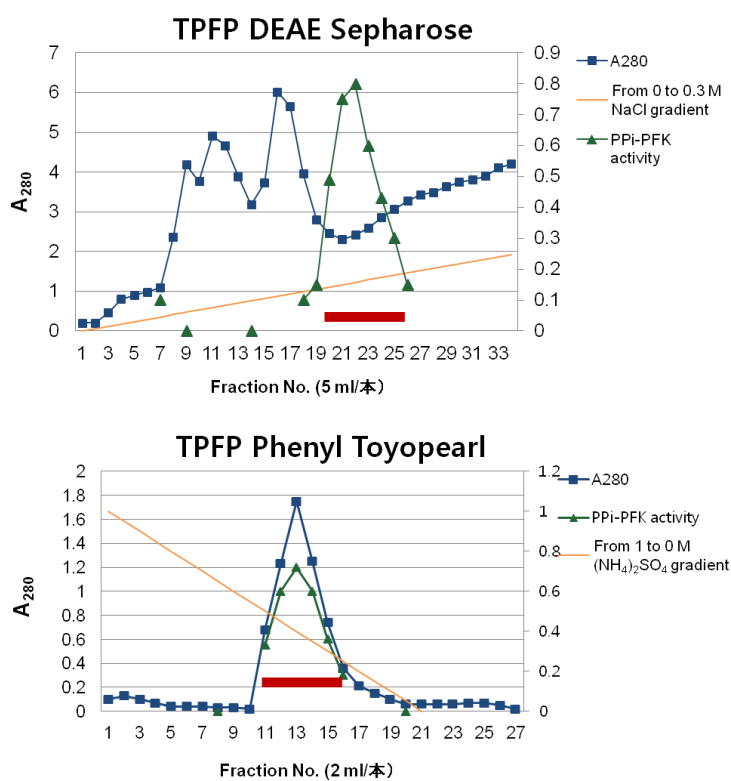


図1-6 TFPF のクロマトグラフィー精製

70°Cで30分間熱処理した TFPF を DEAE Sepharose により精製した。活性のあるところ(①)を用いて、Phenyl Toyopearl カラムにより精製し、活性の部分(②)を用いて、脱塩、濃縮し、結晶化した。

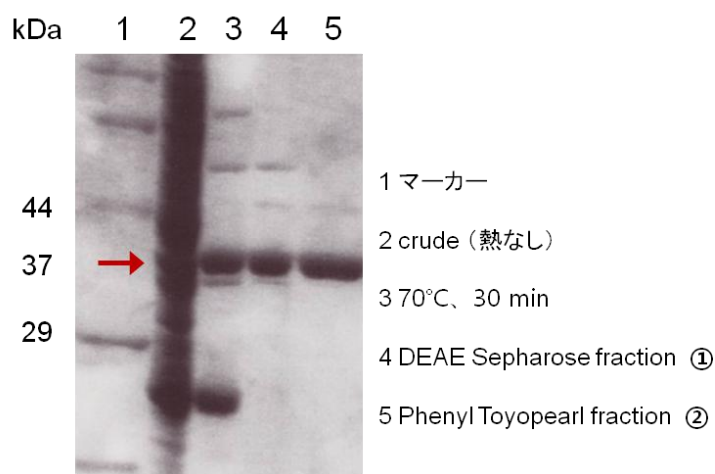


図1-7 TFPF の精製段階における SDS-PAGE

熱処理と2段階のクロマトグラフィー精製により、37 kDa の目的タンパク質が得られた。

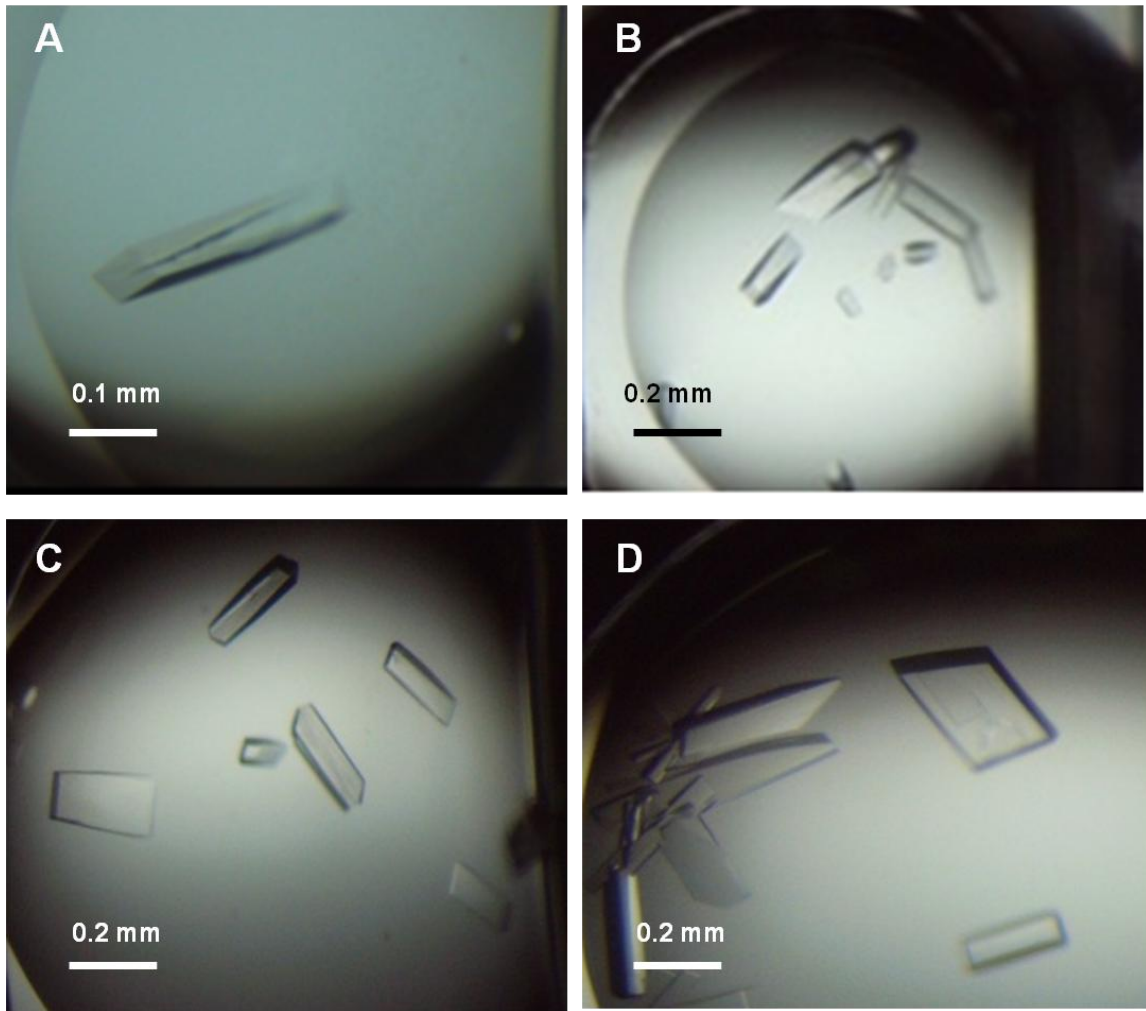


図1-8 本章の研究で得られた TFPF 結晶

A、リガンドフリー状態 B、FBP 複合体 C、Pi・F6P 複合体 D、PPi・Mg 複合体

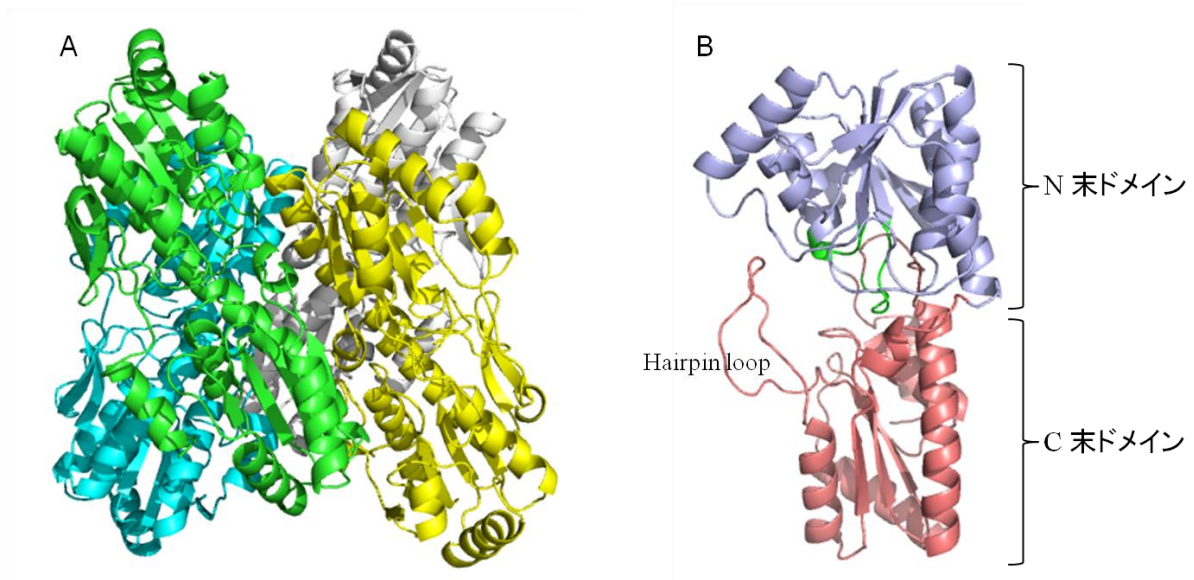
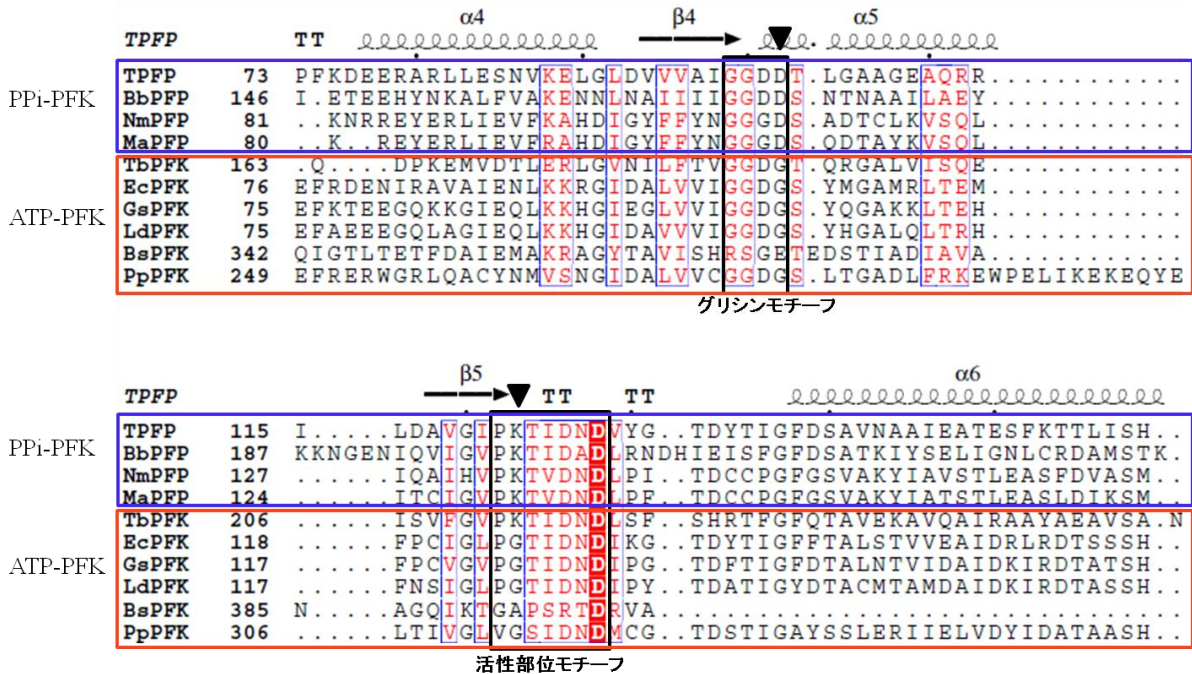


図1-9 TPFP の全体構造

A、TPFP リガンドフリー状態のホモ4量体構造。A、B、C、D の4つのサブユニットをそれぞれ緑、シアン、白、黄色で示した。各サブユニットは構造的な違いは見られない(root mean square deviation (RMSD)< 0.3 Å)ホモ四量体である。

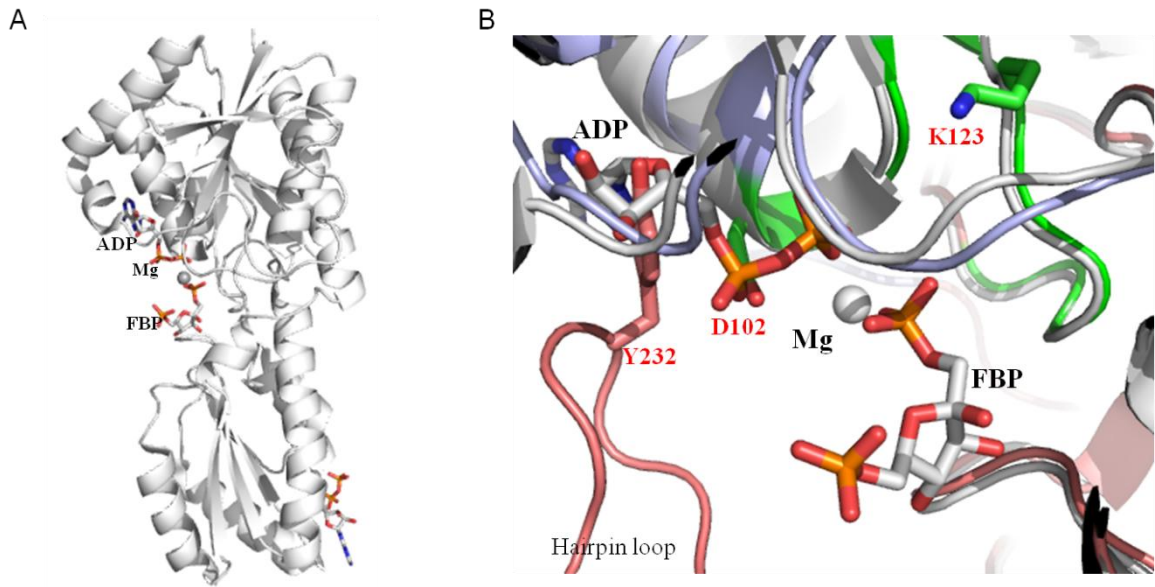
B、TPFP リガンドフリーの単量体(A)を抽出した図。PFK に特徴的は  $\alpha/\beta/\alpha$  フォールドを持つ2つのドメインからなり、それぞれを N 末ドメイン(青)と C 末ドメイン(ピンク)として示した。PFK に強く保存され、リン酸供与体推定の決め手にもなると思われるモチーフ(グリシンモチーフと活性部位モチーフ)は緑で示した。



**図1-10 TPFP と構造解析済みの他の PFK とのアミノ酸  
アラインメント**

TPFP を含め、PPi-PFK は青い四角で、ATP-PFK は赤い四角で囲んだ。また、グリシンモチーフと活性部位モチーフは黒い四角で囲んで、重要なアミノ酸を▼で示した。

TPFP、*Thermoproteus tenax* 由来 PPi-PFK BbPFP、*Borrelia burgdorferi* 由来 PPi-PFK NmPFP、*Nitrosospira multiformis* 由来 PPi-PFK MaPFP、*Marinobacter aquaeolei* 由来 PPi-PFK TbPFP、*Trypanosoma brucei* 由来 ATP-PFK EcPFP、*Escherichia coli* 由来 ATP-PFK GsPFP、*Geobacillus stearothermophilus* 由来 ATP-PFK BsPFP、*Bacillus subtilis* 由来 ATP-PFK PpPFP、*Pichia pastoris* 由来 ATP-PFK



### 図1-11 EcPFK と TPFP 構造の活性中心の重ね合わせ

A 活性中心に ADP・Mg・FBP が結合し、エフェクター結合部位に ADP・Mg が結合した複合体の EcPFK 単量体構造(PDB ID 1pfk)

B リガンドフリーの TPFP 構造(C-末ドメインはピンク、N-末ドメインはブルー、グリシンモチーフと活性部位モチーフは緑で表した)と A (EcPFK、白)の活性中心の重ね合わせを表した。Hairpin loop の Y232 とグリシンモチーフの D102 により ADP の結合する空間が立体障害を受けると予想される

