

学位論文題名

Structural study of mannosylglycerate synthesis pathway
of *Pyrococcus horikoshii* OT3

(超好熱古細菌 *P. horikoshii* マンノースグリセリン酸合成経路の
構造生物学的研究)

学位論文内容の要旨

単細胞生物には、生命活動を脅かすような細胞外の環境変化に対して、一つの細胞で対処する機構が備わっている。適合溶質は、細胞内に高濃度蓄積されても生命活動を阻害しないことからこのように呼ばれるが、細胞外の塩濃度上昇の際に、二次的な浸透圧調節物質として蓄積される。適合溶質を産生することは、自然界に絶えず繰り返される環境変化に適応するために必須であり、生物が生きてゆくために欠かせない機能である。

適合溶質として蓄積される物質の多くは、細胞内にありふれた糖、アミノ酸などの派生物で構成されている。近年発見された好熱菌に特有の適合溶質は、タンパク質の耐熱性を高める役割の一部を担っており、これらを生合成するための酵素が、同じ適合溶質を蓄積する生物の間で保存されている。超高度好熱性の古細菌 *Pyrococcus horikoshii* は、好熱菌の多くに共通して検出される適合溶質マンノースグリセリン酸(MG)を、周囲の塩濃度上昇に対して蓄積する。MGを生合成に特異的な酵素はゲノム上に連なった形でコードされているため、これらの酵素が同時に発現しMG合成が行われるというMG合成経路が提唱された。本研究は、MG合成経路の全容を原子レベルで記述することを目的とし、X線結晶構造解析によるMG合成系路上の二つの酵素マンノース3ホスホグリセリン酸(MPG)シンターゼおよびMPGホスファターゼの構造決定を行った。

二つの酵素は別々に遺伝子クローニングを行い、大腸菌に導入して大量発現させた。大腸菌より抽出した酵素は熱処理、硫酸沈殿、カラムクロマトグラフィーにより精製し、純度の高い酵素溶液を得た。各々について構造解析を行える質の結晶を作成し、X線回折データを収集した。初期位相決定のために、セレノメチオン置換体のSe原子の異常散乱を利用した。

MPGシンターゼはGDPマンノースのマンノース部分を3-ホスホグリセリン酸に転移する糖転移酵素である。MPGシンターゼの結晶構造は基質未結合状態、GDPマンノース結合状態および

GDP 結合状態において決定された。酵素の全体構造は、糖転移酵素に典型的な GT-A フォールドを中心とし、N 末端側と C 末端側の配列がその周囲を取り巻く、単一のドメインからなっていた。GDP および GDP マンノースは GT-A フォールド上に形成されたくぼみに結合しており、とくにグアニン塩基は疎水性のくぼみに差し込まれ、保存されるグルタミン残基 117 番がグアニンの特異的な認識を可能にしていた。それ以外の部分の認識はループ領域により行われており、柔軟な認識機構が示唆された。また、触媒反応中の糖転移酵素が一時的に糖と共有結合するための残基は、GDP マンノースとの複合体の結合位置から、糖転移酵素に広く保存されるアスパラギン酸 168 番であることが示唆された。

MPG ホスファターゼは MPG の脱リン酸を行う、haloacid dehalogenase superfamily (HADSf) に属する脱リン酸酵素であり、この反応により MG が産生される。MPG ホスファターゼの結晶構造は基質未結合状態およびリン酸結合状態において決定した。MPG ホスファターゼは HADSf に典型的なコアドメインと、コアドメインの途中に挿入されたキャップドメインにより構成されていた。基質未結合状態の構造では、非対称単位中にある二つの分子について、開構造と閉構造の 2 つのコンホメーションを取っており、ドメインの可動性が示唆された。また、キャップドメインにはコンホメーション変化に伴って構造変化するループ領域が見出された。リン酸結合状態の結晶構造では、リン酸分子が活性部位に結合しており、*Methanocaldococcus jannaschii* 由来ホスホセリンホスファターゼとの活性部位の比較から、反応中に求核反応を行う残基は広く保存されるアスパラギン酸 8 番であることが示唆された。2 つのドメインの間には空間があり、閉構造の際には活性部位を含む分子ない空洞が形成されていた。空洞には MPG を結合するのに十分な体積があり、脱リン酸反応の進行が、閉構造になって基質を固定した状態で進行することが示唆された。

以上の事から、MG 合成経路における合成戦略が明らかになった。2 つの酵素において、マンノース部分の認識の厳密さは見出されなかった。MG が特異的に蓄積されるためには、出発物質である GDP マンノースの正確な合成が必要である。*P. horikoshii* では 2 つの酵素のほかに、GDP マンノースを産生するための酵素の遺伝子もコードされており、これらが同時に発現することで、GDP マンノースが供給されると考えられる。MG の特異的な蓄積は、酵素の基質認識の特異性だけでなく、オペロンによる発現の時間的制御も必要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 出 村 誠

