

|         |  |
|---------|--|
| 称号及び氏名  | 博士（農学）北谷 友也                                  |
| 学位授与の日付 | 平成 18 年 3 月 3 1 日                            |
| 論 文 名   | 「結晶構造に基づいたラン藻の光合成炭素還元系酵素類における触媒機構の解析」        |
| 論文審査委員  | 主査 切畑 光統<br>副査 和田野 晃<br>副査 藤井 郁雄<br>副査 多田 俊治 |

## 論文要旨

### 第一章 序論

原核生物であるラン藻は、細胞内によく発達したチラコイド膜をもち、高等植物の葉緑体と同様に酸素発生型の光合成を行うことから、光化学系や光合成炭素還元系の仕組みに関する研究のモデル生物として用いられる。しかし、ラン藻の一種である *Synechococcus* PCC 7942 (*S.* 7942) の光合成炭素還元系は、フェレドキシン/チオレドキシン系を介した光還元力による活性調節を受けないなどの高等植物の光合成炭素還元系とは異なる特徴を示す。これは *S.* 7942 の光合成炭素還元系を構成する各酵素が高等植物のものとは異なる性質を持つことによるが、その生化学的特性について未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、*S.* 7942 の光合成炭素還元系を構成する酵素のうち、フルクトース-1,6-/セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) および NADP 依存型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (NADP-GAPDH) について X 線結晶構造解析を行い、それらの触媒機能の解明を試みた。

### 第二章 *S.* 7942 由来 FBP/SBPase の構造解析

高等植物葉緑体の光合成炭素還元系ではフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) およびセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase) が機能しているのに対して、*S.* 7942 では、FBPase と SBPase の活性を併せもつ二機能性酵素 FBP/SBPase が機能している。FBP/SBPase は動植物の解糖・糖新生系および光合成炭素還元系で機能している FBPase や SBPase とは一次構造の相同性が低い新規酵素である。

*S.* 7942 由来 FBP/SBPase の結晶構造の位相は Se 原子を用いた異常分散法により決定した。FBP/SBPase の遺伝子を組み込んだ大腸菌 B834 株を Se-Met 含有培地にて育成後、常

法に従い精製することで、Met 残基を Se-Met に置換したFBP/SBPase を作成した。Se-Met 置換体結晶は、FBP/SBPaseの非拮抗阻害剤である AMP 存在下で硫酸アンモニウムを沈殿剤として用いた系で得られた。回折X線測定は KEK-PF(BL5A)において行ったが、測定に伴いX線による結晶の劣化が見られた。そこで、分解能 2.1 Å までの反射が観測できた測定波長 0.9792 Å の反射データを用いて単波長異常分散法(SAD 法)により位相の決定を行った( $P2_1$ ;  $a = 80.8$ ,  $b = 84.0$ ,  $c = 99.8$  Å,  $\beta = 101.3^\circ$ ;  $R_{\text{merge}} = 8.2\%$ 、完全性 = 99.0%)。直接法 SnB により 55 個の Se 原子の座標を決定し、得られた電子密度を元に構造の構築および精密化を行い、本酵素の立体構造を明らかにすることができた( $R_{\text{crystal}} = 22.9\%$ ,  $R_{\text{free}} = 29.6\%$ )。

これまでにSBPaseの構造報告はなく、SBPase活性をもつ酵素として初めて立体構造を決定した。本 FBP/SBPase の結晶の非対称単位はホモ四量体で構成されていた。この四量体構造は、多数の構造報告がある解糖・糖新生系由来の FBPase の四量体構造とは大きく異なるものであった。また、このことに対応するように、本酵素では、非拮抗型阻害作用を示す AMP は2つのサブユニット間に挟まれた位置に結合するという新規な結合様式を有しており、異なったアロステリック機構を持つことが示唆された。サブユニットは、 $\alpha$ -ヘリックスと $\beta$ -シートが交互に積み重なった  $\alpha \beta \alpha \beta$  構造をもっており、その配列様式は従来の FBPase と同一であったが、N 末側の  $\beta$ -シートに C 末側の残基が新たに組み込まれており、タンパク質のフォールディングの観点からも興味深い相違点が見出された。

### 第三章 S. 7942 由来 NADP-GAPDH のホロ体の構造解析

NADP-GAPDH は、NAD(H) および NADP(H) のいずれも補酵素とするが、特に NADP(H) を優位に認識する。高等植物ではヘテロ四両体の NADP-GAPDH が主に機能しているのに対して、S. 7942 ではホモ四両体の酵素のみが機能している。NADP-GAPDH については、これまでにホウレンソウ葉緑体由来酵素のホロ体の構造解析がなされ、補酵素の結合様式が明らかにされてきた。しかし補酵素の選択性が生じる要因については未だ明確にはなっていない。そこで、S. 7942 由来 NADP-GAPDH の NADP(H) および NAD(H) とのホロ体の構造解析を行い、両補酵素の結合様式を明らかにした。