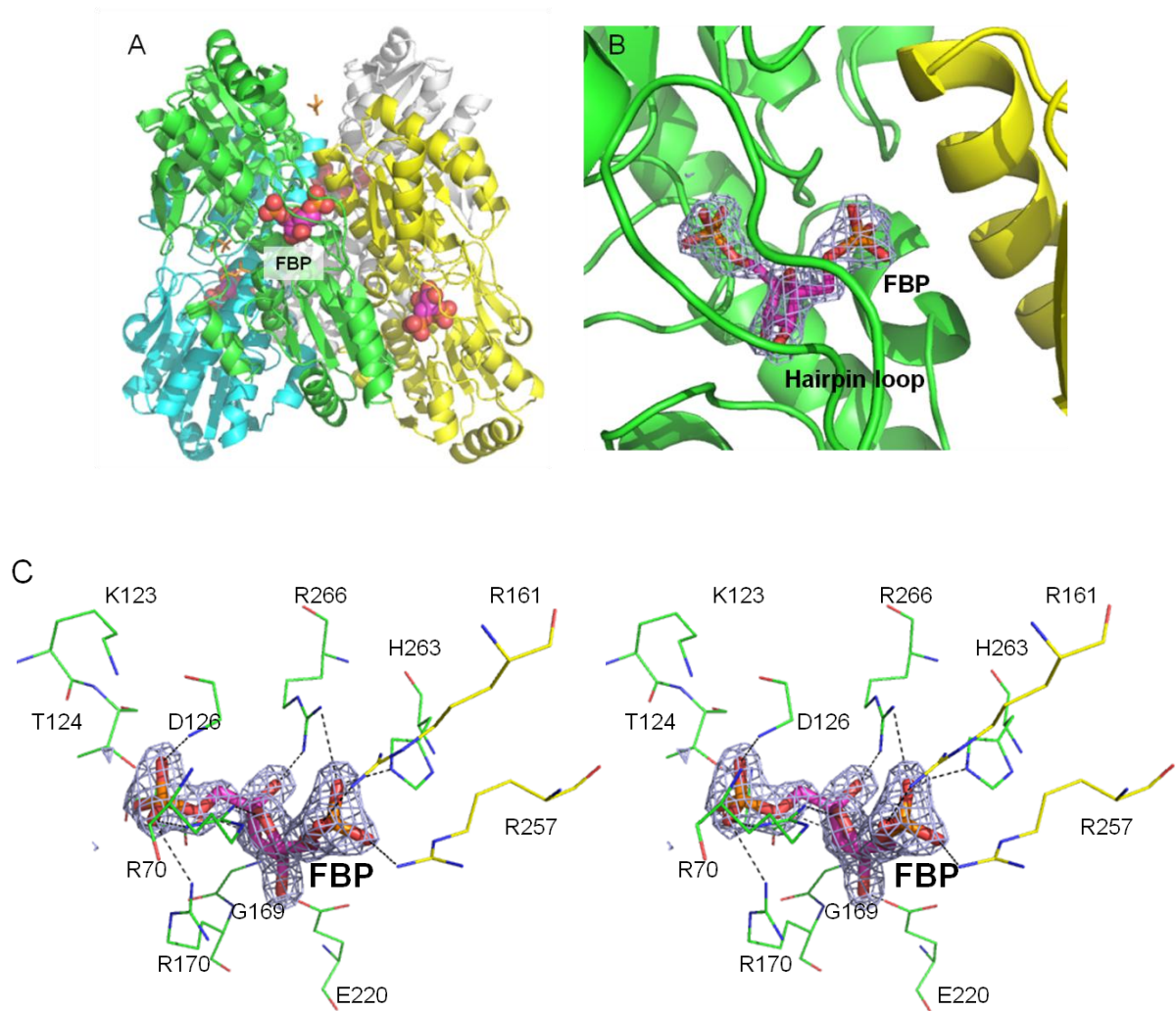


図1-12 TFPF の FBP 複合体

A、FBP 複合体 B、FBP のomit map C、FBP と直接的に相互作用する周りのアミノ酸(ステレオ図)。

隣接するサブユニットからのアミノ酸は黄色で示し、マップの contour は $2.0 \sigma$  で表した(以下図も同様)。水分子は表してない。



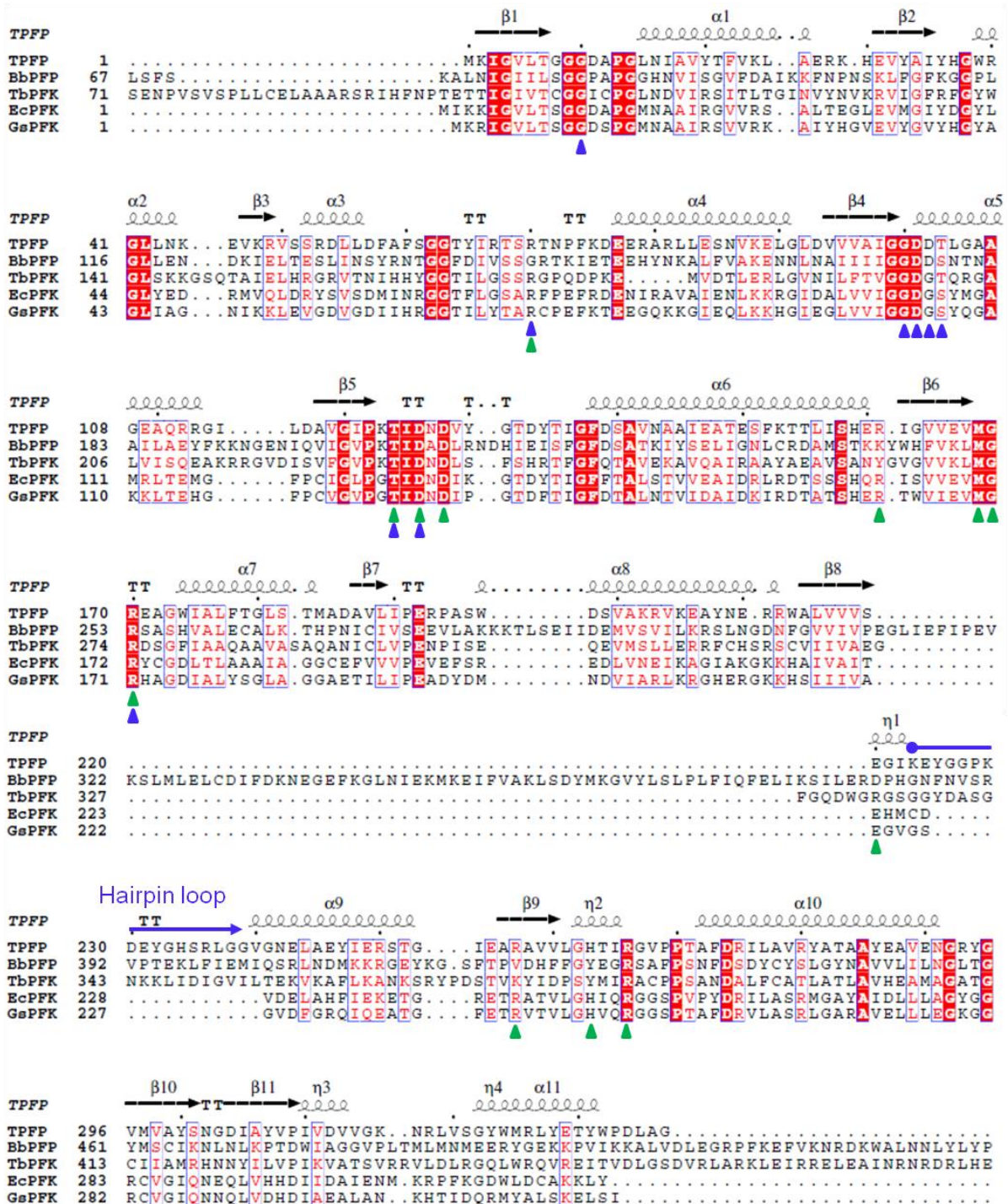


図1-13 他のPFK との amino 酸配列アラインメント

▲はPPiと相互作用するアミノ酸、▲はF6Pと相互作用するアミノ酸

グループII - BbPFP ; *Borrelia burgdorferi* 由来 PPi-PFK、TbPFP ; *Trypanosoma brucei* 由来 ATP-PFK、グループI - EcPFP ; *Escherichia coli* 由来 ATP-PFK、GsPFP ; *Geobacillus stearothermophilus* 由来 ATP-PFK

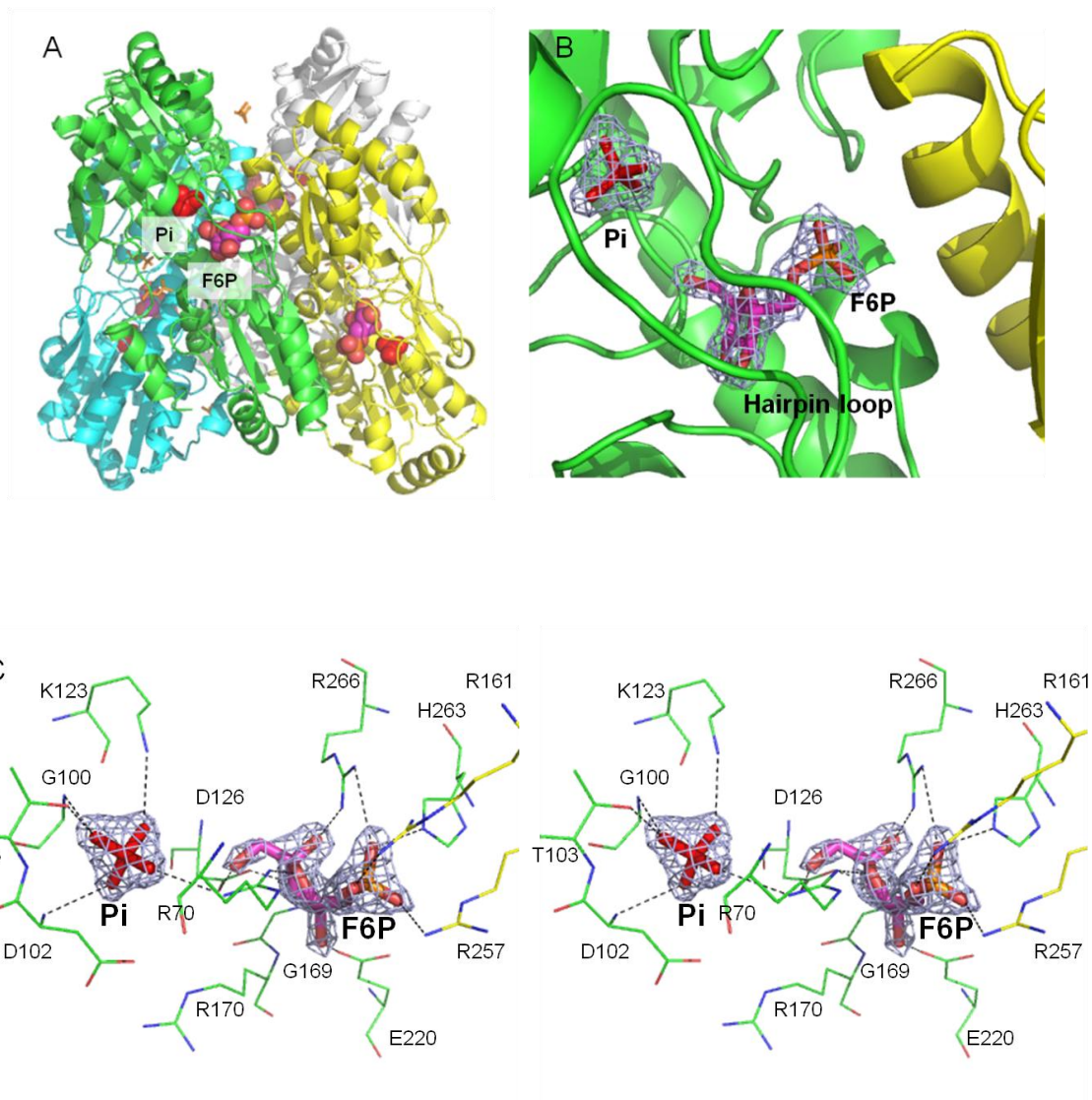


図1-14 Pi·F6P 複合体

A、Pi·F6P の複合体の全体構造 B、Pi·F6P のomit map C、Pi·F6P と直接的に相互作用する K123 を含む周りのアミノ酸。隣接のサブユニットからのアミノ酸は黄色で示した。水分子は表してない。

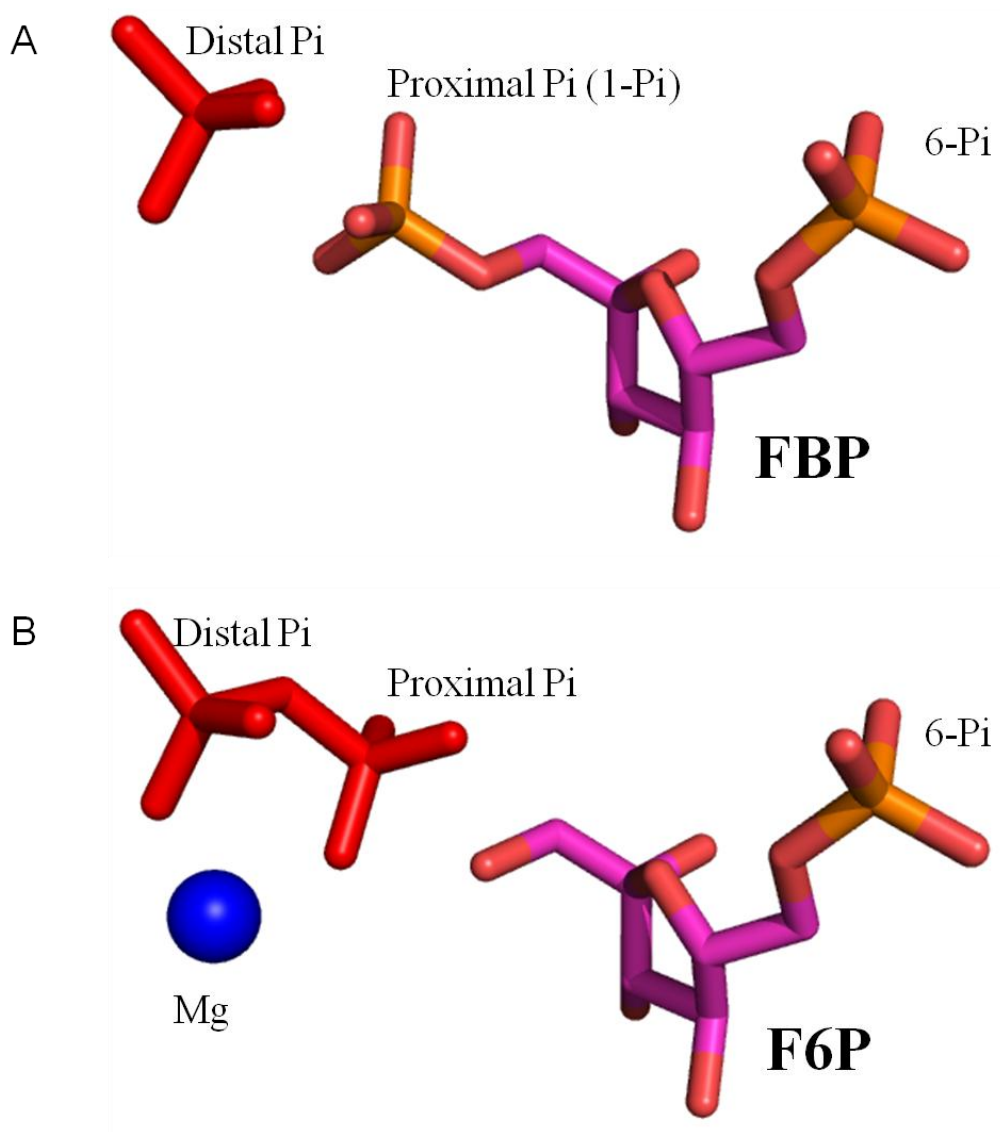


図1-15 3つのリン酸位置

A、Pi·F6P と FBP の複合体のリガンドの重ね合わせから酵素反応後の生成物である Pi (Distal Pi) と FBP を示した。B、Pi·F6P と PPi·Mg の複合体のリガンド重ね合わせから反応前の基質である PPi·Mg と F6P を示した。

FBP 複合体、Pi·F6P 複合体、PPi·Mg 複合体のTPFP 構造より、3つのリン酸(Distal Pi、Proximal Pi (1-Pi)、6-Pi)位置が初めて特定できた。

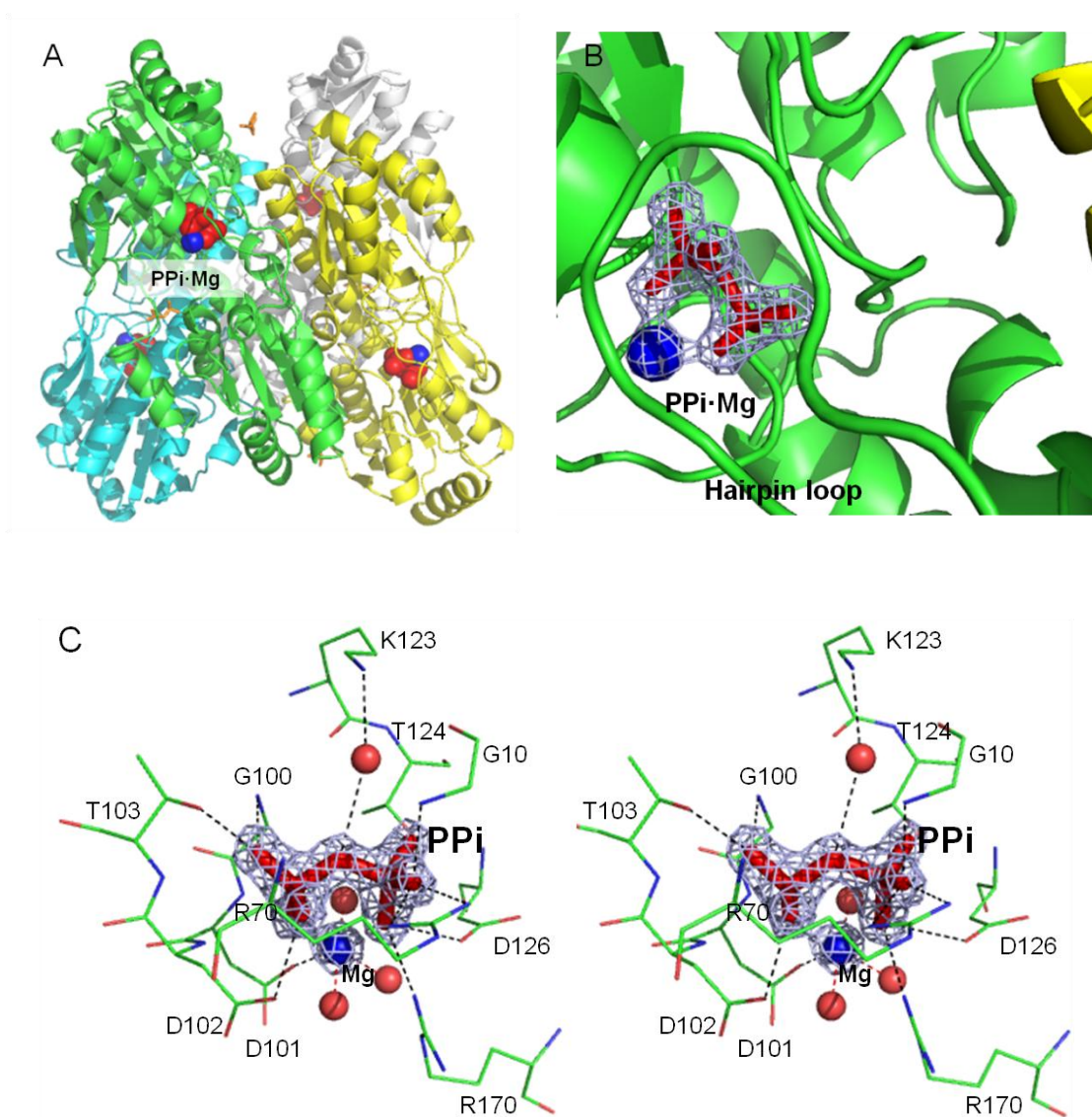


図1-16 PPi·Mg 複合体の TFPF

A、PPi·Mg の複合体の全体構造 B、PPi·Mg のomit map C、PPi·Mg と直接的に相互作用する周りのアミノ酸(ステレオ図)を示した。反応する前の K123 は基質を水分子(赤丸)で、PPi と結合いた。

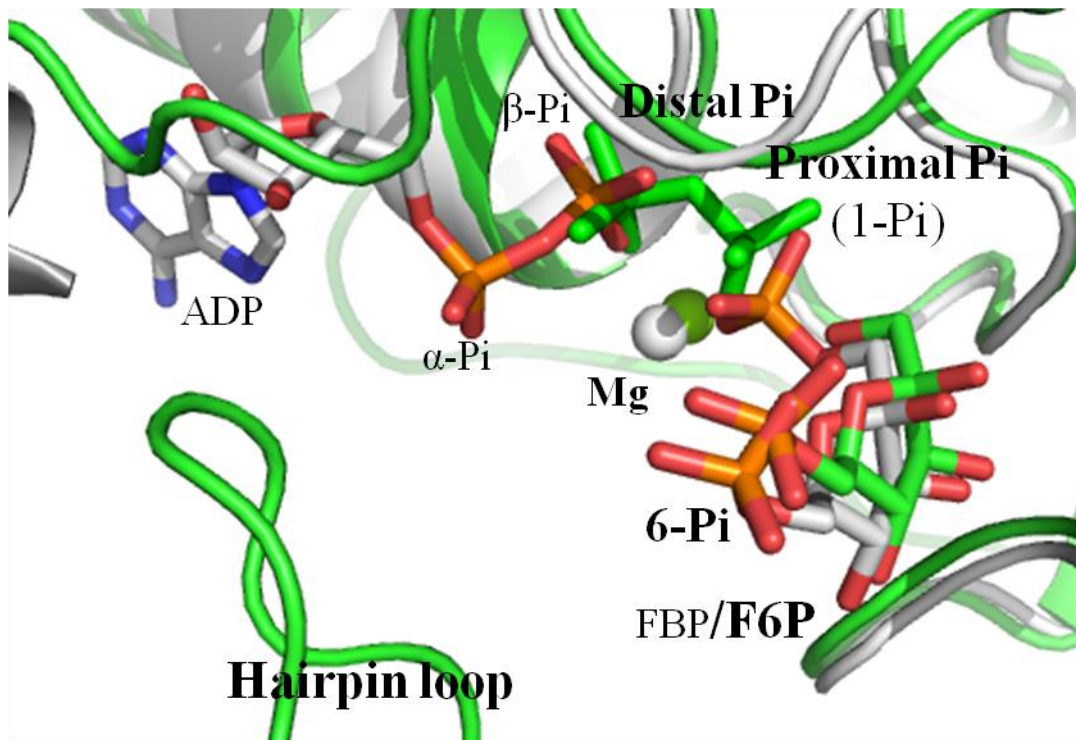


図1-17 TPFP の活性中心

活性中心部位は N-と C-末ドメイン間の境界に位置しており、PPi・Mg は N-末ドメインの方に結合する。PPi・Mg 複合体と Pi・F6P 複合体(Pi は PPi と重なるので表していない)を合わせて、ADP・Mg・FBP 複合体の EcPFK との重ね合わせした。その結果、PPi・Mg は ADP のβ-リン酸と Mg、F6P は FBP と相応した。

TPFP は緑で表し、EcPFK は白で表した。

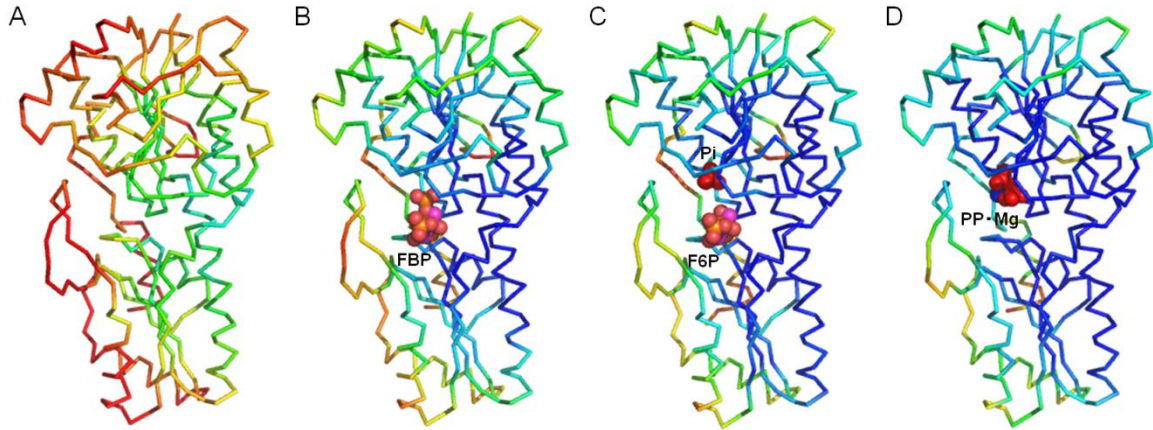


図1-18 TPFP 単量体構造の B-factor による安定性比較

A、リガンドフリー状態 B、FBP 複合体 C、Pi・F6P 複合体 D、PPi・Mg 複合体を表す。基質であるリン酸供与体 (PPi) と PFK に重要な金属イオンであるマグネシウムが結合する状態 (D) がもっとも安定であった。