副 査 准教授 姚 関

副 査 教 授 渡 邊 信 久 (名古屋大学大学院工学

研究科)

学 位 論 文 題 名

Structural study of mannosylglycerate synthesis pathway of *Pyrococcus horikoshii* OT3

(超好熱古細菌 *P. horikoshii* マンノースグリセリン酸合成経路の
構造生物学的研究)

単細胞生物には、生命活動を脅かすような細胞外の環境変化に対して、一つの細胞で対処する機構が備わっている。適合溶質は、細胞内に高濃度蓄積されても生命活動を阻害しないことからこのように呼ばれるが、細胞外の塩濃度上昇の際に、二次的な浸透圧調節物質として蓄積される。適合溶質を産生することは、自然界に絶えず繰り返される環境変化に適応するために必須であり、生物が生きていくために欠かせない機能である。

適合溶質として蓄積される物質の多くは、細胞内にありふれた糖、アミノ酸などの派生物で構成されている。近年発見された好熱菌に特有の適合溶質は、タンパク質の耐熱性を高める役割の一部を担っており、これらを生合成するための酵素が、同じ適合溶質を蓄積する生物の間で保存されている。超高度好熱性の古細菌 *Pyrococcus horikoshii* は、好熱菌の多くに共通して検出される適合溶質マンノースグリセリン酸(MG)を、周囲の塩濃度上昇に対して蓄積する。MGの生合成に特異的な酵素はゲノム上に連なった形でコードされているため、これらの酵素が同時に発現しMG合成が行われるというMG合成経路が提唱された。本研究は、MG合成経路の全容を原子レベルで記述することを目的とし、X線結晶構造解析によるMG合成系路上の二つの酵素マンノース3ホスホグリセリン酸(MPG)シンターゼおよびMPGホスファターゼの構造決定を行った。

二つの酵素は別々に遺伝子クローニングを行い、大腸菌に導入して大量発現させた。大腸菌より抽出した酵素は熱処理、硫安沈殿、カラムクロマトグラフィーにより精製し、純度の高い酵素溶液を得た。各々について構造解析を行える質の結晶を作成し、X線回折データを収集した。初期位相決定のために、セレンメチオニン置換体のSe原子の異常散乱を利用した。

MPG シンターゼは GDP マンノースのマンノース部分を 3-ホスホグリセリン酸に転移する糖転移酵素である。MPG シンターゼの結晶構造は基質未結合状態、GDP マンノース結合状態および GDP 結合状態において決定された。酵素の全体構造は、糖転移酵素に典型的な GT-A フォールドを中心とし、N 末端側と C 末端側の配列がその周囲を取り巻く、単一のドメインからなっていた。GDP および GDP マンノースは GT-A フォールド上に形成されたくぼみに結合しており、とくにグアニン塩基は疎水性のくぼみに差し込まれ、保存されるグルタミン残基 117 番がグアニンの特異的な認識を可能にしていた。それ以外の部分の認識はループ領域により行われており、柔軟な認識機構が示唆された。また、触媒反応中の糖転移酵素が一時的に糖と共有結合するための残基は、GDP マンノースとの複合体の結合位置から、糖転移酵素に広く保存されるアスパラギン酸 168 番であることが示唆された。

MPG ホスファターゼは MPG の脱リン酸を行う、haloacid dehalogenase superfamily (HADSf) に属する脱リン酸酵素であり、この反応により MG が産生される。MPG ホスファターゼの結晶構造は基質未結合状態およびリン酸結合状態において決定した。MPG ホスファターゼは HADSf に典型的なコアドメインと、コアドメインの途中に挿入されたキャップドメインにより構成されていた。基質未結合状態の構造では、非対称単位中にある二つの分子について、開構造と閉構造の 2 つのコンホメーションを取っており、ドメインの可動性が示唆された。また、キャップドメインにはコンホメーション変化に伴って構造変化するループ領域が見出された。リン酸結合状態の結晶構造では、リン酸分子が活性部位に結合しており、*Methanocaldococcus jannaschii* 由来ホスホセリンホスファターゼとの活性部位の比較から、反応中に求核反応を行う残基は広く保存されるアスパラギン酸 8 番であることが示唆された。2 つのドメインの間には空間があり、閉構造の際には活性部位を含む分子内空洞が形成されていた。空洞には MPG を結合するのに十分な体積があり、脱リン酸反応の進行が、閉構造になって基質を固定した状態で進行することが示唆された。

以上の事から、MG 合成経路における合成戦略が明らかになった。2 つの酵素において、マンノース部分の認識の厳密さは見出されなかった。MG が特異的に蓄積されるためには、出発物質である GDP マンノースの正確な合成が必要である。*P. horikoshii* では 2 つの酵素のほかに、GDP マンノースを産生するための酵素の遺伝子もコードされており、これらが同時に発現することで、GDP マンノースが供給されると考えられる。MG の特異的な蓄積は、酵素の基質認識の特異性だけでなく、オペロンによる発現の時間的制御も必要であることが示唆された。以上、本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。