S. 7942 由来NADP-GAPDH の大量発現は大腸菌BL21 株を用いて行った。酵素は常法に従って精製し、結晶化は硫酸アンモニウムを沈殿剤として 20°Cで行った。得られたアポ体の結晶を 40 mM NADP もしくは NAD を含む溶液に浸漬させることにより、各々のホロ体の結晶を調製した。回折X線測定は KEK-PF で行い、NADP-ホロ体は 2.5 Å、NAD-ホロ体は 2.45 Å までの立体構造を明らかにした(NADP-ホロ体: $R_{\text{crystal}} = 19.1\%$ ,  $R_{\text{free}} = 25.5\%$ 、NAD-ホロ体: $R_{\text{crystal}} = 19.7\%$ ,  $R_{\text{free}} = 25.7\%$ )。

本酵素は同一のサブユニットからなる四量体構造をとり、サブユニットは Rossmann fold を持っていた。さらに、両ホロ体とも Ps サイト(基質の 3 位リン酸残基が入り込む部位と推定されている)に結晶化に用いた硫酸イオンを含んでいた。これらの構造的特徴はこれまでに報告されていた GAPDH と大差の無いものであった。両補酵素は、いずれも水素の授受に関与するニコ

チンアミド部分を、GAPDH の触媒残基である Cys155 の方向に向けて酵素の補酵素結合部位に入り込み、Arg12、Ile13、Asn318 と水素結合を形成していた。両者の結合様式に大きな差は見られなかったが、NADP(H) では、そのアデニルモノヌクレオチド部分の 2' 位リン酸残基が隣接するサブユニットの S-loop 上の Ser194 と水素結合を形成しており、この水素結合が NADP(H) を優先的に選択する要因の一つと考えられた。

#### 第四章 S. 7942 由来 NADP-GAPDH のアポ体の構造解析

GAPDH のアポ体の構造については未だ報告されていない。そこで、ホロ体との構造比較により補酵素認識機構を明らかにすることを目的として、S. 7942 由来 NADP-GAPDH のアポ体の立体構造を決定した。

先の章で得られていたアポ体結晶は、分解能が低く構造解析には不適切なものであった。そこで、高い分解能を示す良質な結晶を得るために、(財)日本宇宙フォーラムと共同して、宇宙空間における微小重力下での結晶化を行った。その結果、有意に結晶性が向上し、大型放射光施設 SPring-8 で分解能 2.9 Å までのデータを収集することができ、NADP-GAPDH のアポ体の立体構造の解析に成功した ( $R_{\text{crystal}} = 21.2\%$ ,  $R_{\text{free}} = 29.5\%$ )。

得られたアポ体の構造には次のような特徴が見出された。(1) ホロ体では S-loop を構成する Thr185 から Arg200 までの 16 残基が一つのコンホメーションに固定されていたのに対して、アポ体ではその部分の電子密度が見出されず、一定の構造をとらない柔軟な状態にあるものと考えられた。(2) ホロ体では S-loop の根元にある Ps サイトに硫酸イオンが入り込んでいたが、結晶化条件に高濃度に含まれるにも関わらずアポ体では存在していなかった。また、ホロ体ではその硫酸イオンと Thr185 および Arg200 が水素結合を形成していたが、アポ体では両アミノ酸残基の電子密度が見出されなかったことから、Ps サイトの周囲も柔軟な構造を持つものと考えられた。

アポ体とホロ体の構造の比較から、S-loop の構造の固定化には補酵素が必須であると言える。しかし、S-loop と補酵素の間に水素結合のような特徴的な結合は、NADP(H) でのアデニルモノヌクレオチド部分の 2' 位リン酸残基と S-loop 上の Ser194 との水素結合以外には見出されず、固定化の駆動力として特定できる酵素部位は見出されなかった。一方、Ps サイトに入る基質の 3 位リン酸残基は S-loop に関わる 2 種のアミノ酸残基、Thr185 および Arg200 とさらに補酵素とも水素結合を形成するものと考えられることから、S-loop の固定化は補酵素と同時に基質が存在することにより引き起こされるものと結論した。S-loop の固定化により NADP(H) と S-loop 上の Ser194 との水素結合が容易になる。したがって、補酵素の選択性に基質の結合も重要な役割を担っていると考えた。

#### 第五章 総括

本研究では、S. 7942 の光合成炭素還元系由来 FBP/SBPase および NADP-GAPDH のホロ体およびアポ体の立体構造を決定した。FBP/SBPase については光合成由来の SBPase 活