B-factor の spectrum は最低値10(赤)から最大値40(青)で決めた。構造の色が青いに近いほど安定であることを示す。

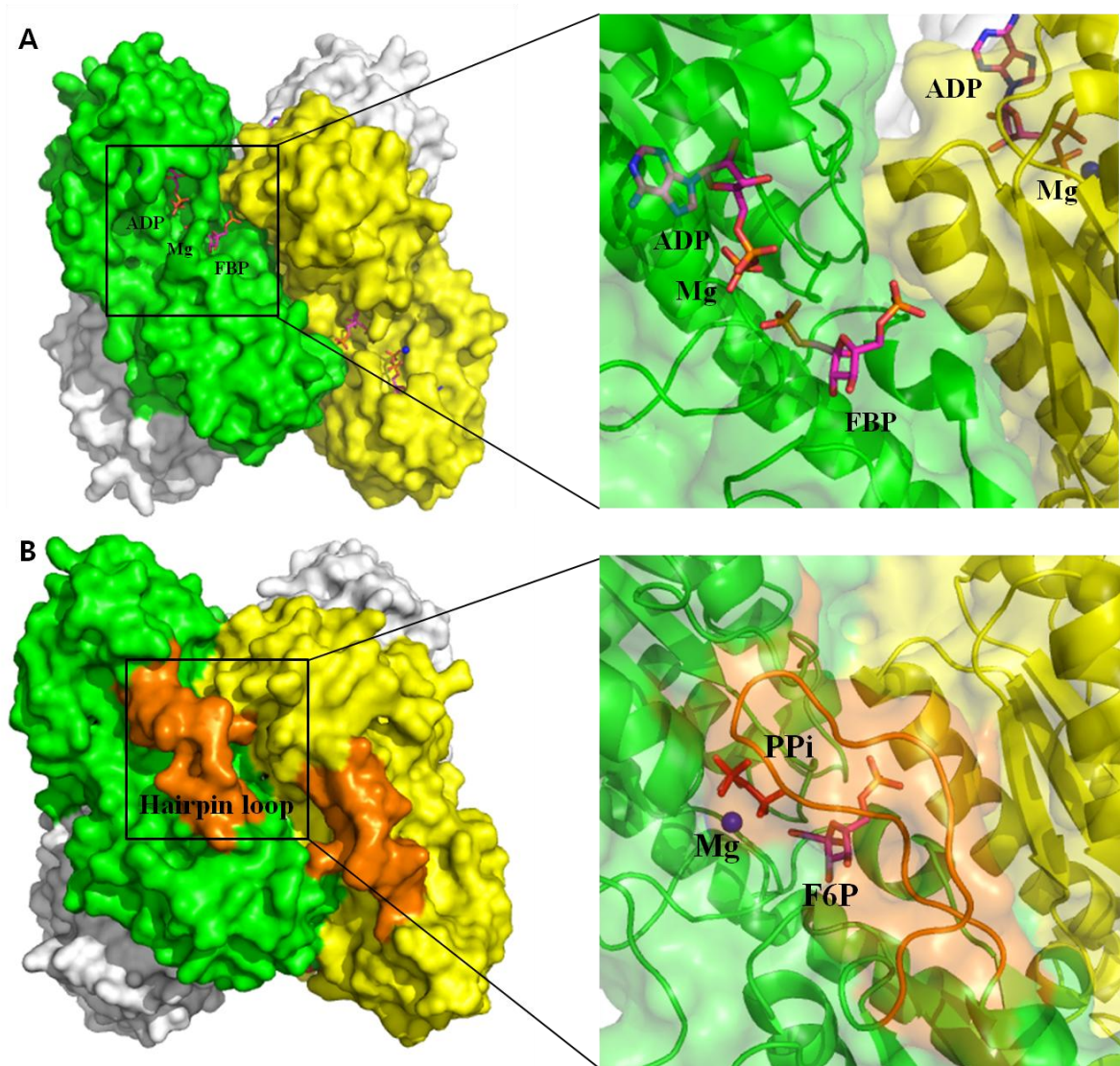
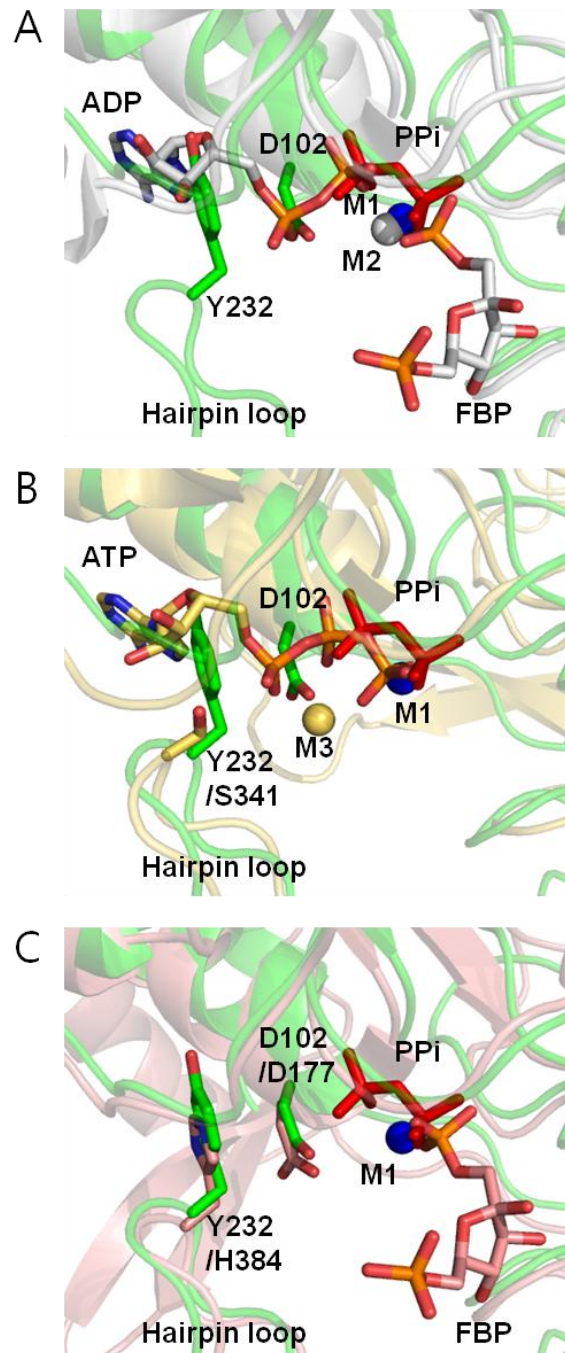


図1-19 EcPFK と TPFP の分子表面

A、EcPFK と B、TPFP のホモ4量体のうち、2つのサブユニットを緑と黄色で表した。  
Hairpin loop がない EcPFK は結合しているリガンドが分子表面から見える(A)のに対して、TPFP はオレンジ色で表した Hairpin loop のため見えない(B)。



**図1-20 TPFP (PPi·Mg 複合体)と他のPFK の活性中心の重ね合わせ**

A、TPFP と EcPFK(グループI ATP-PFK)、 B、TPFP とTbPFK (グループII ATP-PFK )

C、TPFP と BbPFK(グループII PPi-PFK)の活性部位の比較を表した。

M1 TPFP に結合したマグネシウム、 M2 EcPFK に結合したマグネシウム、 M3 BbPFK に結合したマグネシウムを示す。



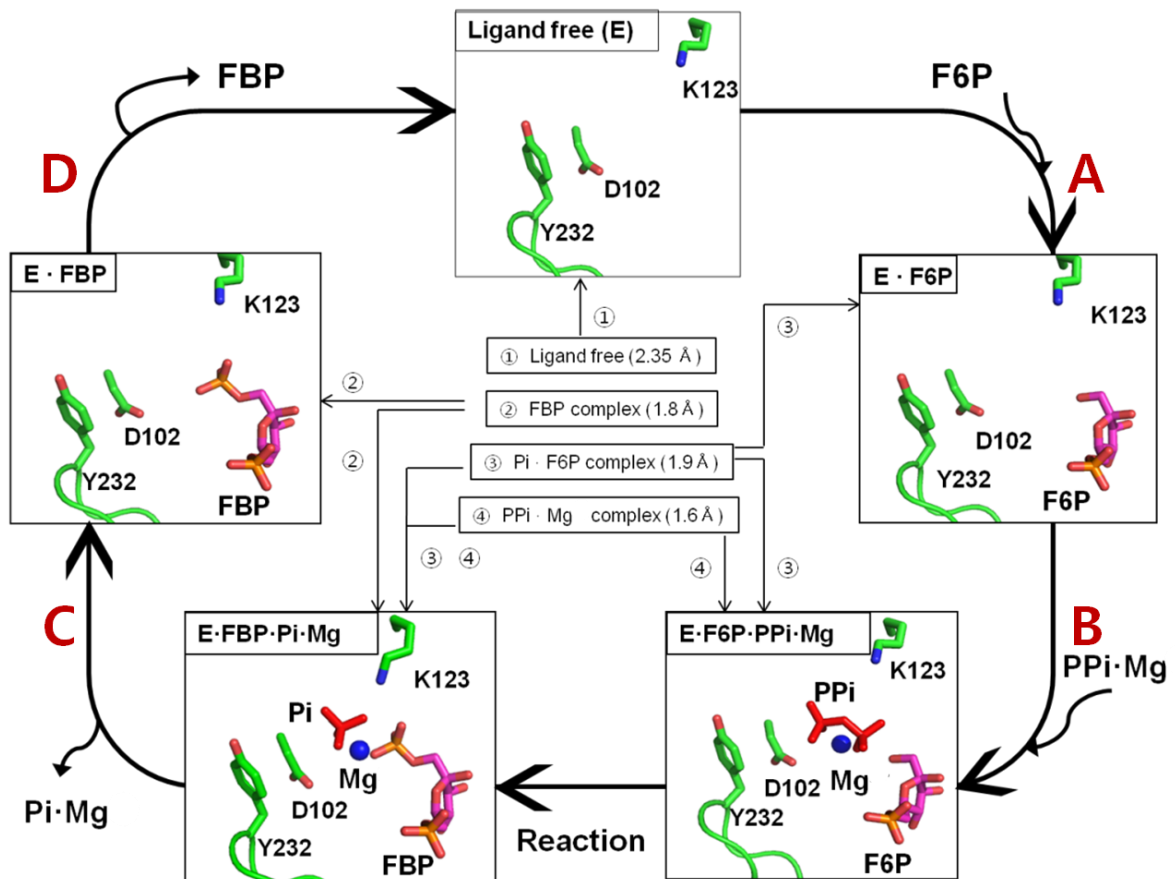


図1-21 TPFK の提唱する反応メカニズム

PPi-PFK の反応機構のすべてのステップの構造を推定できた。A、B は正反応と逆反応で、 $K_m$  に大きな差がなく、ランダムで結合可能であると考えられるが、Pi に対する  $K_m$  値は高く、FBP の結合位置は Pi より深いため、反応前ではA、B またはB、C の順番で結合し、反応後は D、C の順番で解離すると推測できる。

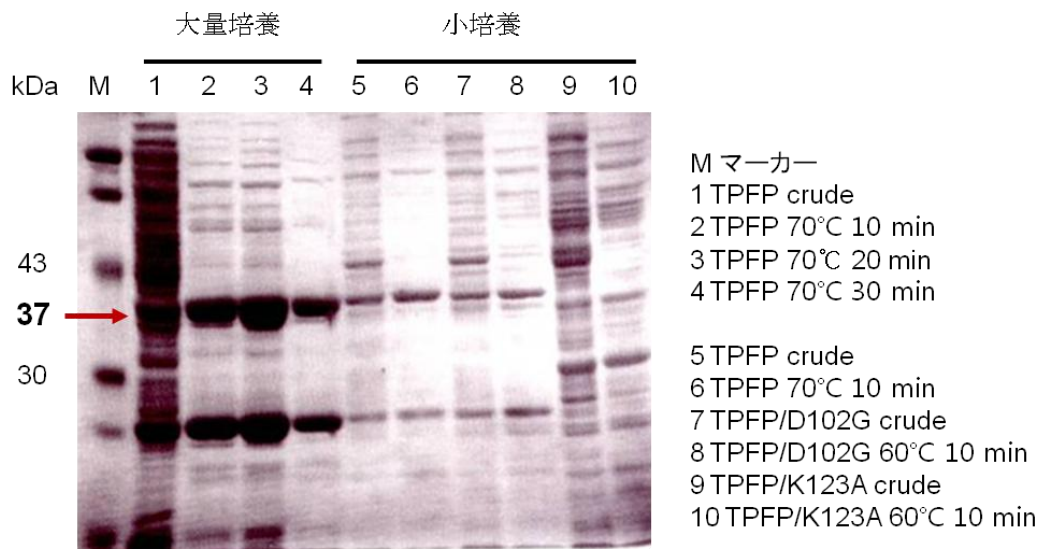


図1-22 TFPF とその変異体の発現量と熱安定性

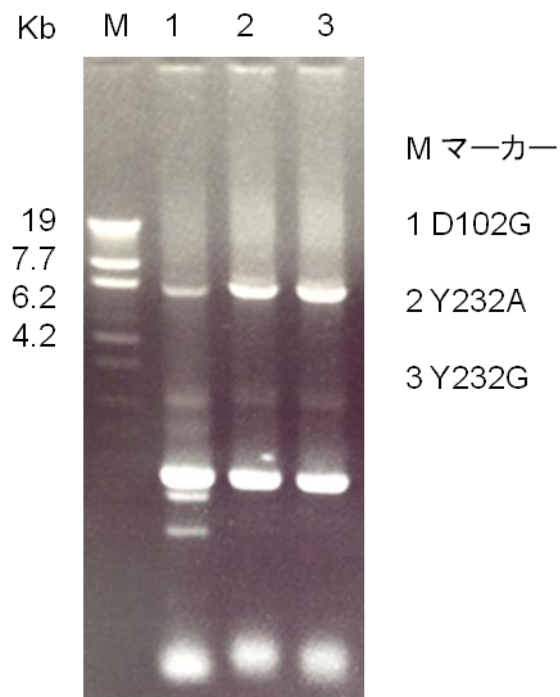


図1-23 TFPF の変異体のPCR の結果パターン

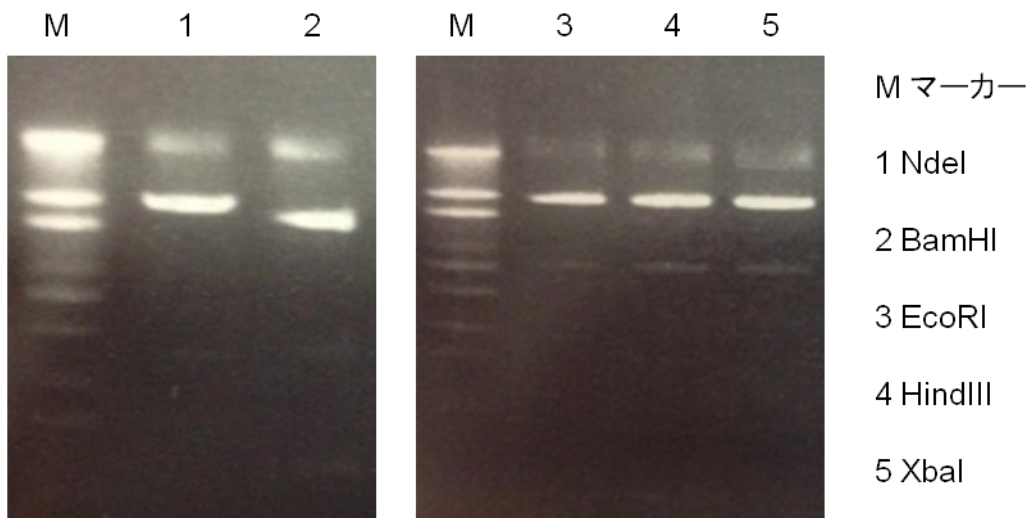


図1-24 pTPFP の制限酵素によるプラスミドサイズの確認

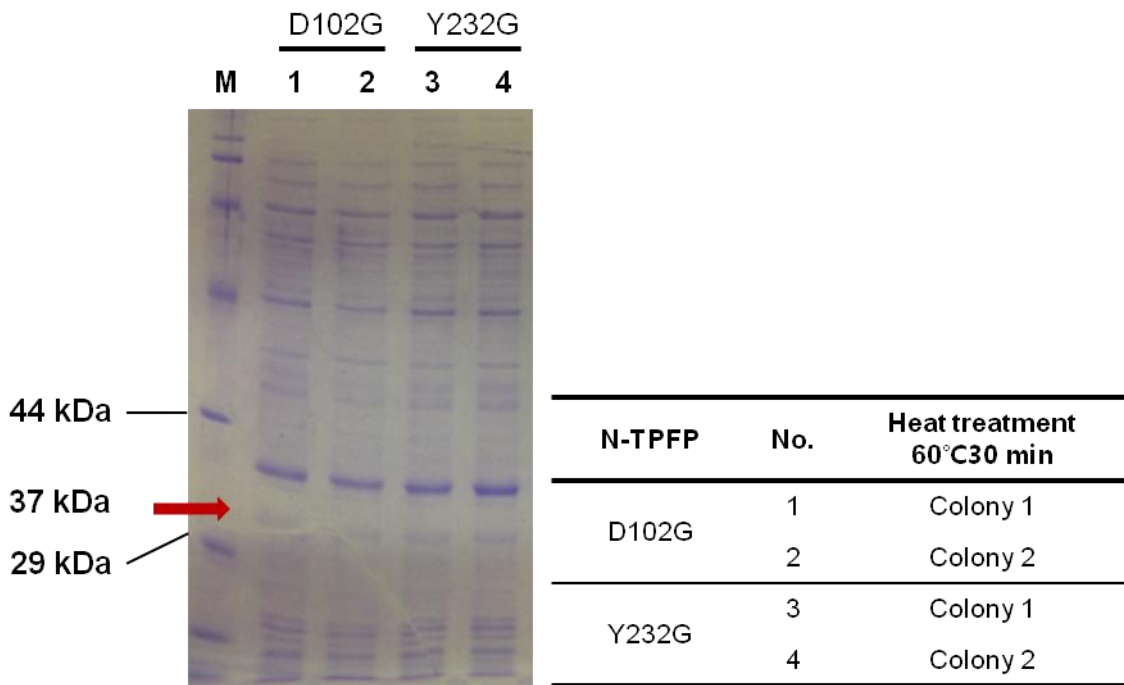
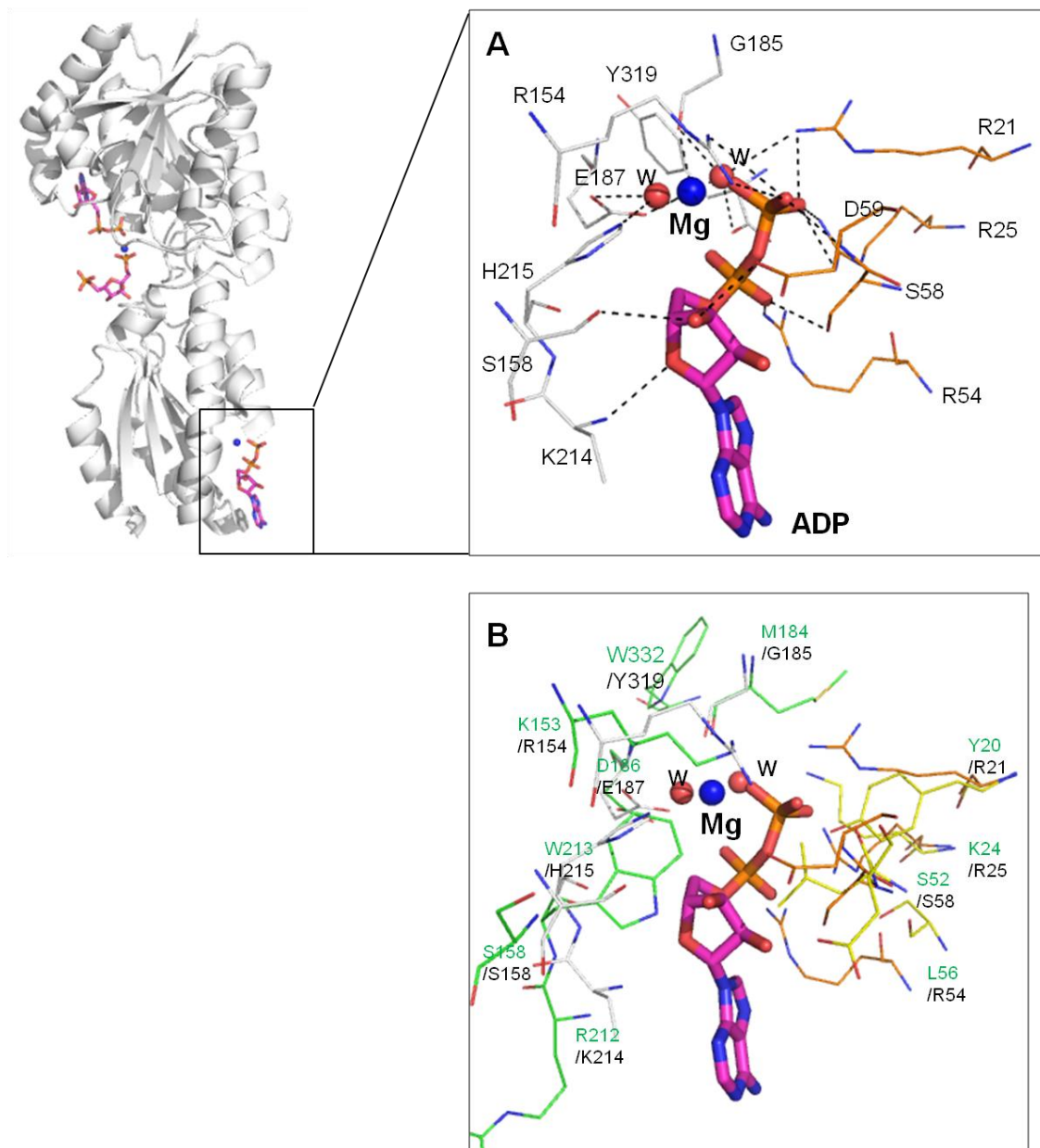


