

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏 名 宋 賢珍
指導教員名 伏信 進矢

論文題目 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

1. 背景と目的

解糖系は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多くの生物において重要な代謝経路である。真核生物の多くは典型的なエムデン-マイヤーホフ(EM) 経路を利用するが、原核生物では EM 経路およびエントナー-ドウドロフ(ED) 経路の 2 通りの経路があり、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。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。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。

PPi-PFK を有する生物には *Borrelia burgdorferi*、*Giardia lamblia*、*Entamoeba histolytica* など、ヒトに対して病原性を持つものも多数含まれている。ヒトは

PPi-PFK を持たないため、PPi-PFK が創薬の有望なターゲットとして注目されている。本研究では超好熱性微生物である *Thermoproteus tenax* および *Thermotoga maritima* 由来の PPi-PFK の立体構造とリン酸供与体の特異性について調べた。

2. *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の結晶構造解析

超好熱性古細菌 *T. tenax* は至適増殖温度が 86°C であり、small-subunit rRNA 解析から、古細菌の中でも最も初期に枝分かれしたことが明になっている。*T. tenax* は、生化学的研究が数多くなされており、古細菌特有の代謝およびその能力、耐熱適応形質を持つため、生物の進化の理解において重要な生物である。また、炭水化物代謝には F6P から FBP へリン酸化する PFK の反応で、ATP ではなく PPi をリン酸供与体として用いる「変形」EM 経路と、非リン酸化と半リン酸化に分岐した「分岐型」ED 経路の 2 つの経路を利用できる。

PFK はアミノ酸配列に基づきグループ I、II、III に分けられ、グループ I から 7 種、グループ II から 4 種の PFK が構造解析されている。*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報告されていない。そこで、TPFP の結晶構造解析を行うため大腸菌を用いて大量発現を進めた。

TPFP の組み換えタンパク質を熱処理とカラムクロマトグラフィーにより精製、結晶化し、大型放射光施設 KEK-PF と SPring-8 にて X 線回折測定した。TPFP と 36% のアミノ酸配列の同一性を有する構造既知の大腸菌由来の ATP-PFK (EcPFK) の立体構造をサーチモデルとして用いて分子置換法で位相を決定した。リガンドフリー、FBP 複合体、Pi・F6P 複合体、そして、PPi・Mg²⁺ 複合体の構造をそれぞれ分解能 2.35、1.8、1.9、1.6 Å で決定した。TPFP の単量体は N 末端ドメイン、C 末端ドメインからなり、結晶格子中の非対称単位は 4 量体を形成していた。様々な複合体構造を決めたことで、各リガンドを認識するアミノ酸残基が特定できた。特にリン酸供与体基質である PPi・Mg²⁺ 複合体の構造解析は PPi-PFK の中で初めてであり、2 つのリン酸 (Distal Pi と Proximal Pi) の位置が特定できた。TPFP の全体構造はグループ I の PFK と類似していたが、グループ II と III の特徴と思われるヘアピンループを持つ。このループは活性部位を覆うように位置していた。ATP が結合する場合には、ヘアピンループの先端に位置する Y232 の側鎖と、Distal Pi の近くに位置する D102 の側鎖が ATP の結合に対して両側から立体障害を起こすことが分かった。また、K123 は PPi

と水を介して水素結合するが、酵素反応した後の Distal Pi と直接水素結合することでこのリン酸の安定的な結合に寄与すると考えられた。

3. *Thermotoga maritima* 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リン酸供与体の認識機構

超好熱性細菌である *T. maritima* の全ゲノムは 1877 個の open reading frame (ORF) を持ち、そのうち 24% は古細菌の遺伝子と類似性が高い。*T. maritima* は EM 経路によりグルコースを分解するが、この経路で働く PFK は ATP-PFK (MPFK、グループ I)、PPi-PFK (MPFP、グループ II) の 2 種類である。