性を持つ酵素としては初めての報告であり、さらに従来の **FBPase** では見られない新しい **AMP** の結合様式を明らかにした。**NADP-GAPDH** についてはホロ体およびアポ体の構造より今まで報告されて無かった新たな構造変化を確認することが出来、得られた知見をもとに補酵素の認識について考察した。このような研究により、ラン藻だけでなく高等植物の光合成炭素還元系への更なる理解が進むものと考えられる。

## 審査結果の要旨

原核生物であるラン藻は細胞内によく発達したチラコイド膜をもち、高等植物の葉緑体と同様に酸素発生型の光合成を行うことから、光化学系や光合成炭素還元系の仕組みに関する研究のモデル生物として用いられて来た。しかし、ある種のラン藻の光合成炭素還元系においては固有の酵素が見出されるなど、高等植物との相違点が次第に明らかになりつつある。

本論文では、ラン藻の一種である *Synechococcus* PCC 7942 (*S.* 7942) の光合成炭素還元系の分子レベルでの理解に向けて、系の流量調節の鍵となっている二機能性のフルクトース-1,6-/セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) および **NADP** 依存型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (**NADP-GAPDH**) の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、それら酵素機能の構造化学的解明を目指した。

第一章では、高等植物とラン藻 *S.* 7942 の光合成炭素還元系の相違点について述べた。その中で、研究対象として取り上げた FBP/SBPase および **NADP-GAPDH** の酵素機能を構造化学的に解明する意義について言及した。

第二章では、FBP/SBPase と非拮抗型阻害剤である **AMP** との複合体の X 線結晶構造解析を行い、酵素機能について考察した。**Met** を **Se-Met** に置換した FBP/SBPase を作成し、**AMP** 存在下で硫酸アンモニウムを沈殿剤として複合体の結晶を得た。回折 X 線測定は大型放射光施設において行い、位相は **Se** 原子を用いた単波長異常分散法により決定した。その結果、本酵素はホモ四量体を構成しており、各サブユニットは従来報告されている **FBPase** と同様に  $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$ -シートが交互に積み重なった Layer sandwich 構造を持つことが明らかとなった。しかし、極めて興味深いことに、本酵素の四量体構造と **AMP** の結合位置が、これまでに多くの生物種由来の **FBPase** で見出されたものとは大きく異なるものであり、新たな活性調節機構が示唆された。また、サブユニットは二つのドメインから形成されているが、そのドメイン間に、基質結合が可能な大きさで複数の酸性アミノ酸に取り囲まれている窪みを見出し、その部分が基質結合部位であると特定した。

第三章では、**NADP-GAPDH** の **NADP(H)** および **NAD(H)** とのホロ体の構造解析を行い、両

補酵素の結合様式を明らかにした。複合体の結晶は、硫酸アンモニウムを沈殿剤として得られたアポ体の結晶に NADP もしくは NAD を浸漬させることにより調製した。本酵素は同一のサブユニットからなる四量体構造をとり、サブユニットは Rossmann fold を持っていた。両補酵素は、いずれも水素の授受に関与するニコチンアミド部分を触媒残基である Cys155 の方向に向けて補酵素結合部位に入り込んでいた。両補酵素の酵素との結合様式には大きな差は見られなかったが、唯一、NADP(H) のアデニルモノヌクレオチド部分の 2' 位リン酸残基が S-loop 上の Ser194 と水素結合を形成しており、この水素結合が NADP(H) を優先的に選択する要因の一つと考えられた。

第四章では、NADP-GAPDH のアポ体の構造を明らかにし、ホロ体との構造比較から本酵素が NADP を優位に認識する機構を提唱した。良質なアポ体の結晶は、宇宙空間における微小重力下で得ることに成功した。構造解析の結果、アポ体では S-loop が一定の構造をとらない柔軟な状態にあること、また Ps サイトに硫酸イオンが存在しないという大きな相違点を見出した。これらの構造の特徴から、S-loop の固定化は補酵素と基質が同時に存在することにより引き起こされ、S-loop の固定化によって始めて NADP の優先的な認識が可能になるという、補酵素の選択性に基質が重要な役割を担う新たな機構を提唱した。

第五章では、本研究で得られた知見を集約するとともに、酵素の機能解明に X線結晶構造解析がいかに有用であるか述べた。

本研究では、*S. 7942* の光合成炭素還元系由来 FBP/SBPase および NADP-GAPDH のホロ体およびアポ体の立体構造を決定し、それら酵素の特性に関わる構造的特徴について考察した。FBP/SBPase については SBPase 活性を持つ酵素としては初めての報告であり、SBPase の機能解明に途を開いた。また、NADP-GAPDH についてもアポ体の構造解析に成功し、新たな知見を得るなど、光合成炭素還元系の分子レベルでの解明に向け大きな貢献をした。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。