図1-25 N-TPFP D102G と Y232G の発現確認

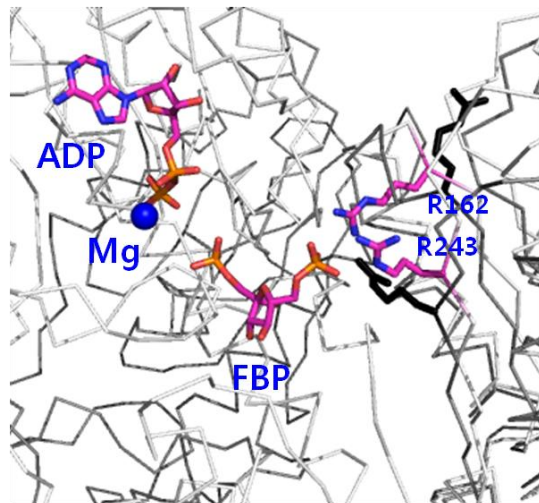
発現できてない。



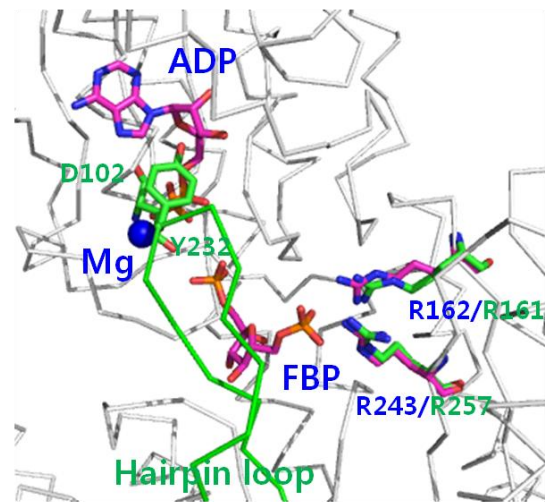
### 図1-26 EcPFK のエフェクター結合部位と TPFK 構造の比較

A、活性化剤 ADP・Mg と相互作用する残基、隣接サブユニットからの残基はオレンジで表した。B、A の残基に対応する TPFK からのアミノ酸残基を緑字で表した。

PFK の活性化剤 ADP・Mg は、EcPFK のエフェクター結合部位の親水性のアミノ酸残基と水素結合しているが、TPFK の構造では、疎水性のメチオイン(M)、ロイシン(L)、トリプトファン(W)などが位置していることが分かった。



R-state vs T-state



R-state vs TFPF

### 図1-27 PFK の R 状態、T 状態と TFPF 構造の比較

R 状態では、F6P と相互作用する R161 と R243 は、T 状態になると構造が変わり、F6P が結合できない構造になる。これら2つの残基に対応する TFPF 構造の残基は、R 状態と同じであり、TFPF 構造は常に活性化状態であることが分かった。

## 第2章

*Thermotoga maritima* 由来無機ピロリン酸依存性  
ホスホフルクトキナーゼ (MPFP) のリン酸供与体の認識機構

## 序

2000年、Chi & Kemp は *E. histolytica* 由来 P<sub>Pi</sub>-PFK の変異体酵素を作成して P<sub>Pi</sub>-PFK もしくは ATP-PFK に特徴的なアミノ酸残基を調べた。活性部位モチーフという配列 (PXTIDND) はすべての PFK に強く保存されており、2番目の残基 X がATP-PFK の場合はアラニンかグリシンになっており、P<sub>Pi</sub>-PFK の場合はリジンであると報告した。グリシンモチーフ (GGDX) はリン酸供与体のリン酸部位と直接に相互作用する。この4番目のXのアミノ酸は PFK のリン酸供与体を決める最も重要なアミノ酸であり、P<sub>Pi</sub>-PFK の場合はアスパラギン酸、ATP-PFK の場合にはグリシンとして強く保存されている。これは、すべての PFK に当てはまる。活性部位モチーフの2番目のアミノ酸はリン酸供与体によってアミノ酸が決められるわけではなく、グループI のすべてはグリシンかアラニンで、グループII と III はすべてリジンであった(図2-1)。このアミノ酸は、すべての PFK にも強く保存され、また、活性中心に位置し、TPFP の構造解析からは酵素反応後のDistal Pi の安定的な結合に寄与すると推測できたが(第1章)、PFK のリン酸供与体特異性の決定には特に重要ではないことが示唆された。また、グループII とIII の特徴であると確認できた Hairpin loop に存在し、ATP が結合する場合に立体障害を起こす Y232 の他の機能に関して興味を持たれた。グループII のアミノ酸配列アラインメントによると、ATP-PFK では、この残基はほとんどセリン(S)であり、P<sub>Pi</sub>-PFK ではヒスチジン(H)であった(図2-1)。

グループIII のアミノ酸配列アラインメントによると、特に保存された残基ではないがP<sub>Pi</sub>-PFK はチロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)のような大きなアミノ酸である傾向であった。ATP-PFK では Y や F の場合もあったが、グリシン(G)、セリン(S)のような小さいアミノ酸であった(図2-1)。Hairpin loop を有する4種のグループII の立体構造は決定されているが、このアミノ酸についてはまだ研究されていない。

*T. maritima* MSB8 は1999年に全ゲノム配列が明らかになり、古細菌の遺伝子とよく似てた遺伝子を多数持つことが分かっている (Nelson et al. 1999)。 *T. maritima* は色々の炭水化物を EM 経路により分解するが、この経路で働く酵素の中で ATP-PFK (TM0209、MPFK と略)と P<sub>Pi</sub>-PFK (TM0289、MPFP と略)がある。これら MPFK と MPFP は Ding らによりクローニングされ、それぞれの特徴が調べられている (Ding et al. 2001)。

MPFP の所属するグループII の中で、その構造が既に解析されている PFK とのアミノ

酸配列の同一性を調べたところ、*B. burgdorferi* PPI-PFK (PDB ID 2f48、27%)、*N. multiformis* PPI-PFK (PDB ID 3hno、17%)、*M. aquaeolei* PPI-PFK (PDB ID 3k2q、13%)、*T. brucei* ATP-PFK (PDB ID 3f5m、22%)、そして、グループIII の TPFPP とともに高い同一性 (29%) を示すことが分かる。

## 目的

同じく超好熱菌由来であり、立体構造が明らかになった PFK と比べても、最も高い同一性を示す MPFP は、TPFP と共通する分子構造を有すると考えられる。そこで、MPFP 構造のモデリングを行い、そのモデリング構造から TPFPP の変異対象であった D102、K123、Y232 に対応する MPFP の残基を確認し、変異体作成を行う。この変異体による構造の変化、基質の変換、そして、動力学的パラメーターを調べ、野生型 MPFP との比較により、これらの残基は、PPI-PFK のリン酸供与体にどのような影響を与えるのかを調べることを目的とした。



## 2-1 MPFP のモデリング構築

MPFP の結晶構造解析を目指して結晶化を行ったが、は大腸菌由来の耐熱性のタンパク質である、無機ピロリホスファターゼが精製後も微量に混入し、そちらが優先的に結晶化するという問題のため、いまだに構造解析に成功していない。そこで、MPFP を用いて変異体作成の前に、対象のアミノ酸の構造的な位置を確認する必要があった。

### 2-1-1 MPFP のモデリング構築

Swiss Institute of Bioinformatics から提供される automated protein homology-モデリング server である SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) により MPFP のモデリングを行った。これはWebサイトでのホモロジーモデリング法であり、目的のアミノ酸配列との相同性が高いタンパク質の立体構造をテンプレートにして立体構造モデルを作成する方法である。

## 2-2 MPFP の変異体作成

TPFPの構造解析により、活性中心のリガンドと直接的に関係があると分かったアミノ酸の変異体作成により、リン酸供与体特異性や P<sub>Pi</sub>-PFK 反応メカニズムにどの影響を与えるか調べるため変異体作成を行った。

### 2-2-1 変異体の作成方法

MPFP の変異体作成は PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara)を用いて行った。独自のプライマー設計により PCR の過程で PCR 産物が環状構造になるプライマーの設計は、まず、変異部位を中心にしてオーバーラップ領域を15塩基選定し、次に変異部分から3'側に18塩基伸ばしたものをプライマー配列として選択した(表2-1A)。PCR 反応液組成は PrimeSTAR premix、Primer1&2、template からなり、その最終濃度はそれぞれ1X、0.2

$\mu\text{M}$  と  $100\text{ pg}$  である。これを  $98^\circ\text{C}$  10秒、 $50^\circ\text{C}$  15秒、 $72^\circ\text{C}$  5秒./kb の条件で PCR した (表2-1B)。

二重変異体の場合はテンプレートだけをそれぞれの単変異体のプラスミドを使って、すでに設計してあるプライマーを使用した。PCR の後、正しいサイズのコロニーを確認後、遺伝子保持株である JM109 または XL10Gold を用いて形質転換した。寒天培地で一晚培養し、いくつかのコロニーを選んで、colony PCR (SapphireAmp® Fast PCR Master Mix)を行い、バンドのサイズから株の中に目的のタンパク質が入っていることを確認した。その後、液体培地で  $5\text{ ml}$  を一晚培養し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を用いてプラスミドを精製した。最終濃度  $50\text{ ng}/\mu\text{l}$  以上のプラスミドと  $5\text{ pmol}/\mu\text{l}$  のプライマー (T7 Promoter と T7 Terminator) をそれぞれ1:0.7の比率に混ぜて全量が  $10\text{ }\mu\text{l}$  以上になるように溶液を用意、プラスミドの全 ORF の配列を読んだ (MACROGEN JAPAN)。

## 2-3 MPFP と変異体の発現と精製

本章の目的のため、純度の良い大量のタンパク質が必要である。そのため、まず、このタンパク質が最も発現できる発現条件を検討し、大量培養と精製を行った。

### 2-3-1 組み換え大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

発現用のベクターとして pBR322 複製起点、T7 promoter、また、アンピシリン耐性遺伝子を有する pET21a(+) (Novagen)を用いた (図2-2)。MPFP 発現プラスミドは DNA 溶液として保存されておらず、組み換え大腸菌のグリセロールストックの形で保存されていた。そこで、このグリセロールストックから一晚培養した  $5\text{ ml}$  の菌体液から DNA 抽出を行った。プラスミド精製には Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)を使った。精製したプラスミドは各酵素名の前に p を付けて表す。

### 2-3-2 発現検討

グリセロールストックから精製した pMPFP と MPFP の変異体プラスミドを発現用大腸菌に形質転換し直した。PFK の発現組み換え酵素の発現には大腸菌のレアコドンを補強してある BL21(DE3) C<sup>+</sup> RIL 株を用いた。30  $\mu$ l の一晩培養液を 3 ml の LB 培地に植菌し、37°C で 2 時間振とう培養した後、終濃度 0.5 mM IPTG を加えた。IPTG 誘導後 37°C でさらに 3 時間培養した後、培養液を集菌し、150  $\mu$ l の 50 mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁した。懸濁液を 10 分間超音波破碎した後、15,000 g、15 分間の遠心をして上清と沈澱に分けた。野生型 MPFP 上清は 70°C 10 分間、変異体は野生型 MPFP より熱安定性が落ちる可能性もあると考え、まず、試しに 60°C 10 分間熱処理をし、15,000 g 15 分間遠心をして上清を採取した。

### 2-3-3 MPFP とその変異体の熱安定性検討

超好熱性バクテリアである *T. maritima* 由来の酵素であるため、組み換え菌体の粗抽出液を用いて 60、70°C で熱処理し、残存活性を測定した。

### 2-3-4 MPFP 活性の測定

MPFP およびその変異体活性の測定は TFPF 活性測定と同じく Siebers (Siebers and Hensel 2001) や Ding (Ding et al. 2001) らの方法に従って行った。活性測定溶液の組成は 30 mM Buffer、175 mM KCl、1 mM F6P、0.2 mM  $\beta$ -NADH、1 mM PPI、0.3 U aldolase、10 U TIM、1 U GA3PDH からなる。Buffer は TFPF と異なり、測定温度である 50°C で Bis-Tris pH5.6 になるように調整した。この活性測定方法は、解糖系において PFK の直後に存在する aldolase、TIM や GAPDH をカップリング酵素として過剰量加えることで NADH による吸収を検出するものである。390  $\mu$ l の活性測定溶液をガラスセルに入れ、1 分間 50°C で保温した。その後、10  $\mu$ l の酵素を加え反応を開始した。反応は 50°C で行い、1 unit は 1 分間あたり 1  $\mu$ mol の  $\beta$ -NADH を消費する酵素量と定めた。

### 2-3-5 MPFP の大量発現と精製

MPFP およびその変異体の組み換え酵素の発現に BL21(DE3)<sup>C+</sup> RIL 株を用いた。100 µg/ml のアンピシリンと 50 µg/ml のクロラムフェニコールを含んだ 1 L の培地に前培養液を 10 ml 植菌し、37°Cで振とう培養した。O.D.<sub>660</sub>が~0.6 となった時点で IPTG を最終濃度 0.5 mM となるように加えて酵素の発現を誘導し、発現量を増やすため25°Cでさらに一晩培養し、8000 gで10分間遠心して集菌した。大量培養した組み換え大腸菌体を菌体重量の10倍の緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM PMSF) で懸濁し、氷冷しながら超音波破碎の後、15000 g, 30 min, 4°Cで遠心した。上清の可溶性画分を組酵素液とした。水槽式インキュベーターで 野生型 MPFP と変異体の上清液を70°Cと80°Cで30分間熱処理を行い、15,000 gで30分間遠心して上清を回収した。これを MILLEX-HV 0.45 µm Filter Unit (Millipore)を用いて微粒子を除去した後、イオン交換カラム (DEAE Sepharose)クロマトグラフィーにより精製した。活性画分は SDS-PAGE で純度を確認した後、20 mM Tris-HCl pH8.0 で脱塩し、30K のUltra amicon (Millipore)を用いて濃縮した。

### 2-3-6 精製

DEAE Sepharose カラムクロマトグラフィー

次の手順で行った。

- ① DEAE Sepharose Fast Flowのレジンを (GE Healthcare)をカラムに充填し、20 mM Tris-HCl (pH8.0)で平衡化
- ② 熱処理した組酵素液を①に添加した後、20 mM Tris-HCl (pH8.0)で非吸着画分を溶出
- ③ 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 0M ~ 0.3 M NaClの濃度勾配を用いて吸着画分を溶出 (5 ml/fraction)

### 2-3-7 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA 法によって行った。スタンダードにはウシγグロブリン (BSA)を用いて、検出にはマイクロプレートリーダーを利用し 562 nm で測定した。

## 2-4 動力学的パラメーター

PFK の基質である PPI、ATP、F6P に対する  $K_m$  と  $k_{cat}$  を50°Cで決定し、MPFP、単変異体、二重変異体のすべては同じ方法で行った。0.01~0.5 mM F6P と、0.05~2 mM の PPI または ATP の濃度での PFK 活性を測定し、カレイダグラフ (Synergy) を用いて、データ処理した。

## 結果と考察

### 2-5 MPFP のモデリング構造

#### 2-5-1 MPFP のモデリング構築結果

SWISS-MODEL サーバーを用いてMPFP の構造モデリングを行った。最も類似したテンプレート構造の識別のため BLAST を開始したところ、適したテンプレートを発見できず、関連テンプレート構造を検出するために HH Search (タンパク質の配列を探索するオープンソフトウェアプログラム (Soding 2005)) が実行された。そこで、MPFP とアミノ酸配列の同一性 30% を持つ(表2-2) *Bacillus subtilis* 由来の ATP-PFK (PDB ID 4i7e (3から381))に基づいてモデル構築が行われたが、成功しなかった。次に、テンプレートとして選ばれたのは同じグループ II の BbPFP (*Borrelia burgdorferi* 由来の PPI-PFK; PDB ID 2f48 (2-391))で、これによってモデル構築に成功した(図2-3)。

目的タンパク質とテンプレートのアミノ酸配列の同一性が 50% 以上であれば、自動化された配列アラインメントは、十分に信頼できるという (Rost 1999)。しかし、MPFP と BbPFP のアミノ酸配列の同一性は 26.6% (図2-3より)であるため、信頼性は少し落ちるが、TPFP、BbPFP と MPFP のアミノ酸配列アラインメントと構造の重ね合わせによる比較から、TPFP で基質 PPI に重要な影響を与えると期待されたアミノ酸の変異体を MPFP で対応するアミノ酸を変異体を作成することにした。TPFP と BbPFP、BbPFP と MPFP のサブユニット重ね合わせの RMSD (Root Mean Square Deviation ; 平均二乗偏差のことで、タンパク質構造の非類似性や誤りの指標であり、値が小さいほど2つの構造がよく似ていることになる) はそれぞれ、1.581 Å、0.581 Åであった。PFK の活性部位を認識するアミノ酸はよく保存されており、変異体の対象になるアミノ酸だけでなく、TPFP の FBP 複合体で分かった、FBP と直接に相応作用するアミノ酸とそれに相応する BbPFP、MPFP のアミノ酸も一緒に表して、それぞれ重ね合わせた。その結果、TPFP と BbPFP、BbPFP と MPFP の FBP と相互作用するアミノ酸の重ね合わせの RMSD はそれぞれ、0.493 Å、0.074 Åであった(図2-4)。BbPFP は、リガンド FBP が結合した A サブユニットと AF<sub>3</sub> (Aluminium Fluoride) が結合した B サブユニットからなるダイマーである。これは、結合したリガンドに

よって Hairpin loopを含む大きな helical domain の構造が大きく変わり(A サブユニットの H262 と B サブユニットの H262 の距離は15.4Å)、A サブユニットは closed、B サブユニットは open の構造になる(図2-5)。MPFP モデリングのテンプレートとしては自動的に BbPFP の B サブユニットの open型が用いられたが、TPFP (FBP 複合体)はどの状態でも Hairpin loopが活性部位に近い closed のような構造であるため、BbPFP との重ね合わせでは A サブユニットを用いた。

### 2-5-2 TPFP と相応する MPFP のアミノ酸確認

アミノ酸配列のアラインメントと MPFP モデリング による構造的に一致して位置している TPFP で作成しようとした変異体 D102G、K123G、Y232A に相応する MPFP の D108G、K131G (および K131A)、そして、H262A(および H262G)の変異体を作成した。そして、単変異体のプラスミドをテンプレートとして、それぞれのプライマーを用いて二重変異体 を作成した。特に D108G はリン酸供与体の変化が予想されるので、pD108G をテンプレートとした二重変異体を作り、K131G、K131A と H262A、H262G の場合は、D108G のようなリン酸共体の変化および基質への活性に変化があると期待されるため、二重変異体を作成した(図2-6)。

## 2-6 MPFP の変異体作成結果

### 2-6-1 pMPFP と各変異体の遺伝子配列確認

MPFP の5つの変異体 PCR 結果、6.6 kb (インサート1.2 kb + ベクター5.4 kb)のところにバンドを確認した(図2-7)。二重変異体は、pD108G をテンプレートにした変異体 (D108G/K131G、D108G/K131A、D108G/H262A、D108G/H262G)と、pK131A、pK131G、pH262A、pH262G の変異体のプラスミドをテンプレートとして用いた。PCR 結果、6.6 kb サイズのバンドが確認され(図2-8)、これらを形質転換後のインサートの確認と精製したプラスミドを制限酵素によりサイズを確認した後に配列を読んだ。pMPFP の配列は NCBI (National Center for Biotechnology Information) の nucleotide blast (blastn) により

*Thermotoga maritima* MSB8, complete genome の PPI-PFK (TM0829)の遺伝子配列と同一であることを確認した。各変異体のプラスミドの挿入配列の確認も同じ方法で行い、変異のところ以外は TM0829 の遺伝子配列と同一であることを確認した。

### 2-6-2 変異体の耐熱性と発現量

BL21(DE3) C<sup>+</sup>RIL 株に発現させ、変異体の熱安定性を調べた。変異による耐熱性が少し落ちる可能性があると思い、MPFP の場合の熱処理条件とは異なる 60°C、30分と70°C、20分で熱処理した後の残存活性を測定した。

D108G は、ATP の活性が高くなり、熱にも安定であった(図2-9)。K131G は D108G と比較しても十分なタンパク質の量であったが、熱により失活し(図2-10)、K131A も同様な結果であった(データなし)。

### 2-6-3 熱安定性とリン酸供与体基質に対する活性

熱に安定である MPFP および変異体に対してさらに安定性評価を行った。組み換え菌体の組抽出液を用いて熱処理の時間をもっと長くしたり、温度を上げてから PFK 活性の熱安定性と残存活性を調べた。MPFP は70°C 30分の熱処理により半分くらい失うが、80°C 30分でも半分の残存活性がそのまま残り、熱に対して極度に安定であることが分かった(図2-11A)。さらに、熱処理の温度を上げたことにより、20 kDa の大腸菌由来の耐熱性無機ピロホスファターゼ(inorganic pyrophosphatase ; PPase)が変性除去されることが分かった(図2-11B)。この大腸菌由来の PPase は70°C 30分の熱処理の後、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE sepharose)と疎水性クロマトグラフィー (Phenyl Toyopearl)による精製にも少し残っており、目的のタンパク質 MPFP より先に結晶化してしまうことが確認されていたものである。6で量体である PPase (約120 kDa)とダイマーの MPFP (約92 kDa)をゲル濾過による分子量で分離することは困難であった。

