

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宋 賢珍

解糖系はグルコースをピルビン酸へと分解する、多くの生物においてエネルギーを生産する重要な代謝経路であり、主にエムデン-マイヤーホフ (EM) 経路とエントナー-ドウドロフ (ED) 経路の2種類が知られている。ホスホフルクトキナーゼ (PFK) は一般的な EM 経路ではその上流側で機能して経路全体を制御する重要なアロステリック酵素であり、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) 以外に、無機ピロリン酸 (PPi) を用いるもの (PPi-PFK) も知られている。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。グループ III 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。本論文は、超好熱性微生物由来の PPi-PFK のリン酸供与体の認識機構を立体構造解析と機能解析により解明する研究であり、2章より構成される。

序論に続き、第1章では超好熱性古細菌である *Thermoproteus tenax* 由来 PPi-PFK (TPFP) の X 線結晶構造解析について述べている。TPFP の立体構造はグループ III の PFK では初めて決定された。TPFP の四次構造はホモ四量体であり、その三次構造も含めて、グループ I の ATP-PFK である大腸菌由来の酵素 (EcPFK) と最も似ていた。単量体の構造は PFK としての典型的な $\alpha/\beta/\alpha$ フォールドを持ち、N 末端ドメインと C 末端ドメインからなっていた。C 末端ドメインにはグループ II の PFK の特徴として知られている Hairpin loop が存在することが明らかとなった。また、PPi-PFK としては初めて、リン酸供与体基質である PPi と必須金属イオンであるマグネシウムが結合した PPi·Mg 複合体構造を分解能 1.6 Å で決定し、さらに、リガンドフリー状態、FBP 複合体、Pi·F6P 複合体の構造をそれぞれ分解能 2.35 Å、1.8 Å、1.9 Å で決定した。これら4種の構造により、初めて3つのリン酸の結合位置を推定することが可能になり、これらを Distal Pi、Proximal Pi (または 1-Pi)、6-Pi と呼ぶことにした。さらに、これらの構造を重ね合わせて組み合わせることで、反応前の PPi·Mg·F6P の結合状態と、反応後の Pi·Mg·FBP の結合状態を推定することができた。3つの複合体の活性中心の周りの残基の比較から、F6P または FBP の 6-Pi は隣のサブユニットの Arg161 と Arg257 により認識され、安定に結合していることがわかった。この2つの Arg の位置はアロステリック PFK では活性化状態の指標として最も重要な残基であり、非アロステリック酵素である TPFP は常に活性化状態であることが分かった。また、Thr124 と Arg170 が Proximal Pi を認識する一方で、Lys123 は反応前のリン酸供与体である PPi とは水分子を介して結合し、反応産物の Pi とは直接に結合することから、Lys123 は主に Distal Pi の安定的な結合に寄与すると分かった。

TPFP の構造決定により、他のグループの PFK との構造的な比較が可能になった。グループ I の EcPFK は全体構造では最も似ていたが、活性中心を重ね合わせると、TPFP のグリシンモチーフの 4 番目の残基である Asp102 と Hairpin loop の先に位置する Tyr232 は、EcPFK に結合した ADP と立体障害を起こすことが分かった。すなわち、TPFP が構造的にリン酸供与体として ATP を利用できない理由が明らかになった。グループ II に属する *Borrelia burgdorferi* 由来の PPI-PFK との重ね合わせでは、TPFP の Asp102 と Tyr232 に当たる残基はそれぞれ Asp177 と His262 であり、TPFP と同様に ADP と立体障害を起こすことが分かった。また、これらの残基は PPI-PFK の活性部位における構造的な特徴であることが分かった。以上、TPFP の立体構造決定の結果、PPI-PFK の反応機構におけるすべてのステップの構造を推定することが可能になり、PPI-PFK の反応機構の構造基盤を明らかにすることに成功した。

第 2 章では、超好熱性バクテリアである *Thermotoga maritima* 由来の PPI-PFK (MPFP) を用いて、変異体解析によるリン酸供与体の認識機構の解明について述べている。ホモロジーモデリングにより MPFP の予測構造を構築し、PPI-PFK の活性部位における構造的な特徴であるグリシンモチーフの 4 番目と Hairpin loop の先の残基、すなわち TPFP では Asp102 と Tyr232 に当たる残基が、MPFP ではそれぞれ Asp108 と His262 であることを確認した。PFK のリン酸供与体に対する特異性は厳格であり、PPI-PFK は PPI のみ、ATP-PFK は ATP のみを用いることが知られているが、これらの残基を変えることによりリン酸供与体の特異性変換が起こることを期待した。D108G、H262A と D108G/H262A の変異体を作成し、それらの動力学的定数を求め、野生型 MPFP と比較した。その結果、H262A は PPI-PFK 活性に対する k_{cat}/K_m の値が約 3 倍上がったが、基質特異性には変化がなかった。D108G は PPI に対する k_{cat} が 1/3 以下に下がったが、ATP に大して高い活性が現れ、その k_{cat}/K_m の値は野生型 MPFP の PPI に対する値と同等であることが分かった。D108G/H262A は活性が全体的に大きく低下し、ATP に対する活性は D108G に比べてはるかに低かった。従って、Hairpin loop の先端に位置して ATP の結合を阻害すると予想された His262 の変異体では、予想に反して ATP に対する活性は上昇しなかった。グループ II に属する PFK はリガンド結合により Hairpin loop を含むドメインの構造が大きく変化することが報告されている。MPFP においても同様の構造変化が起こるとすれば、His262 は ATP に対して常に立体障害を起こすわけではなく、むしろ、Hairpin loop を含む構造の動きにともなってリン酸供与体の結合を安定化している可能性も考えられた。ただし、TPFP の場合はリガンドフリーの構造でもドメイン間が閉じた状態のままであり、グループ III の酵素はグループ II の酵素とはこの点で異なる可能性がある。

以上、本論文は超好熱性微生物 *T. tenax* と *T. maritima* 由来の PPI-PFK である TPFP と MPFP の立体構造、反応機構、そして、リン酸供与体の認識機構を解明したものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。