TPFP の変異体は発現精製が難しかったため、代わりに同様に好熱菌由来の PPi-PFK である MPFP は TPFP と共通する分子構造を持つと考え (29% のアミノ酸配列の同一性を持つ)、MPFP の立体構造のモデリングを行い、その構造から変異体を作成し、その性質を野生型 MPFP と比較した。

MPFP の構造モデリングのテンプレートとして同じグループ II の BbPFP (*B. burgdorferi* 由来 PPi-PFK ; PDB ID 2f48) を用いて、モデルを構築した。その結果、TPFP の Y232、D102、K123 の位置に MPFP では H262、D108、K131 が位置していることを確認した。MPFP の H262A、H262G、D108G、K131G、K131A の変異体を作成し、その性質を調べた。その結果、野生型 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 の二重変異体を作成して調べたが、これらも D108G と同様に ATP に対する活性が高くなっていた。

4. 総括

本研究では、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 線構造解析にグループ III の PFK としては初めて成功した。さらに、PPi·Mg²⁺ を含む各種の複合体構造を決めることで、3 つのリン酸の位置を特定し、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)。

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、*T. maritima* 由来 PPi-PFK (MPFP) の活性部位に存在するアスパラギン酸をグリシンに置換する単変異 (D108G) のみで、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(グリシンモチーフの 4 番目のアミノ酸)であることがわかった。

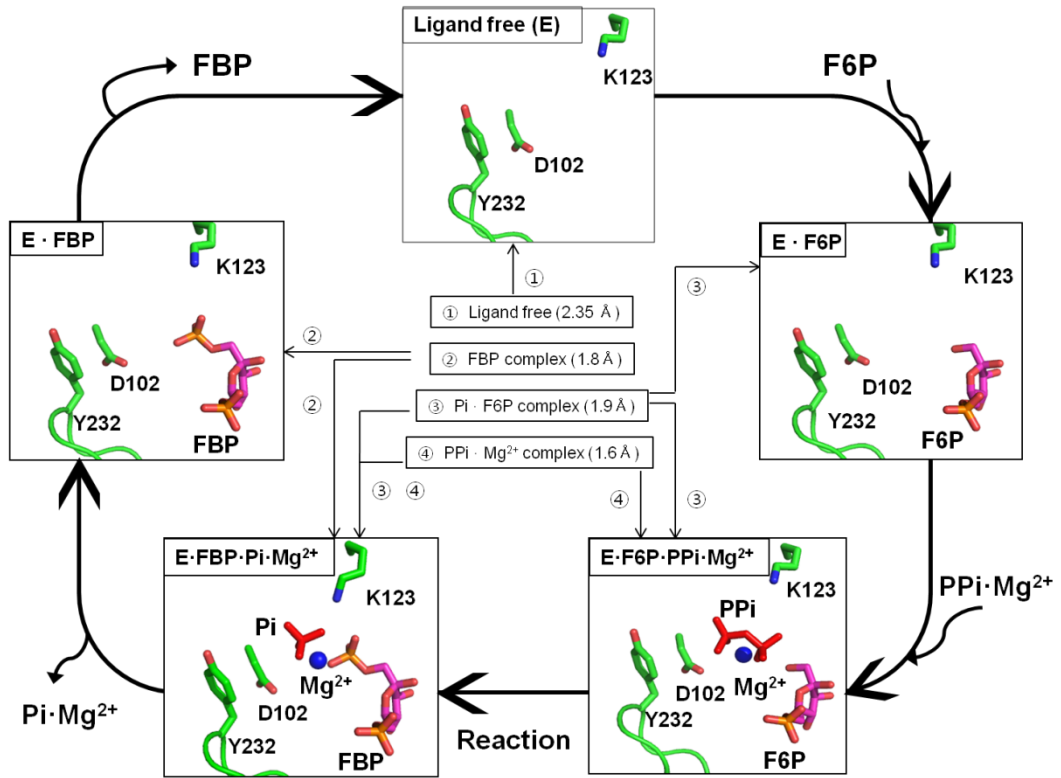


図 1 TPF の反応メカニズム