K131G は熱処理で失活したが、H262G、H262A (図2-12)はそれぞれ、60°C 30分、70°C 30分の熱処理条件で安定であった。D108G/K131A (図2-13)の二重変異体は熱に極度に不安定で、60°C 10分の熱処理でも活性をほぼ失った。D108G/H262A、



D108G/H262G の熱安定性を確認した。MPFP、D108G、H262A、H262G、D108G/H262A、D108G/H262G を 80°C 10分の熱処理し、その基質に対する活性を比較した(図2-14)。

#### 2-6-4 変異によるリン酸供与体の変化

グリシンモチーフの4番目のグリシンをアスパラギン酸に変えるとリン酸供与体特異性が転換するという報告は既にあるため (Chi and Kemp 2000)、変異を施すことにより 野生型 MPFP に対する基質(PPi と F6P)の 動力学的パラメーターの変化以外に、リン酸供与体が PPi から ATP へ転換することを期待した。予想通りに D108G の変異体は PPi より ATP への基質親和性が大きくなった。K131 は活性部位モチーフの2番目のアミノ酸リジンであり、この残基に変異を入れた結果、耐熱性がほぼなくなり、活性を失ってしまった。また、PPi-PFK の特徴である Hairpin loop の先端に位置する H262 の変異は構造的に ATP が結合できる空間がもっと確保できると考え、ATP への基質親和性が上がると期待したが、結果は 野生型MPFP に対して変化はほぼなかった。

## 2-7 MPFP と変異体の大量培養と精製

### 2-7-1 MPFP

今までと同じく70°Cで30分間熱処理 MPFP をイオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose)により精製した後、活性のある画分の純度を SDS-PAGE で確認した。大腸菌由来の PPase は目的の MPFP より高塩濃度側で溶出した。熱処理の時間(70°C、1時間)および温度(80°C、30分)を上げても、MPFP の活性もタンパク質も安定に残存していることが確認され、さらに PPase は熱処理段階でほぼ除去できるので、熱処理は80°C、30分に決めた。そして、イオン交換クロマトグラフィー精製後の比活性を比較した結果、70°C、30分間熱処理の場合 6.8 U/mg、80°C、30分間熱処理の場合は 4.6 U/mg であった(表2-3)。

### 2-7-2 D108G

変異体 D108G の場合は small scale (5 ml)で60°C、30分と70°C、20分の熱処理を試した後、変異体でも熱安定性を維持していることを確認した(図2-8)。そして、大量培養の時

には70°C、30分間熱処理とイオン交換クロマトグラフィー精製を行い、比活性を求めた。元々 PPi であったリン酸供与体がアスパラギン酸をグリシンに置換しただけで、PPi より ATP に対する活性がとて高くなり、その比率は small scale では70°C、20分の熱処理の場合、ATP:PPi=7.7:1 (図2-8、sample No.9 ( $A_{340}/\text{min}$  ; ATP 0.24 / PPi 0.031)) で、PPi に対する活性はほぼなくなり、ATP-PFK に変換すると思った。しかし、大量培養の場合、70°Cまたは80°C、30分間熱処理の後、比活性の比率は ATP:PPi=1.6:1 (表2-4、比活性 (U/mg) ; ATP 4.9 / PPi 2.97)、リン酸供与体として ATP と PPi 両方利用できることが分かった。

### 2-7-3 H262A と H262G

D108G と同じく H262A、H262G もまず small scale で培養し、熱安定性を確認した。これらの変異体は ATP が結合する場合には、Hairpin loopの先端に位置し、立体障害を起こるので、変異させると D108G 同様に ATP に対して活性を持つと予想した。しかし、H262A、H262G は ATP に対する活性は見えなかったため、2つのうち、H262A だけ大量培養した。80°C、20分間の熱処理、イオン交換クロマトグラフィーより精製した比活性は 11.1 U/mg であった(表2-5)。

### 2-7-4 D108G/H262A、D108G/H262G

MPFP に比べ、D108G で ATP に対する活性が高くなり、H262A、H262Gではあまり変化は見られなかった。さらに、D108G/H262A、D108G/H262G の二重変異体も D108G と同様に ATP に対する活性が上がったことで、これらの比活性を求め、比較する必要がある。

## 2-8 MPFP と変異体の動力学的パラメーター

熱処理とイオン交換クロマトグラフィーにより精製された試料を用いて、 $K_m$  と  $k_{cat}$  を求めた。H262A によるリン酸供与体の変換は起こらず、 $K_m$  が MPFP に比べて約 1/3 になり、

$k_{cat}$  値に大きな変化はなかったため、 $k_{cat}/K_m$  値が約 3倍になった。D108G は ATP、PPi に対する活性を両方持ち、野生型の PPi に対する動力学定数に比べて、D108G の ATP にたいする  $K_m$  値は約 1/2 になったものの、 $k_{cat}$  値も低下したため、 $k_{cat}/K_m$  値ではほぼ同じ値となった。D108G の PPi に対する  $K_m$  は MPFP と変わらなかったが、 $k_{cat}/K_m$  値が3倍以上低下した(図2-15、表2-6)。

## 第2章のまとめ

本章では、超好熱性バクテリアである *Thermotoga maritima* 由来のPPi-PFK (MPFP) のモデリング構造を構築した。PFK のグループII に属する MPFP は、立体構造が既に解析されている 同じグループIIの PFK、グループIII の TFPF と最も高いアミノ酸配列同一性 (29%) を示した。そこで、PPi-PFK であり、アミノ酸配列同一性も高い、MPFP はTFPF と共通する分子構造を有すると考えた。TFPF の立体構造決定から分かった、リン酸供与体基質と深い関係のある、D102、K123、Y232 が MPFP のD108、K131、H262 と相応する位置にあることを確認した。これら3つのアミノ酸をそれぞれD108G、K131A または K131G、H262A またはH262G に変異させた。その結果、D108G はATP-PFK とPPi-PFK 活性を両方有することになり、K131A と K131G は熱処理で失活した。また、H262A と H262G は基質に対する活性の変化は特に示さなかった。しかし、動力学的パラメーターを求めた結果、 $k_{cat}/K_m$  が MPFP に比べ、約 3倍になったことが分かった。

PFK のリン酸供与体の特異性を決定する残基はグリシンモチーフの4番目アスパラギン酸であることを確かめた。

表2-1 変異体のプライマー設計と PCR 反応

A		変異体		primer	
D108G	5'	GGGACGGCACCGC	TTCTCCGCGAGCAAAG	3'	AATGATAGCCGCCCTGCGGTGGCGC
K131G	5'	CGTTCCAGGCACTATAGACAACGATCTC		3'	TTCCACCAGGTGCAAGGTCCGTGATATC
K131A	5'	CCACGTTCCAGGCACTATAGACAACGATCTCCC		3'	CCACCAGGTGCAAGGTCCGTGATATCTG
H262A	5'	AAAGACCCAGGGGACACCTGAGACTTGACAG		3'	CTATCAGCTTTTTCTGGGTCCGCCTGTGG
H262G	5'	AAAGACCCAGGGGACACCTGAGACTTGACAG		3'	CTATCAGCTTTTTCTGGGTCCGCCTGTGG

B		PCR 反応液組成		PCR 条件	
		PrimeSTAR Max premix (x2)	25 $\mu$ l	95°C 1 min	} x 30
		Primer 1 (5 PM)	2 $\mu$ l	98°C 10 sec	
		Primer 2 (5 PM)	2 $\mu$ l	55°C 15 sec	
		Template (100 pg/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	72°C 5 sec./kb	
		H <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l	4°C	

表2-2 構造解析済みの他の PFK と MPFP のアミノ酸配列同一性

グループ	種	総残基(a.a)	リン酸供与体	PDB ID	配列同一性(%)
I	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	319	ATP	1mto	31
I	<i>Bacillus subtilis</i>	319	ATP	4a3s	30
I	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	319	ATP	1zxx	28
I	<i>Escherichia coli</i>	320	ATP	1pfk	27
II	<i>Borrelia burgdorferi</i>	555	PPi	2f48	27
II	<i>Trypanosoma brucei</i>	487	ATP	3f5m	22
I	<i>Pichia pastoris</i>	989	ATP	3opy	20
I	<i>Rabbit muscle skeleton</i>	762	ATP	3o8l	19
I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	787	ATP	3o8o	19
II	<i>Nitrospira multiformis</i>	419	PPi	3hno	17
II	<i>Marinobacter aquaeolei</i>	420	PPi	3k2q	13

MPFP 構造の構築のテンプレートとして、アミノ酸配列同一性27%の *B. burgdorferi* PPi-PFK (BbPFP) が選ばれた。

**表2-3 MPFP 精製表**

Heat treatment	Purification Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific Activity (U/mg)
70°C 30 min	DEAE	75.8	11.1	6.8
80°C 30 min	Crude	379.3	434.7	0.87
	H-sup.	137.7	71.5	1.9
	DEAE	98.7	21.3	4.63

H-sup. ; Heat treatment supernatant

**表2-4 D108G 精製表**

Heat treatment	Purification Step	Total activity (U) ATP/PPI	Total protein (mg)	Specific Activity (U/mg) ATP/PPI
70°C 30 min	DEAE	74.2/46.7	9.9	7.5/4.7
80°C 30 min	Crude	316.1/282.2	443.9	0.71/0.63
	H-sup.	60.9/31.3	50.2	1.2/0.62
	DEAE	63.8/38.7	13.0	4.9/2.97

**表2-5 H262A 精製表**

Heat treatment	Purification Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific Activity (U/mg)
80°C 20 min	Crude	433.5	596.4	0.72
	H-sup.	124.2	141.8	0.87
	DEAE	177.4	15.9	11.1

**表2-6 MPFP とその変異体の活性**

Enzyme	Substrate	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM)
MPFP	PPI	1.93±0.07	0.038±0.004	50.7
H262A	PPI	2.15±0.13	0.012±0.002	179.1
D108G	ATP	0.69±0.01	0.016±0.002	43
	PPI	0.56±0.01	0.036±0.003	15

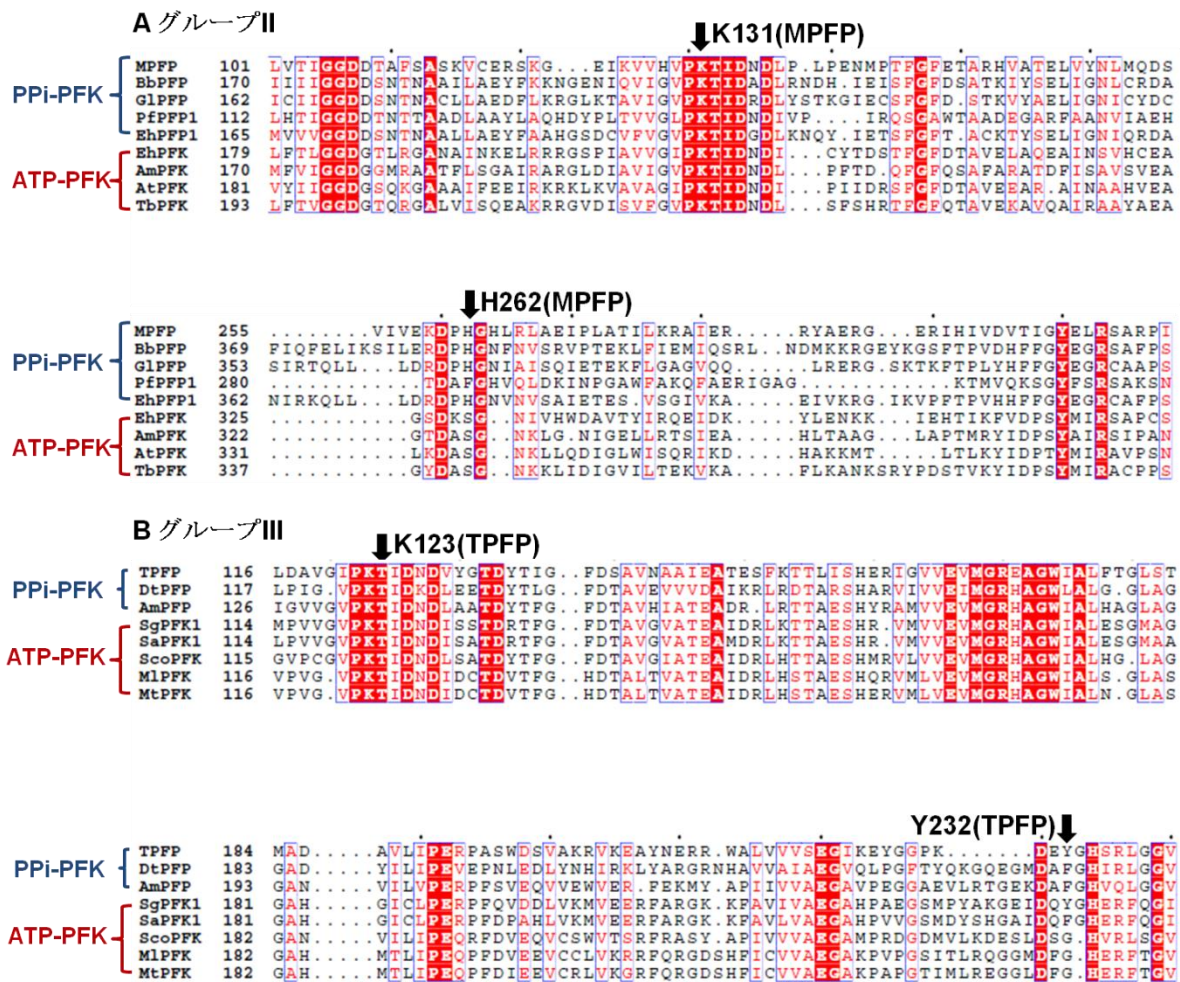


図2-1 グループII とグループIII アミノ酸配列アラインメント

グループII のATP-PFK はセリン(S)であり、PPI-PFK はヒスチジン(H)であった。グループIII PPI-PFK はチロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)のような大きなアミノ酸で、ATP-PFK は Y や F もあるが、グリシン(G)、セリン(S)のような小さいアミノ酸であった。MPFP、*Thermotoga maritima* BbPFP、*Borrelia burgdorferi* GIPFP、*Giardia lamblia* PfPFP1、*Propionibacterium freudenreichii* EhPFP1、*Entamoeba histolytica*(PP1) EhPFPK、*Entamoeba histolytica* AmPFPK、*Acidomonas methanolica* AtPFPK、*Arabidopsis thaliana* TbPFPK、*Trypanosoma brucei* TPFP、*Thermoproteus tenax* DtPFP、*Dictyoglomus thermophilum* AmPFP、*Acidomonas methanolica* SgPFP1、*Streptomyces griseus* SaPFP1、*Streptomyces avermitilis* ScoPFP、*Streptomyces coelicolor* MIPFPK、*Mycobacterium leprae* MtPFPK、*Mycobacterium tuberculosis*



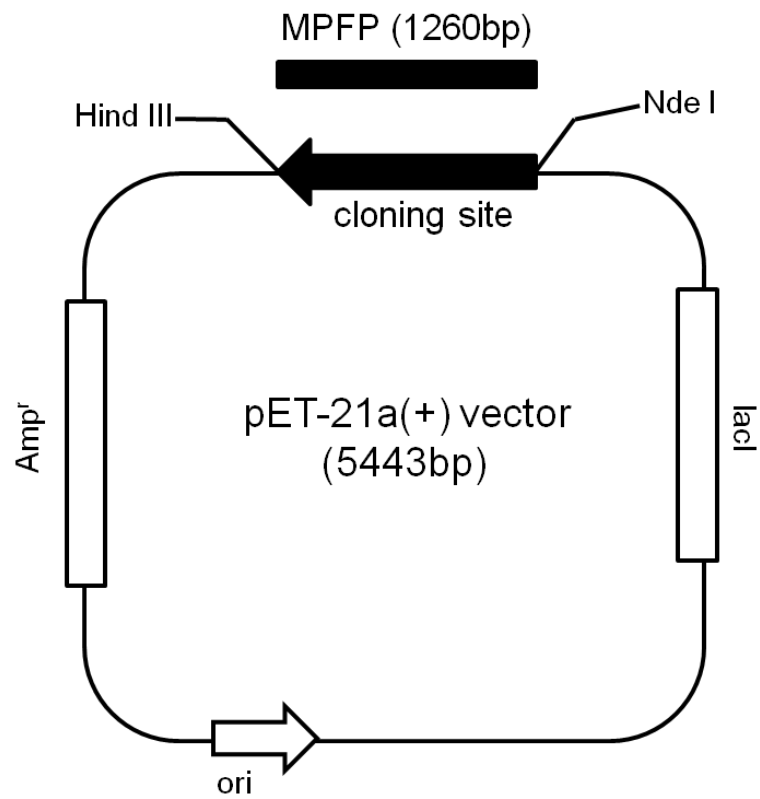
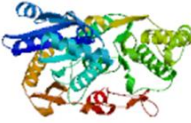


図2-2 MPFP の 発現用のベクターpET21a(+)

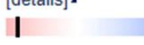
ori ; 複製起点、Amp<sup>r</sup> ; アンピシリン耐性遺伝子

**Model Summary** ?



**Model information:**

Modelled residue range: 2 to 391  
 Based on template: [2f48B] (2.11 Å)  
 Sequence Identity [%]: 26.58  
 Evalue: 0.00e-1

**Quality information:** [details] 

**Quaternary structure information:** [details]

Template (2f48): DIMER  
 Model built: SINGLE CHAIN

**Ligand information:** [details]

Ligands in the template: AF3: 1, FBP: 1.  
 Ligands in the model: none.

logs: [Templates] [Alignment] [Modeling]  
 display model: as [pdb] - as [DeepView project] - in [AstexViewer]  
 download model: as [pdb] - as [Deepview project] - as [text]

BbPFP PDB ID 2f48 (A chain ; FBP 結合、B chain ; AF3 結合)のうち、B chain が MPFP 構造の構築のテンプレートとして用いられた。

## 図2-3 MPFP モデリング の結果



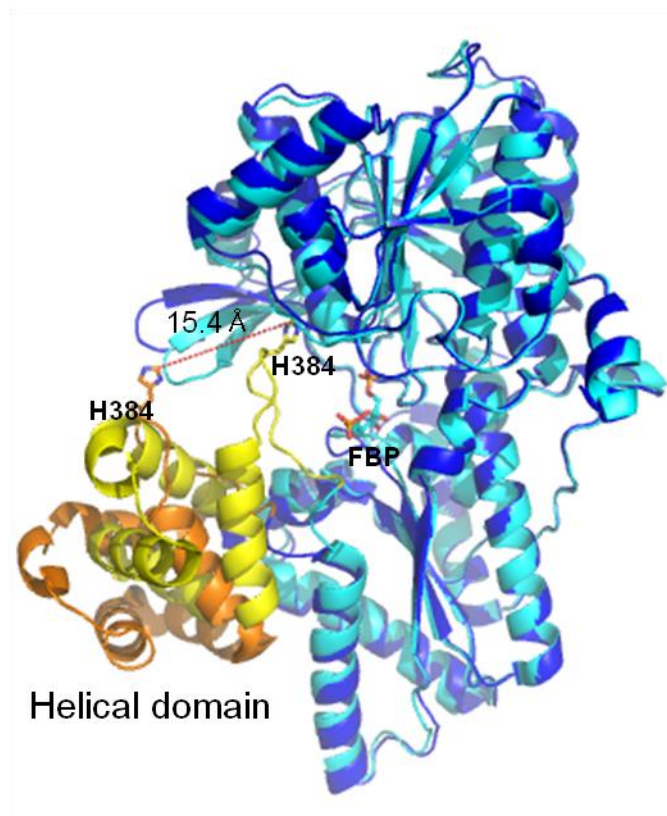
## 図2-4 BbPFP と モデリング MPFP、TPFP との アミノ酸配列のアラインメントと重ね合わせ

A. TFPF の構造から決められた変異の対象アミノ酸は D102、K123 と Y232 で、これらはそれぞれグリシンモチーフ、活性部位モチーフ、そして、Hairpin loopに属する。

▲のD102、K123 と Y232 は TFPF におけるアミノ酸番号で、D102、K123 の場合、MPFP、BbPFP でも強く保存されているアミノ酸であり、Y232の場合は MPFP、BbPFP ではヒスチジンとして保存され、それぞれ D108 と D177、K131 と K203、そして、H262 と H384 に対応する。

B. BbPFP の A subunit (FBP 結合、cyan)と TFPF の A subunit (FBP 結合、green) の重ね合わせ (RMSD =1.581 Å)と変異体対象のアミノ酸と TFPF でリガンド FBP と直接に相互作用するアミノ酸を表して、重ね合わせた(RMSD =0.493 Å)。

C. BbPFP の B subunit (AF3;aluminium fluoride 結合)と MPFP (yellow)の B subunit の重ね合わせ (RMSD 0.581 Å)とB で表したアミノ酸と対応する MPFP のアミノ酸との重ね合わせ(RMSD =0.074 Å)



**図2-5 BbPFP の A サブユニット(FBP 結合、cyan ;closed)と  
B サブユニット(AF3 結合、blue ;open)の重ね合わせ**

Hairpin loopを含む Helical domain (yellow ; closed、orange ; open)は各サブユニットに結合するリガンドにより変化する。Hairpin loopの先端に位置する H384 は15.4Å 離れる。

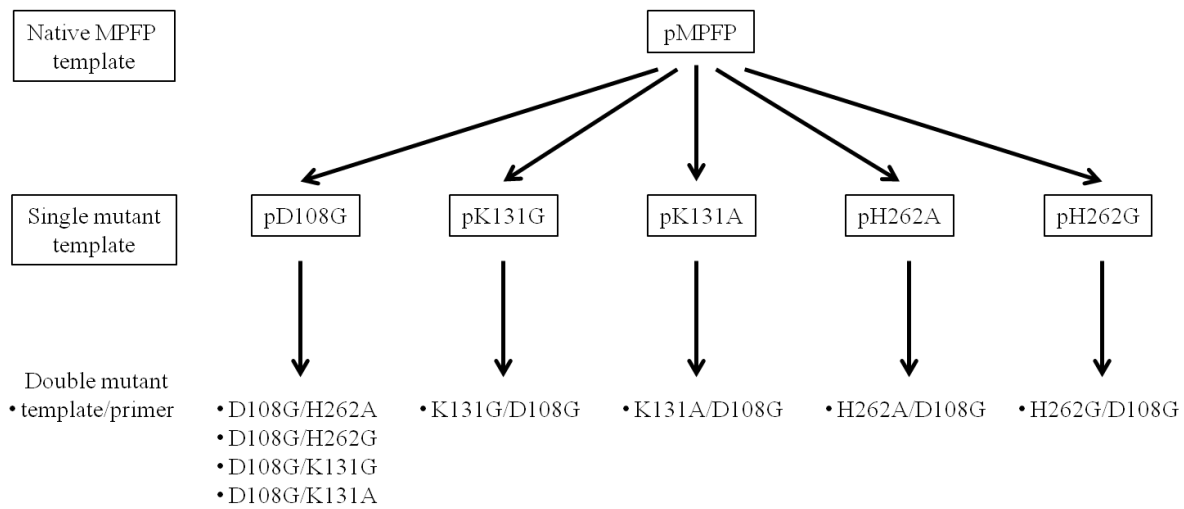


图2-6 變異体作成

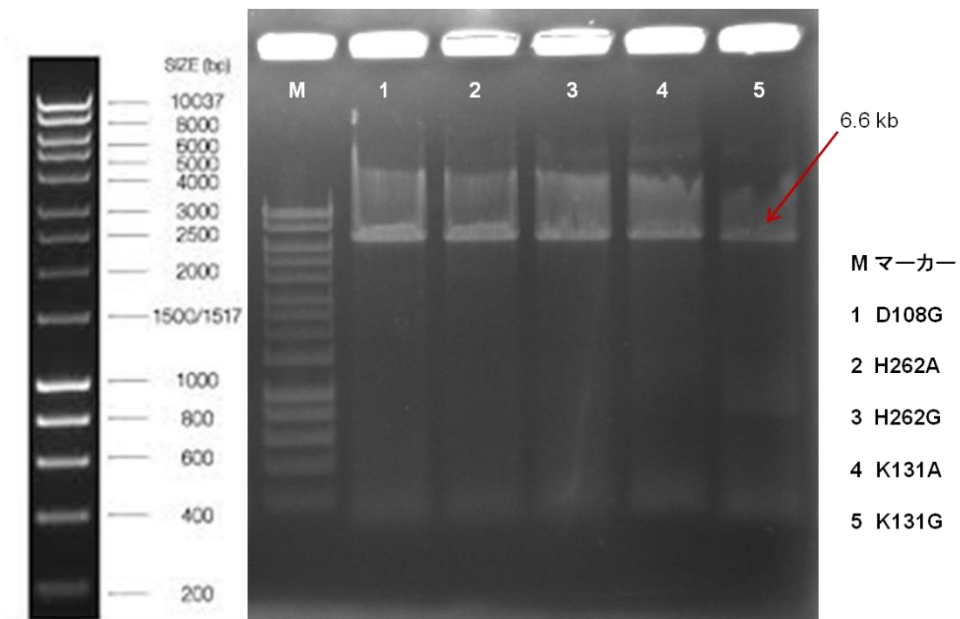


図2-7 MPFP の変異体

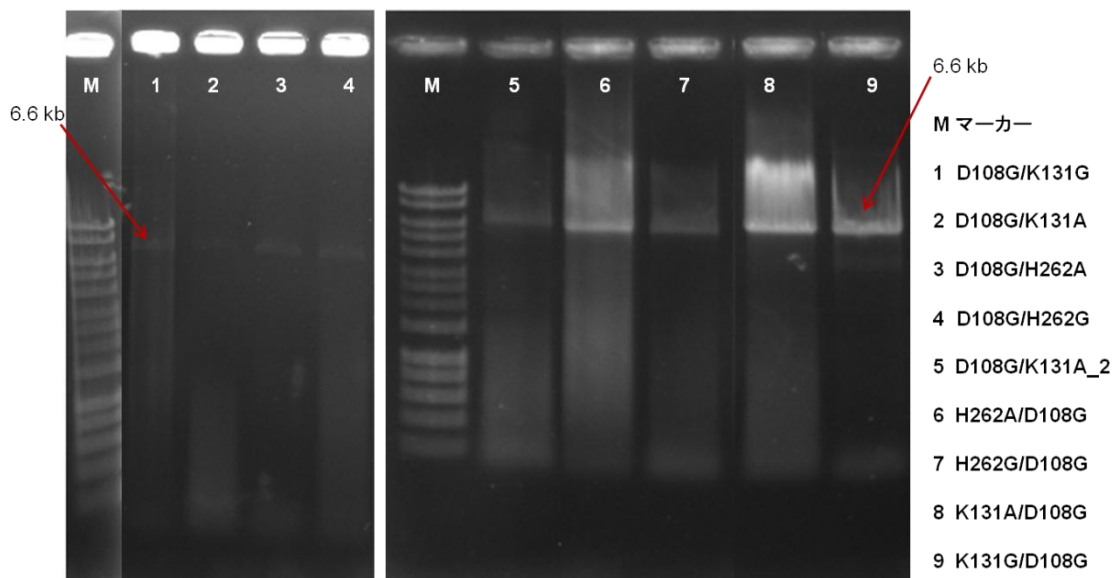
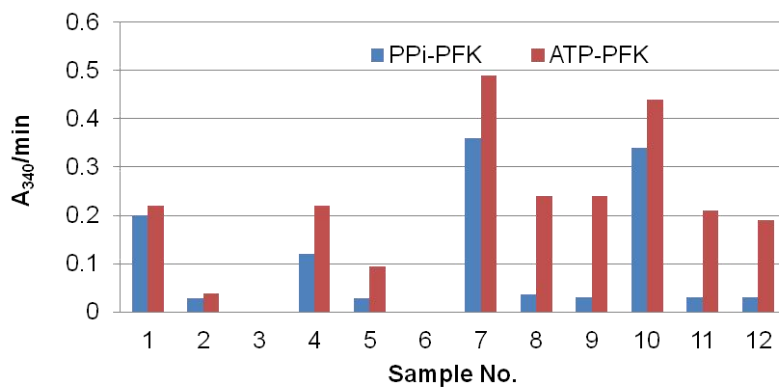


図2-8 MPFP の二重変異体

### D108G activity



Host	No.	
BL21(DE3) C+RIL	1	colony1 crude
	2	60 °C 30 min
	3	70 °C 20 min
	4	colony2 crude
	5	60 °C 30 min
	6	70 °C 20 min
	7	colony3 crude
	8	60 °C 30 min
	9	70 °C 20 min
	10	colony4 crude
	11	60 °C 30 min
	12	70 °C 20 min

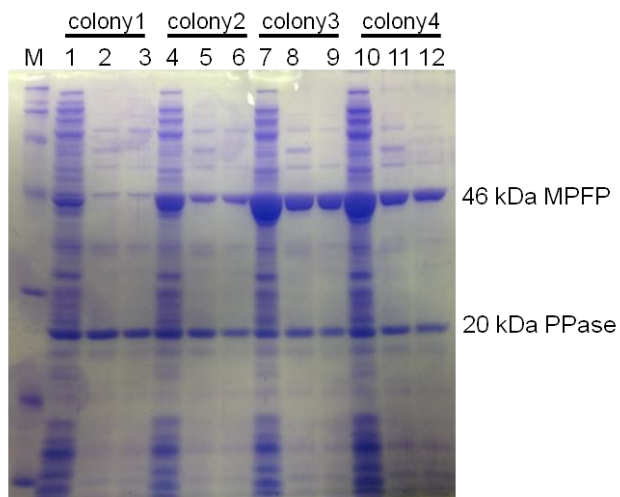
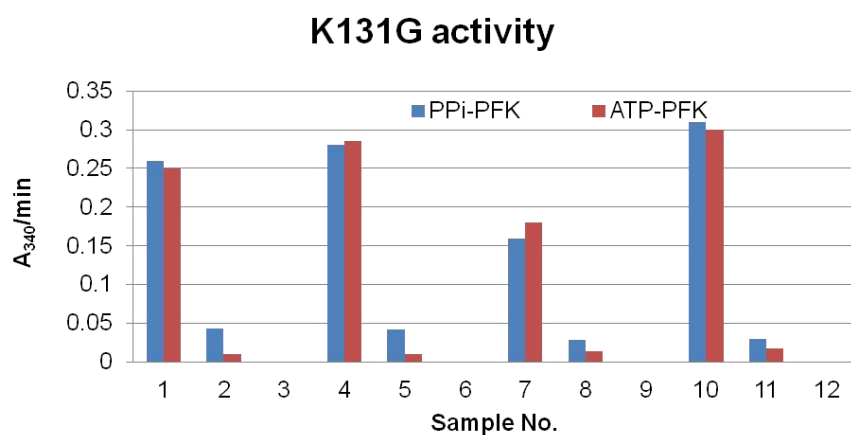
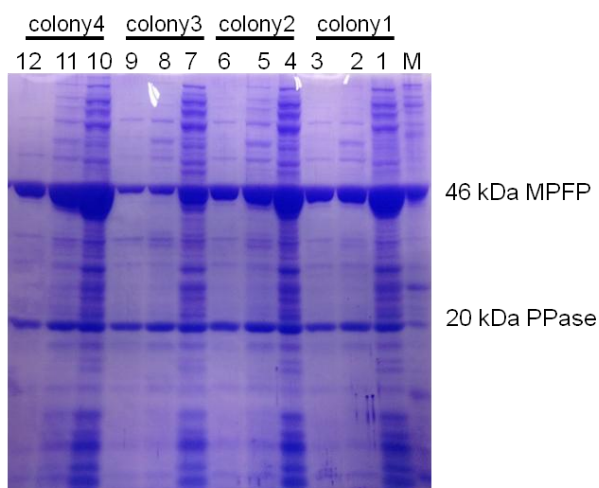


図2-9 D108G のリン酸供与体の変換と耐熱性の確認



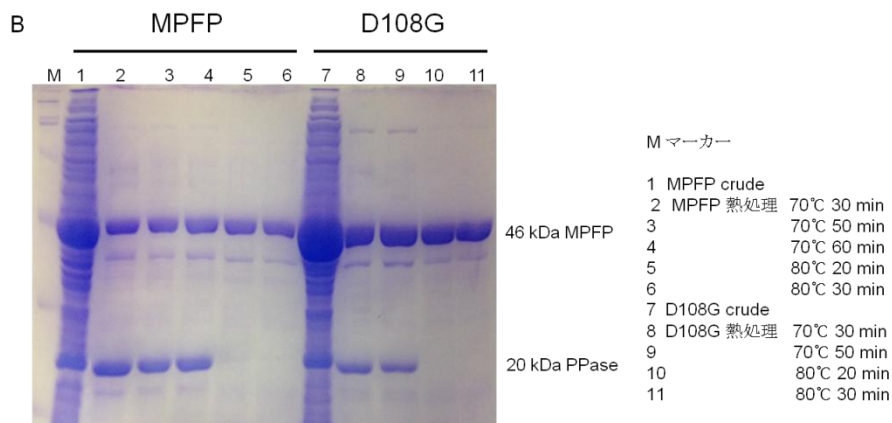
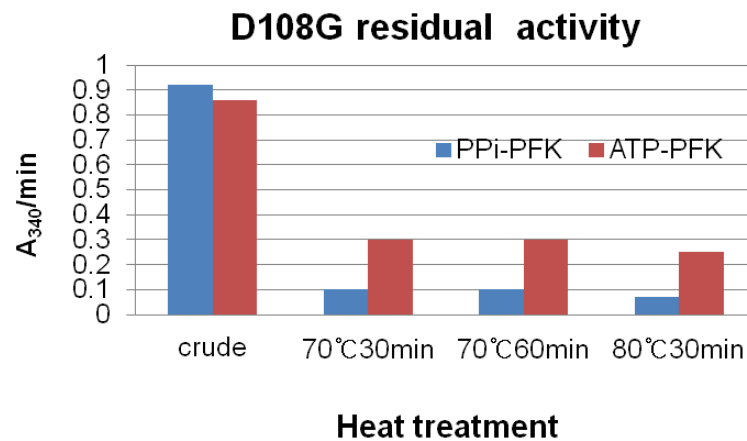
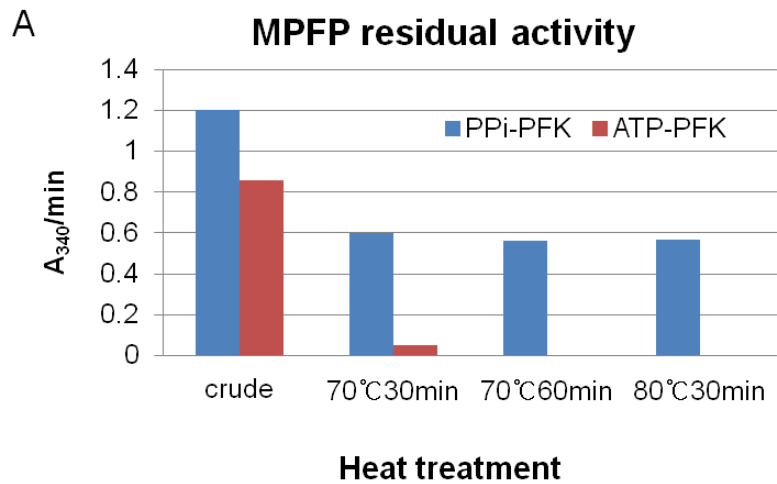


Host	No.	
BL21(DE3) C+RIL	1	colony1 crude
	2	60 °C 30 min
	3	70 °C 20 min
	4	colony2 crude
	5	60 °C 30 min
	6	70 °C 20 min
	7	colony3 crude
	8	60 °C 30 min
	9	70 °C 20 min
	10	colony4 crude
	11	60 °C 30 min
	12	70 °C 20 min



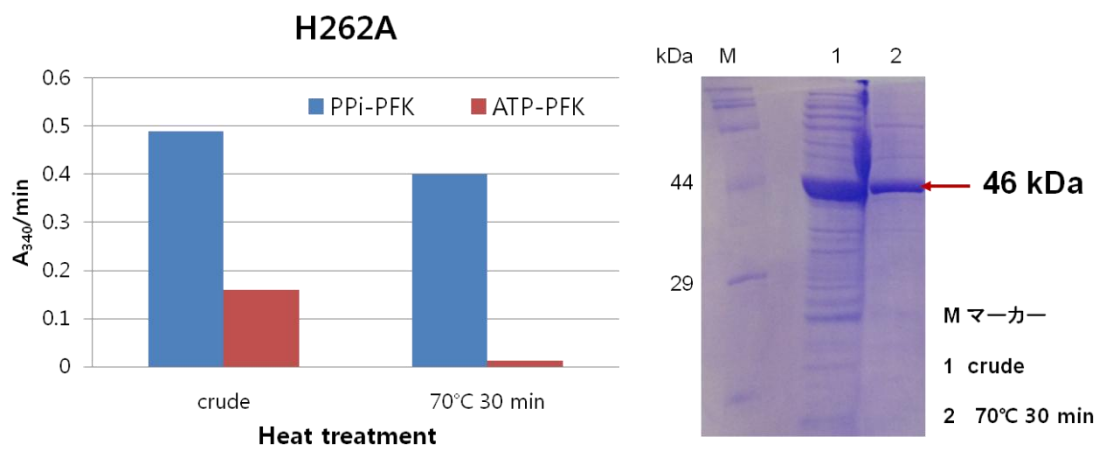
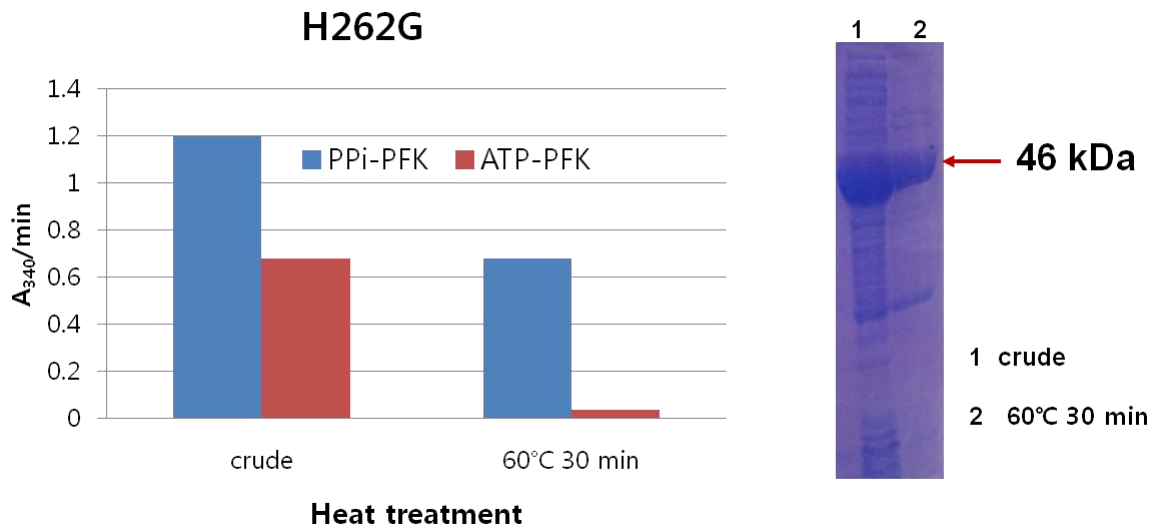
**図2-10 K131G の耐熱性と**

熱処理の後、タンパク質は十分残っていたが、活性をほぼ失った。K131A も同様の結果であった。



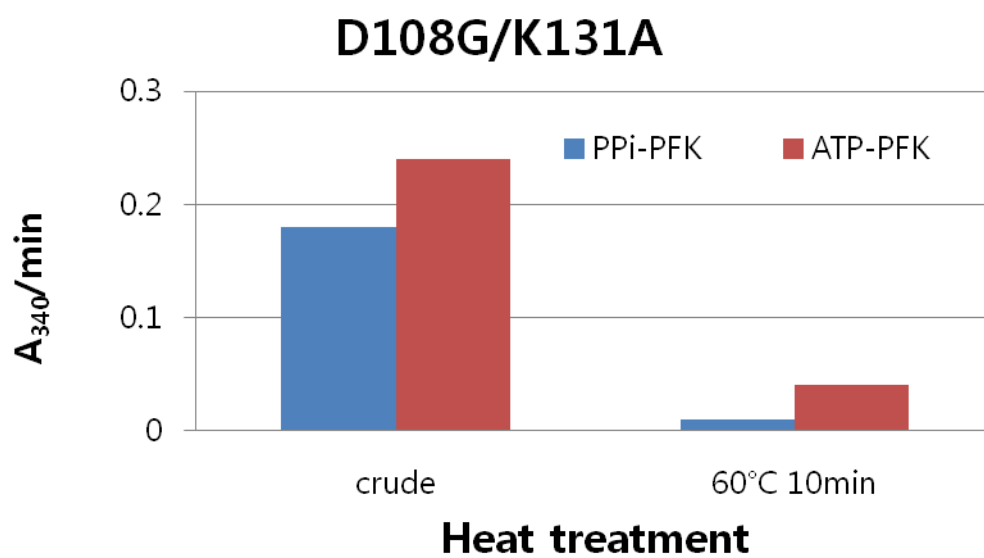
**図2-11 MPFP と D108G の熱に対する残存活性**

10  $\mu$ l の試料を用いて50°Cで活性を測定した。熱処理の時間を長く、または、温度を上げても安定であった。さらに、温度を上げると、20 kDa の大腸菌由来の耐熱性 PPase が変性除去された。



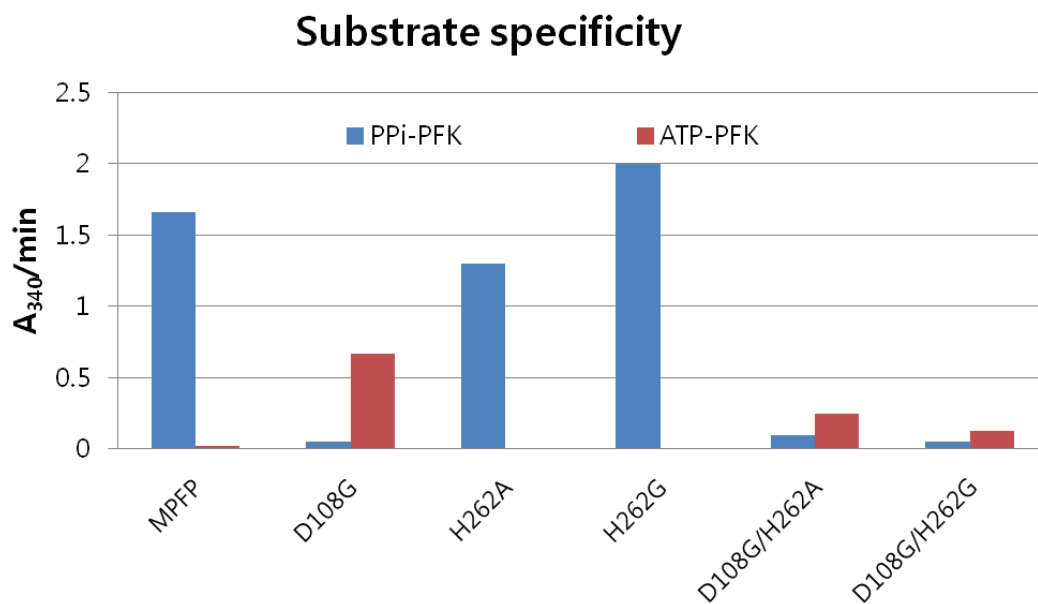
**図2-12 H262G と H262A の熱安定性の確認**

H262G と H262A の変異体は熱に安定であったが、期待した ATP に対する活性は示さない。



**図2-13 D108G/K131A の熱安定性の確認**

K131 単変異体は熱に不安定であることが分かったが、二重変異体である D108G/K131A の場合も同様であった。



Heat treatment	PPI-PFK	ATP-PFK
80°C 10min	比活性 (U/mg)	比活性 (U/mg)
MPFP	10.6	0.13
D108G	0.35	5.1
H262A	7.9	0.056
H262G	16.1	0.075
D108G/H262A	0.8	2
D108G/H262G	0.4	1.2

**図2-14 MPFP と変異体の基質に対する活性の比較**

H262 の単変異体は予想外に ATP の活性を持たず、二重変異体の結果から見ても、このアミノ酸は MPFP のリン酸供与体基質の認識に関与しないことが分かった。

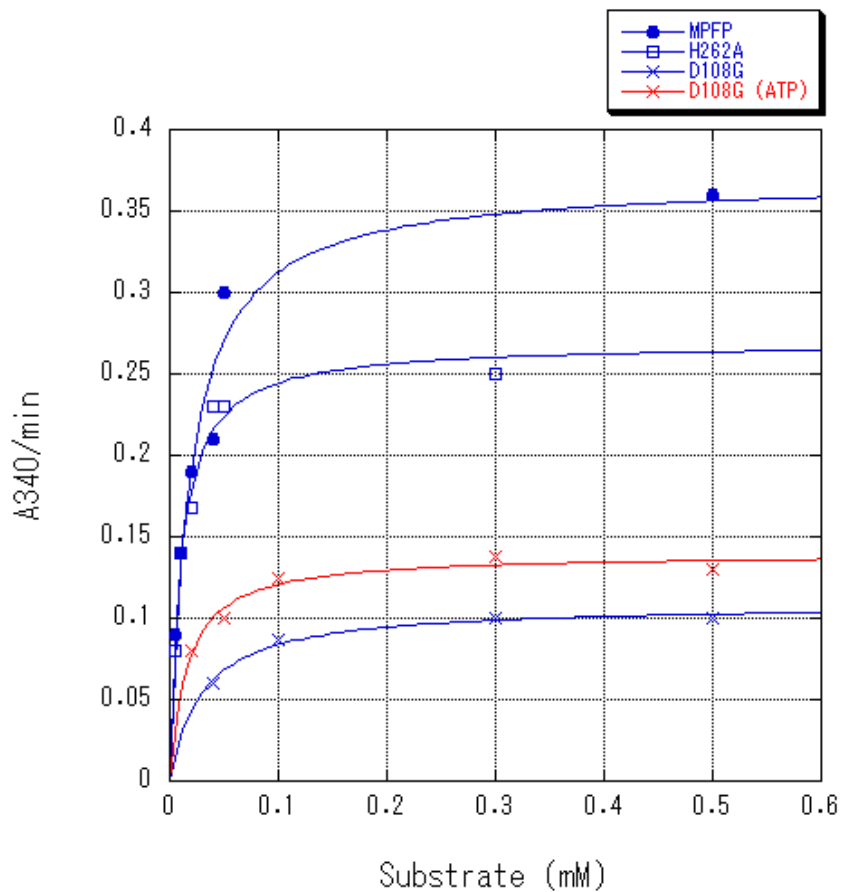


図2-15 MPFP とその変異体の飽和曲線

Ppi-PFK 活性は青、ATP-PFK 活性を持つD108G は赤で示した。

## 付録

超好熱菌由来の糖新生二機能酵素 **fructose 1,6-bisphosphate  
aldolase/phosphatase (FBPA/P)** の機能解析

## 序

グルコースからピルビン酸、乳酸などを生成する解糖系の逆反応をする糖新生はピルビン酸、乳酸などの糖質以外の物質から、グルコースを生産する同化経路である。典型的な解糖系には3か所の不可逆反応があり、これらの逆反応をするには解糖系で可能な酵素がないため、糖新生系専用の酵素が働く。そのうち1つの酵素がフルクトース-1,6-ビスリン酸(FBP)からフルクトース-6-リン酸(F6P)を生成するフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase、EC 3.1.3.11)である。

FBPase はアミノ酸配列の類似性に基づいて5つのグループに分類される (Verhees et al. 2002)。グループI、II、III は真核生物および細菌から同定され (Donahue et al. 2000)、メタン生産の古細菌のゲノム解析によりイノシトール-1-ホスファターゼ(IMPase)の活性も有する新しい FBPase (グループIV)が発見された(Stec et al. 2000)。その後、好熱性古細菌および超好熱性細菌から新しい FBPase が発見され (Rashid et al. 2002)、グループVに属する。本研究室では、好酸好熱性古細菌である *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の FBPase の立体構造を初めて解析した (Nishimasu et al. 2004)。

グループV の構造解析により、基質 FBP が予想外の形で *Sulfolobus tokodaii* 由来 Fructose 1,6- bisphosphatase (ST0318) に結合していることが判明した。これまでに報告されている FBPase 基質複合体の結晶構造には環状の FBP が結合しているのに対して、ST0318に結合した FBP (St-FBP)には直鎖状の FBP が結合して、6つのループ部分によって認識される (Nishimasu et al. 2004)ことが分かった(付録図1)。2010年、ドイツの Say と Fuchs が、独立栄養性の古細菌の糖新生系で働く FBP aldolase を単離を試みたところ、グループV に属する FBPase と同一のタンパク質であることが分かった。FBP aldolase の反応後、FBP phosphatase 反応をする、1つの酵素が2つの反応を触媒すると実験により証明し(付録図2)、この酵素を FBP aldolase/phosphatase (FBPA/P) とした(Say and Fuchs 2010)。基質であるジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)とLys232 がアルドラーゼ反応の中間体であるシッフ塩基をつくると報告したが、Lys232 は St-FBP の立体構造では FBP 結合部位から 17 Å も離れており、同一の活性中心で2つの反応を触媒されるのかの大きな謎が生じた。そこで、ST0318 とジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)の複合体のX線構



造解析により、その謎を解明することを目的とした。

私は、本研究で酵素活性測定の部分を担当していたので、付録として簡単に紹介する。

## 実験の方法

### ST0318 の精製、結晶化

野生型 ST0318 とその変異体のタンパク質は、2004年 Nishimasu の方法 (Nishimasu et al. 2004)によりを大腸菌に組み換えし、精製した。結晶化はシッティングドロップ方法により25°Cで行った。X線回折データは高エネルギー加速器研究機構(つくば)のビームライン AR NW12A で行った。FBP 複合体の構造 (PDB code 1UMG) を用いて、DHAP 複合体の構造を構築した (Fushinobu et al. 2011)。

### 酵素活性測定

活性は精製した組み換え酵素 ST0318 を用いて、Say と Fuchs の方法(Say and Fuchs 2010)を参考にFBP phosphatase と FBP aldolase を continuous assay で測定した(付録図 3)。反応は48°Cで行い、1 unit (U)は1分間あたりの1  $\mu\text{mol}$  の基質転換と定めた。

### FBP phosphatase (FBPase) 測定

FBP 依存性の F6P 形成はホスホグルコースイソメラーゼ (PGI) とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをカップリング (G6PDH) 酵素として過剰量加え、340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}} \text{ NADPH} = 6,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )で NADPH の生成を観察した。

活性測定溶液の組成は 100 mM Tris-HCl pH 7.8、20 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM DTT、0.5 mM  $\text{NADP}^+$ 、1 U PGI、1 U G6PD、そして、0.01–0.3 mM FBP からなる。この溶液に精製したタンパク質 FBPA/P を添加して酵素反応を開始した。

### FBP aldolase 測定 (FBPA、anabolic direction)

Triosephosphate 依存性の F6P 形成は TIM、PGI、G6PDH 酵素を過剰量加え、340 nm で NADPH の生成を観察した。

活性測定溶液の組成は 100 mM Tricine-KOH pH 8.0、20 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM DTT、0.5 mM  $\text{NADP}^+$ 、4 U TIM、1 U PGI、1 U G6PDH からなり、この活性測定溶液をガラスセル

にいれ、4分間48℃で保温した。さらに、0.04~0.35 mM のグリセルアルデヒド三リン酸 (GA3P)を入れ、GA3P と DHAP が平衡になるまで待った。

この溶液に精製したタンパク質 FBPA/P を添加して酵素反応を開始した。

#### **FBP aldolase 測定 (FBPA, catabolic direction)**

FBP 依存性の triosephosphates 生成は TIM、GPDH 酵素を過剰量加え、NADH の酸化を 365 nm ( $\epsilon_{365\text{nm}} \text{NADH} = 3,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )で観察した。

活性測定溶液の組成は 100 mM Tricine-KOH pH 8.0、20 mM  $\text{MgCl}_2$ 、20 mM DTT、0.55 mM NADH、20 U TIM、2 U GPDH からなる。

この溶液に精製したタンパク質 FBPA/P を添加して酵素反応を開始した。

## 結果

### ST0318 の構造解析

共同研究者らとの構造解析の結果、ST-FBP (FBPase 型、PDB ID 1UMG) と DHAP-シッフ塩基複合体(FBPA 型)を比較することにより、ST-FBP の FBP を認識する活性部位にある6つのループのうち、蓋ループ (青、97–110)、シッフ塩基ループ(黄色、219–233)、そして、C-末端ループ(紫、346–361)の3つのループが大きく変わることが分かった(付録図4)。FBPase 型では、蓋ループ とC-末端ループは FBP と直接的に相互作用する。FBPA 型では、蓋ループとC-末端ループが活性部位から外側に向き、シッフ塩基ループが活性部位の方に入って DHAP と相互作用する。このように1つの活性部位で1つの酵素が大きな構造変化しながら、2段階の反応を担うことが分かった (Fushinobu et al. 2011)。

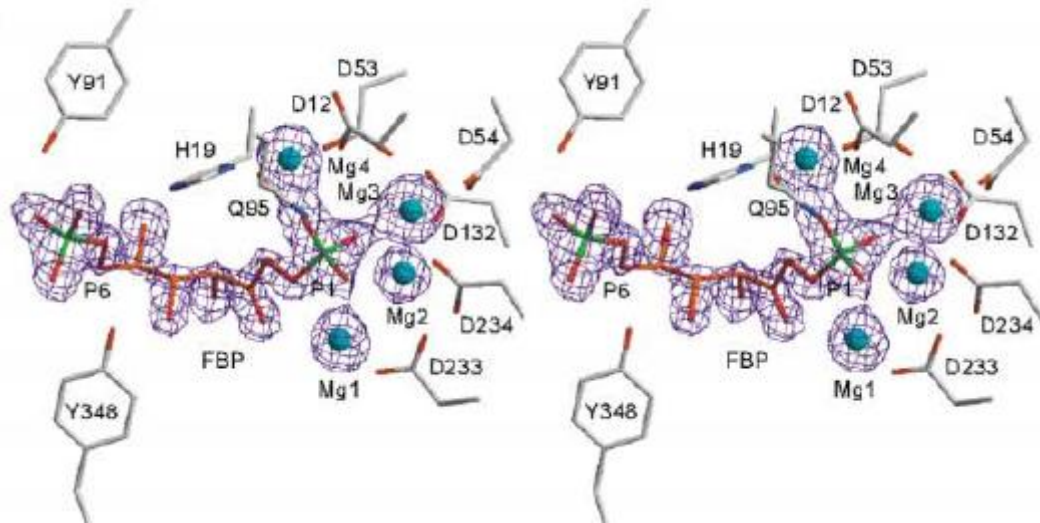
### 野生型 ST0318 と変異体の活性

私は FBPase 型の FBP と相互作用する Y348 と、FBPA 型の DHAP と相互作用する Y229 の変異体の活性を比較した(付録表1)。先ず第一に、*Sulfolobus tokodaii* FBPase にもFBP aldolase 活性があることが確認された。各反応の速度論定数は、Say & Fuchsが報告した値(付録図2)とほぼ同様であった(付録表1)。さらに、Y229F が FBPase 活性は維持するが、FBPA 活性を失うことで、このアミノ酸はすべての酵素反応の触媒に重要な役割をすることが分かった。

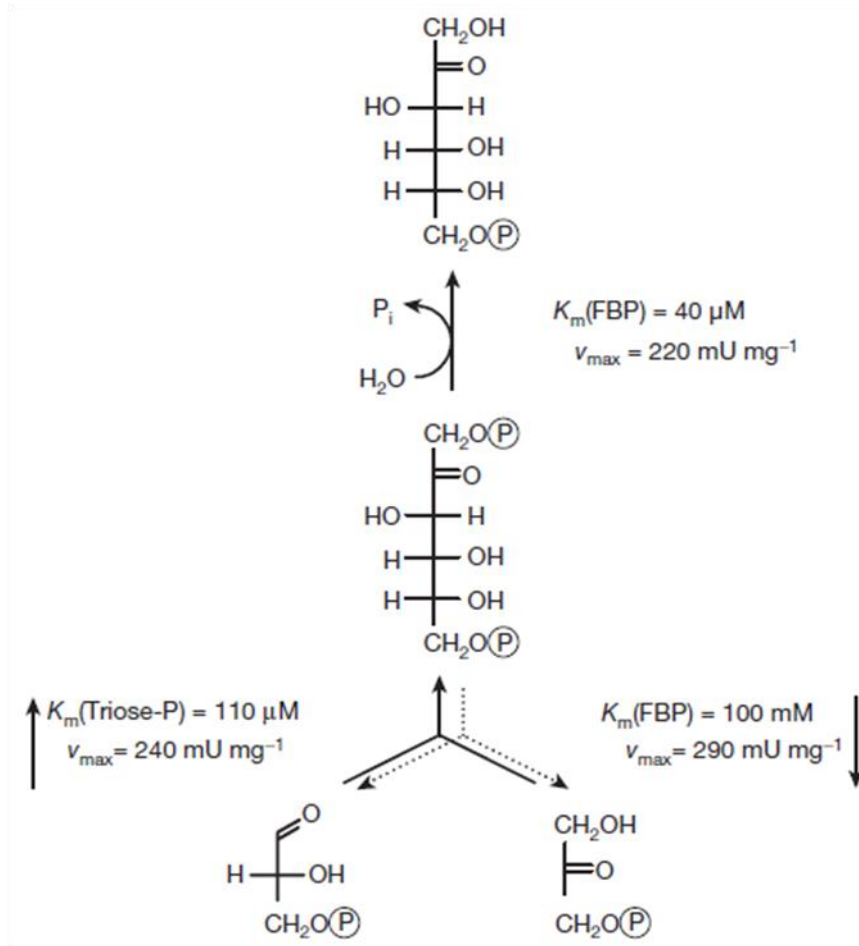
## 付録のまとめ

好熱性古細菌および超好熱性細菌 FBPAse はグループV に属し、FBP aldolase 反応 (FBPA 型) 後、FBP phosphatase 反応 (FBPase 型) をする、1つの酵素が2つの反応を触媒する (FBP aldolase/phosphatase (FBPA/P)) ことが分かった。

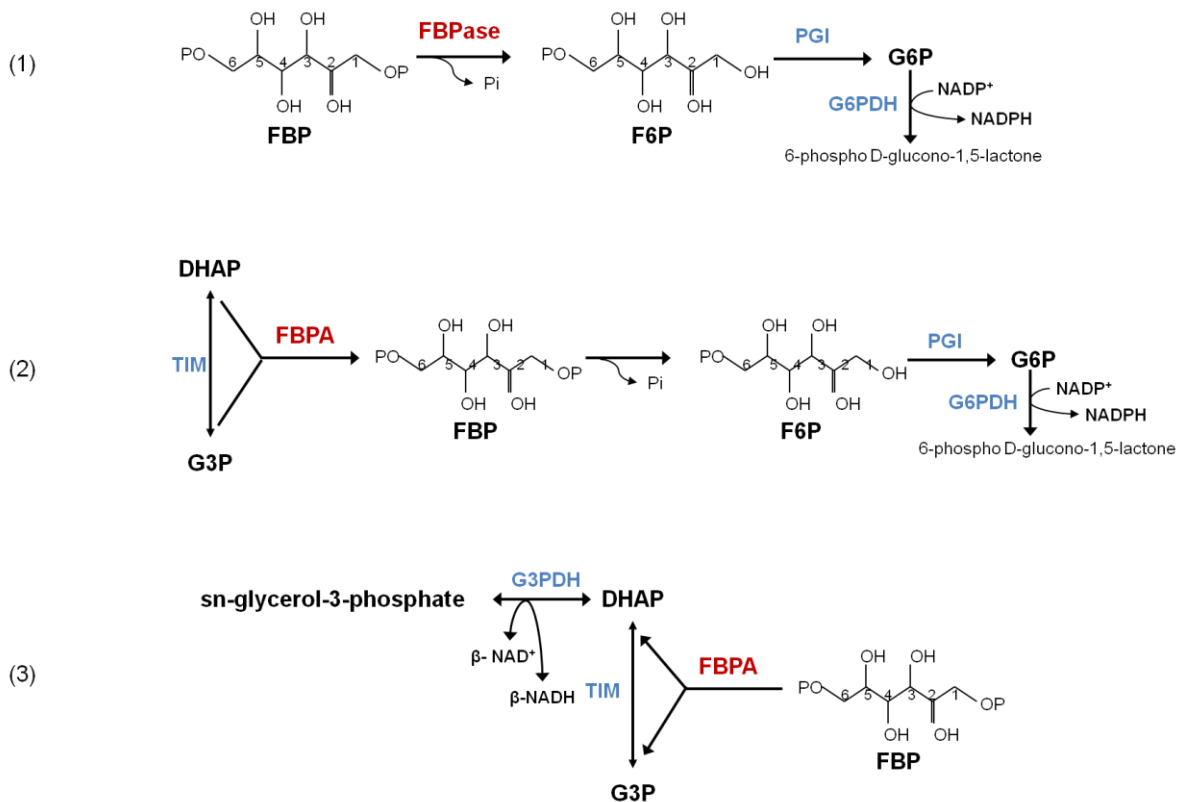
好酸好熱性古細菌である *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の FBPAse とDHAP 複合体 (FBPase 型) の X線構造解析を行い、FBP 複合体の FBPAse (FBPase 型) との構造比較により、FBPA/P の活性部位の3つのループが FBPA 型と FBPase 型で大きく変わることで、1つの活性中心で、2段階の酵素反応が起こることが分かった。これにより、直鎖状で結合していた FBP も理解でき、また、FBPA 型の DHAP と相互作用する Y229 の変異体作成により活性を比較した結果、Y229F が FBPAse 活性は維持するが、FBPA 活性を失うことで、このアミノ酸はすべての酵素反応の触媒に重要な役割をすることが分かった。



付録図1 *Sulfolobus tokodaii* 由来 Fructose 1,6- bisphosphatase (St-FBP) の活性中心のステレオ図 (Nishimasu et al. 2004) により引用



付録図2 Bifunctional FBP aldolase/phosphatase の反応  
 (Say and Fuchs 2010)から引用



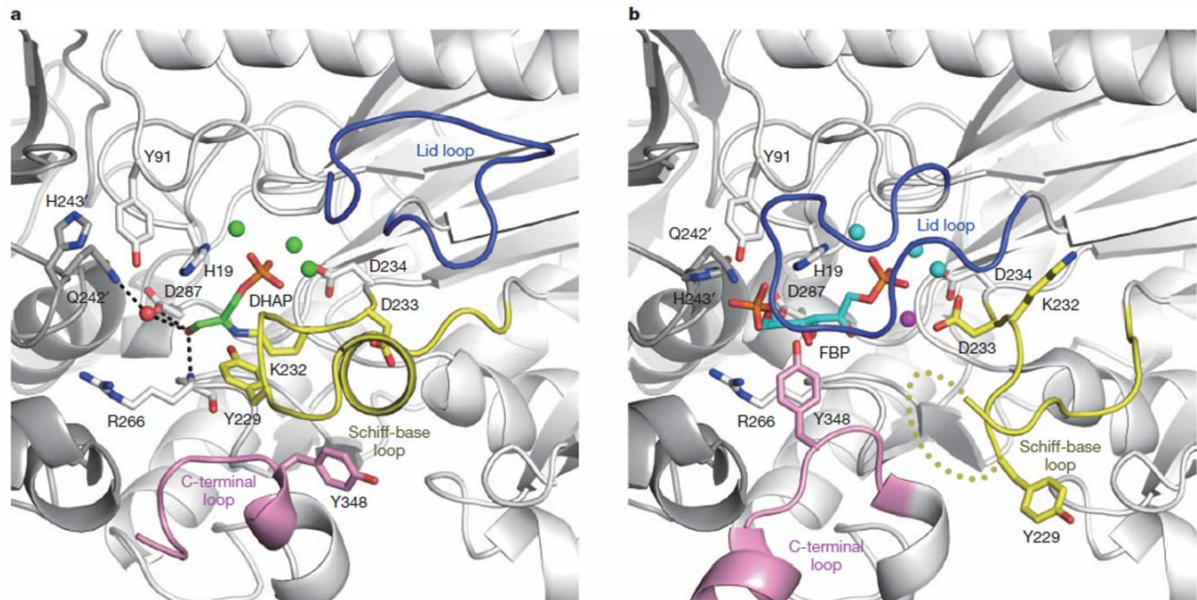
### 付録図3 酵素の活性方法

- (1) FBP phosphatase (**FBPase**) 活性 (2) FBP aldolase (**FBPA**, anabolic direction) 活性  
 (3) FBP aldolase (**FBPA**, catabolic direction) 活性

(1) ~ (3) の活性測定は赤字で示し、青字で示したカップリング酵素を加え、NADPH または、NADH の吸収を観測した。

FBP、フルクトース-1,6-ビスリン酸、 F6P、フルクトース-6-リン酸、 G6P、グルコース-6-リン酸  
 DHAP、ジヒドロキシアセトンリン酸、 G3P、グリセルアルデヒド-3 - リン酸、  
 PGI、ホスホグルコースイソメラーゼ、 G6PDH、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、 TIM、  
 トリオースリン酸イソメラーゼ、 G3PDH、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ





**付録図4 ST0318 活性部位の2つの構造**

a, DHAP- Schiff塩基複合体(FBPA 型)と b, FBP 複合体(FBPase 型, 1UMG)

付録表1 野生型 ST0318 とその変異体の活性

Enzyme	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{m}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ( $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
FBPase			
Wild type	$0.62 \pm 0.02$	$0.027 \pm 0.003$	23
Y229F	$0.66 \pm 0.02$	$0.027 \pm 0.003$	25
Y348F	$0.26 \pm 0.01$	$0.036 \pm 0.002$	7.2
FBPA (anabolic direction)			
Wild type	$0.91 \pm 0.04$	$0.19 \pm 0.02$	4.7
Y229F	ND*	–	–
Y348F	$0.10 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.04$	0.29
FBPA (catabolic direction)			
Wild type	$0.027 \pm 0.011$ †	–	–
Y229F	ND*	–	–
Y348F	$0.026 \pm 0.004$ †	–	–

\* ND, not detected.

† Enzyme activity was measured with 5 mM FBP.

## 引用文献

- Alves, A. M., G. J. Euverink, H. Santos and L. Dijkhuizen (2001). "Different physiological roles of ATP- and PP(i)-dependent phosphofructokinase isoenzymes in the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*." J Bacteriol **183** (24): 7231-7240.
- Bailey, S. (1994). "The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **50**: 760-763.
- Brunner, N. A. and R. Hensel (2001). "Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*." Hyperthermophilic Enzymes, Pt B **331**: 117-131.
- Brunner, N. A., B. Siebers and R. Hensel (2001). "Role of two different glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in controlling the reversible Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Thermoproteus tenax*: regulation on protein and transcript level." Extremophiles **5**(2): 101-109.
- Calvin, M. (1962). "Evolution of Photosynthetic Mechanisms." Perspectives in Biology and Medicine **5**(2): 147-+.
- Chi, A. and R. G. Kemp (2000). "The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate?" J Biol Chem **275**(46): 35677-35679.
- Cowtan, K. (2006). "The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 9): 1002-1011.
- DeLano, W. L. (2004). "Use of PYMOL as a communications tool for molecular science." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **228**: U313-U314.
- Ding, Y. R., R. S. Ronimus and H. W. Morgan (2001). "Thermotoga maritima phosphofructokinases: expression and characterization of two unique enzymes." J Bacteriol **183**(2): 791-794.
- Donahue, J. L., J. L. Bownas, W. G. Niehaus and T. J. Larson (2000). "Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*." J Bacteriol **182** (19): 5624-5627.
- Dorr, C., M. Zaparty, B. Tjaden, H. Brinkmann and B. Siebers (2003). "The hexo

kinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*. ATP-dependent hexokinases and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in Archaea." J Biol Chem **278**(21): 18744-18753.

Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith and J. C. Venter (1997). "Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*." Nature **390**(6660): 580-586.

Fushinobu, S., H. Nishimasu, D. Hattori, H. J. Song and T. Wakagi (2011). "Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase." Nature **478**(7370): 538-541.

Goldhammer, A. R. and H. H. Paradies (1979). "Phosphofructokinase: structure and function." Curr Top Cell Regul **15**: 109-141.

Greaves, R. B., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1999). "Automated production of small-molecule dictionaries for use in crystallographic refinements." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(Pt 7): 1335-1339.

Hansen, T. and P. Schonheit (2000). "Purification and properties of the first identified, archaeal, ATP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus*." Arch Microbiol **173**(2): 103-109.

Hensel, R., S. Laumann, J. Lang, H. Heumann and F. Lottspeich (1987). "Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*." Eur J Biochem **170**(1-2): 325-333.

Huber, R., T. A. Langworthy, H. König, M. Thomm, C. R. Woese, U. B. Sleytr and K. O. Stetter (1986). "Thermotoga-Maritima Sp-Nov Represents a New Genus of Unique Extremely Thermophilic Eubacteria Growing up to 90-Degrees-C." Archives of Microbiology **144**(4): 324-333.

Ito, S., S. Fushinobu, I. Yoshioka, S. Koga, H. Matsuzawa and T. Wakagi (2001).

"Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon." Structure **9**(3): 205-214.

Kengen, S. W. M., F. A. M. Debok, N. D. Vanloo, C. Dijkema, A. J. M. Stams and W. M. Devos (1994). "Evidence for the Operation of a Novel Embden-Meyerhof Pathway That Involves Adp-Dependent Kinases during Sugar Fermentation by *Pyrococcus-Furiosus*." Journal of Biological Chemistry **269**(26): 17537-17541.

Kulaev, I. S. and V. M. Vagabov (1983). "Polyphosphate metabolism in microorganisms." Adv Microb Physiol **24**: 83-171.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Long, F., A. A. Vagin, P. Young and G. N. Murshudov (2008). "BALBES: a molecular-replacement pipeline." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **64**: 125-132.

Martinez-Oyanedel, J., I. W. McNae, M. W. Nowicki, J. W. Keillor, P. A. Michels, L. A. Fothergill-Gilmore and M. D. Walkinshaw (2007). "The first crystal structure of phosphofructokinase from a eukaryote: *Trypanosoma brucei*." J Mol Biol **366**(4): 1185-1198.

Moochhala, S. H., J. A. Sayer, G. Carr and N. L. Simmons (2008). "Renal calcium stones: insights from the control of bone mineralization." Exp Physiol **93**(1): 43-49.

Moore, S. A., R. S. Ronimus, R. S. Roberson and H. W. Morgan (2002). "The structure of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*." Structure **10**(5): 659-671.

Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **53**: 240-255.

Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, L. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter and C. M. Fraser (1999). "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bact

eria from genome sequence of *Thermotoga maritima*." Nature **399**(6734): 323-329.

Nishimasu, H., S. Fushinobu, H. Shoun and T. Wakagi (2004). "The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic archaea." Structure **12**(6): 949-959.

Peng, Z. Y. and T. E. Mansour (1992). "Purification and properties of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **54**(2): 223-230.

Phillips, N. F. and Z. Li (1995). "Kinetic mechanism of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Giardia lamblia*." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 43-51.

Rashid, N., H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka (2002). "A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in archaea." J Biol Chem **277**(34): 30649-30655.

Reeves, R. E., P. Lobelle-Rich and W. B. Eubank (1982). "6-Phosphofructokinase (pyrophosphate) from *Entamoeba histolytica*." Methods Enzymol **90 Pt E**: 97-102.

Ronimus, R. S. and H. W. Morgan (2001). "The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles." Extremophiles **5**(6): 357-373.

Rost, B. (1999). "Twilight zone of protein sequence alignments." Protein Eng **12**(2): 85-94.

Say, R. F. and G. Fuchs (2010). "Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme." Nature **464**(7291): 1077-1081.

Schirmer, T. and P. R. Evans (1990). "Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase." Nature **343**(6254): 140-145.

Selig, M., K. B. Xavier, H. Santos and P. Schönheit (1997). "Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*." Arch Microbiol **167**(4): 217-232.

Selig, M., K. B. Xavier, H. Santos and P. Schönheit (1997). "Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*." Arch Microbiol **167**(4): 217-232.

ophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*." Archives of Microbiology **167** (4): 217-232.

Shirakihara, Y. and P. R. Evans (1988). "Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products." J Mol Biol **204**(4): 973-994.

Siebers, B. and R. Hensel (1993). "Glucose Catabolism of the Hyperthermophilic Archaeum *Thermoproteus-Tenax*." Fems Microbiology Letters **111**(1): 1-8.

Siebers, B. and R. Hensel (2001). "Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*." Methods Enzymol **331**: 54-62.

Siebers, B., H. P. Klenk and R. Hensel (1998). "PPi-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution." J Bacteriol **180**(8): 2137-2143.

Siebers, B., B. Tjaden, K. Michalke, C. Dorr, H. Ahmed, M. Zaparty, P. Gordon, C. W. Sensen, A. Zibat, H. P. Klenk, S. C. Schuster and R. Hensel (2004). "Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data." J Bacteriol **186**(7): 2179-2194.

Siebers, B., V. F. Wendisch and R. Hensel (1997). "Carbohydrate metabolism in *Thermoproteus tenax*: in vivo utilization of the non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway and characterization of its first enzyme, glucose dehydrogenase." Archives of Microbiology **168**(2): 120-127.

Siebers, B., M. Zaparty, G. Raddatz, B. Tjaden, S. V. Albers, S. D. Bell, F. Blombach, A. Kletzin, N. Kyrpides, C. Lanz, A. Plagens, M. Rampp, A. Rosinus, M. von Jan, K. S. Makarova, H. P. Klenk, S. C. Schuster and R. Hensel (2011). "The complete genome sequence of *Thermoproteus tenax*: a physiologically versatile member of the Crenarchaeota." PLoS One **6**(10): e24222.

Soding, J. (2005). "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." Bioinformatics **21**(7): 951-960.

Sols, A. (1981). "Multimodulation of enzyme activity." Curr Top Cell Regul **19**: 77-101.

Stec, B., H. Y. Yang, K. A. Johnson, L. J. Chen and M. F. Roberts (2000). "MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose1,6-bisphosphatase." Nature Structural Biology **7**(11): 1046-1050.

- Susskind, B. M., L. G. Warren and R. E. Reeves (1982). "A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba *Entamoeba histolytica*." Biochem J **204**(1): 191-196.
- Uyeda, K. (1979). "Phosphofructokinase." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **48**: 193-244.
- Vagin, A. and A. Teplyakov (1997). "MOLREP: an automated program for molecular replacement." Journal of Applied Crystallography **30**: 1022-1025.
- Verhees, C. H., J. Akerboom, E. Schiltz, W. M. de Vos and J. van der Oost (2002). "Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1,6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*." J Bacteriol **184**(12): 3401-3405.
- Xu, J., P. C. Green and R. G. Kemp (1994). "Identification of basic residues involved in substrate binding and catalysis by pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Propionibacterium freudenreichii*." J Biol Chem **269**(22): 15553-15557.
- Zaparty, M., B. Tjaden, R. Hensel and B. Siebers (2008). "The central carbohydrate metabolism of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: pathways and insights into their regulation." Arch Microbiol **190**(3): 231-245.
- Zillig, W., J. Tu and I. Holz (1981). "Thermoproteales--a third order of thermophilic archaeobacteria." Nature **293**(5827): 85-86.



# 総括

グルコースを分解してピルビン酸にする EM 経路の上流部分という戦略的な位置を占める PFK はフルクトース-6-リン酸(F6P)をフルクトース-1,6-ビスリン酸(FBP)にリン酸化する。そのリン酸供与体として ATP (ATP-PFK)の他にも、ADP (ADP-PFK) および PPI (PPI-PFK) が知られている。ATP-PFK と PPI-PFK は同じファミリー に分類され、また、アミノ酸配列に基づき、グループI、II、III に分けられる。今まで、グループI から7種、グループII から4種のPFK 立体構造が決定され、グループIII の PFK 立体構造に関する報告はない。本研究では、超好熱性古細菌 *Thermoproteus tenax* 由来の無機ピロリン酸依存性ホスホフルクトキナーゼ(TFPF)のX 線結晶構造解析を行い、その立体構造を明らかにすることに成功した(第 1 章)。これは、グループIII に属する PFK として初めてであった。

TFPF は4量体であり、各サブユニットは PFK の典型的な  $\alpha/\beta/\alpha$  フォールドを持つ2つのドメインから構成されていた。この構造はグループI の構造とよく似て、分子量が大きいグループII とも、活性中心を含むコアな部分が似ていた。グループI と最も異なるのは、グループII の特徴だと思われた C 末端ドメインからなる Hairpin loop であった。このループに含まれている Y232 はリン酸供与体が ATP である場合、ATP のアデニンと立体障害を起こされた。また、グリシンモチーフの4番目のアスパラギン酸の側鎖は ATP の  $\alpha$ -リン酸と立体障害を起こすので、TFPF は ATP を利用できないと考えられた。

リン酸供与体基質である PPI $\cdot$ Mg 複合体を初めて解明しただけでなく、リガンドフリーの状態、FBP 複合体、Pi $\cdot$ F6P 複合体の TFPF の構造を決定して、3つのリン酸(Distal Pi、Proximal Pi (1-Pi)、6-Pi)の位置を初めて特定することに成功した。TFPF の4つの立体構造は、リガンドフリー状態の構造とリガンド結合の複合体における全体構造の違いは特になく、B-factor により、PPI $\cdot$ Mg 複合体が最も安定な構造をしていることが分かった。そして、様々な TFPF の複合体の決定により、各反応段階のリガンドと直接的に結合する活性中心の残基も特定できた。PPI $\cdot$ Mg 構造により、マグネシウムを認識するアミノ酸は D101 であり、PPI と 5.4 Å 離れて水分子を介して結合した K123 は、Pi $\cdot$ F6P 構造では、3.0 Å の距離に位置し、Pi (Distal Pi) と直接的に相互作用することが分かった。また、Pi $\cdot$ F6P と FBP 複合体構造の比較は、1-Pi を認識する残基は T124 と R170 であり、特に R170 は1-Pi がいないと、約180° 活性中心から外側に回転することが分かった。

また、TFPF の酵素反応におけるすべての過程の構造を明らかにしたことで、この酵素反応のメカニズムを構造から推定できた。TFPF のリン酸供与体に直接的に関係のあるアミノ

酸が特定できたので、酵素反応のメカニズムにどのような影響があるのかを調べるために、これらの変異体作成を行ったが、成功しなかった。

PPi-PFK であり、TPFP とのアミノ酸配列同一性も高い、超好熱性バクテリアである *Thermotoga maritima* 由来の PPi-PFK (MPFP) は、TPFP と共通する分子構造を有すると考えた。そこで、MPFP のモデリング構造を構築し、TPFP の立体構造決定から、リン酸供与体基質と深い関係があると推測できた D102、K123、Y232 と対応する MPFP の D108、K131、H262 を確認した(第 2 章)。

D102 はグリシンモチーフに属するアミノ酸で、リン酸供与体のリン酸部位と直接に相互作用し、PPi-PFK の場合はアスパラギン酸、ATP-PFK の場合にはグリシンとして強く保存されているのはすべての PFK に当てあまる。K123 はグループ I のすべてでグリシンかアラニンで、グループ II と III はすべてリジンであり、他のすべての PFK にも強く保存されている。また、活性中心の近くに位置し、TPFP の構造解析からは酵素反応後の Distal Pi の安定的な結合に関わると推測できた。そして、Hairpin loop の Y232 は、グループ III の場合、PPi-PFK はチロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)のように芳香族を含む大きなアミノ酸である傾向であり、ATP-PFK は Y や F の場合もあったが、グリシン(G)、セリン(S)のような小さいアミノ酸であった。グループ II の場合、ATP-PFK はセリンで、PPi-PFK はヒスチジンであった。今まで、4種のグループ II の立体構造が決定されているが、このループ上のアミノ酸についてはまだ研究されていない。そこで、これら3つのアミノ酸をそれぞれD108G、K131A またはK131G、H262A または H262G に変異させた。

PFK は一般的にリン酸供与体に対する認識が厳格であり、ATP-PFK は ATP のみ、PPi-PFK は PPi のみしか利用できないが、D108G の変異体は PPi よりも ATP を良好な基質として利用できることが明らかになった。すなわち、PFK のリン酸供与体特異性を決める最も重要なアミノ酸は活性部位に存在するアスパラギン酸、または、グリシンであることが分かった。K131A と K131G は熱処理により失活してしまい、その理由に関しては更なる実験が必要である。そして、グループ II の場合、リガンド結合の有無によって、Hairpin loop 全体が動いているのに対して、TPFP のループはリガンド結合と関係なく、変化がなかった。そこで、ここに、もつとも小さいアミノ酸であるアラニンと、同じグループ内でグリシンを持つ ATP-PFK があったため、H262A と H262G の変異体を作成した。こ

の残基の変異は基質に対する活性の変化は特に示さなかったが、 $k_{cat}/K_m$  が MPFP に比べ、約 3倍上がったことが分かった。今後、グループII の ATP-PFK のようにセリンに置換した変異体を調べて、D108G/H262X の二重変異体の MPFP に比した活性や  $K_m$  および  $k_{cat}/K_m$  値を求める必要がある。

フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) は、フルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) からフルクトース-6-リン酸 (F6P) を生成する糖新生経路の酵素であり、解糖系の F6P から FBP を生成する PFK の逆反応を触媒する。好熱性古細菌および超好熱性細菌 FBPase はグループV に属し、本研究室ではグループVに属する好酸好熱性古細菌である *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の FBPase の立体構造を初めて解析し (FBPase 型)、基質 FBP が環状ではなく、直鎖状であることが分かった。その後、グループV に属する FBPase は FBP aldolase 反応 (FBPA 型) 後、FBP phosphatase 反応 (FBPase 型) をする、1つの酵素が2つの反応を触媒する (FBP aldolase/phosphatase (FBPA/P)) 報告があり、本研究室ではその X線構造解析を行った (付録)。FBPA/P は DHAP と結合による FBPA 型では、蓋ループとC-末端ループが活性部位から外側に向き、シッフ塩基ループが活性部位の方に入って DHAP と相互作用する。その後、同じ活性中心に FBP が結合し、FBPase 型になり、蓋ループ と C-末端ループは大きく変わることで FBP と直接的に相互作用した。そこで、FBPA 型の DHAP と相互作用する Y229 の変異体作成により活性を比較した結果、Y229F が FBPase 活性は維持するが、FBPA 活性を失うことで、このアミノ酸はすべての酵素反応の触媒に重要な役割をすることが分かった。

## 発表論文

本博士論文の第1章の内容は、

「Crystal structures of pyrophosphate-dependent PFK from *Thermoproteus tenax*」

(SONG, H.-J., Hidaka, M., Fushinobu, S., Wakagi, T.)

として投稿準備中である。

付録の内容は、

*Nature* 478, 538–541(2011)

「Structural basis for the bifunctionality of fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase」

Shinya Fushinobu, Hiroshi Nishimasu, Daiki Hattori<sup>1</sup>, Hyun-Jin Song & Takayoshi Wakagi

に発表されている。

## 謝辞

本論文を完成するまで、今までの多くの方々にご指導・ご協力を頂きながらここまで辿りつくことができました。

研究を進める上、幅広い視点からアドバイスをいただいた伏信進矢教授に深く感謝いたします。論文の書き方や私の研究に関する新しい視点からアドバイスをしていただいた荒川孝俊助教に深く感謝いたします。

また、私が修士課程から酵素学研究室に入って以降、**PPi-PFK** の研究テーマを与えて下さり、研究を一つずつ詳しく、細かいところまで指導して下さいました若木高善前教授に深く感謝いたします。名誉教授である祥雲弘文先生にも研究の場を与えていただき感謝いたします。先生方の研究に対する情熱で私も研究活動が楽しくできました。

そして、**X** 線結晶構造解析の基礎からアドバイスをいただいた日高将文博士に感謝いたします。実験だけでなく、研究室生活の面でも支えていただいた金尚完博士に感謝いたします。前任者の古城周久博士、遠山真理さんには研究のサンプルとデータをご提供いただきました。ありがとうございます。

当研究室の同期である伊藤佑さん、林倒炫博士には研究の相談しながら実験を進めることができました。二人が同期で本当にありがとうございました。そして、岩瀬徳康博士、山田千早博士、閔震さん、南煥祐さんをはじめとした酵素学研究室の皆様には、いつも優しく明るい、距離感のない研究室での生活ができて、深く感謝いたします。長い日本留学の期間は酵素学研究室での期間と言っても間違いのないぐらいで、最も気楽で安心な生活空間でありました。

最後に、今まで自分を支えてくださった家族に感謝して、この博士論文を閉めたいとおもいます。