

氏名 池 水 信 二

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第73号

学位授与の日付 平成6年3月24日

学位授与の要件 数物科学研究科 放射光科学専攻
学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 X-線結晶構造解析による ω -アミノ酸：ピルビン酸ア
ミノ基転移酵素の反応機構の研究

論文審査委員 主査 教授 松 下 正
教授 坂 部 知 平
教授 大 隅 一 政
助教授 小 林 克 己
助教授 雨 宮 慶 幸
教授 月 原 富 武（徳島大学）
教授 下 村 理

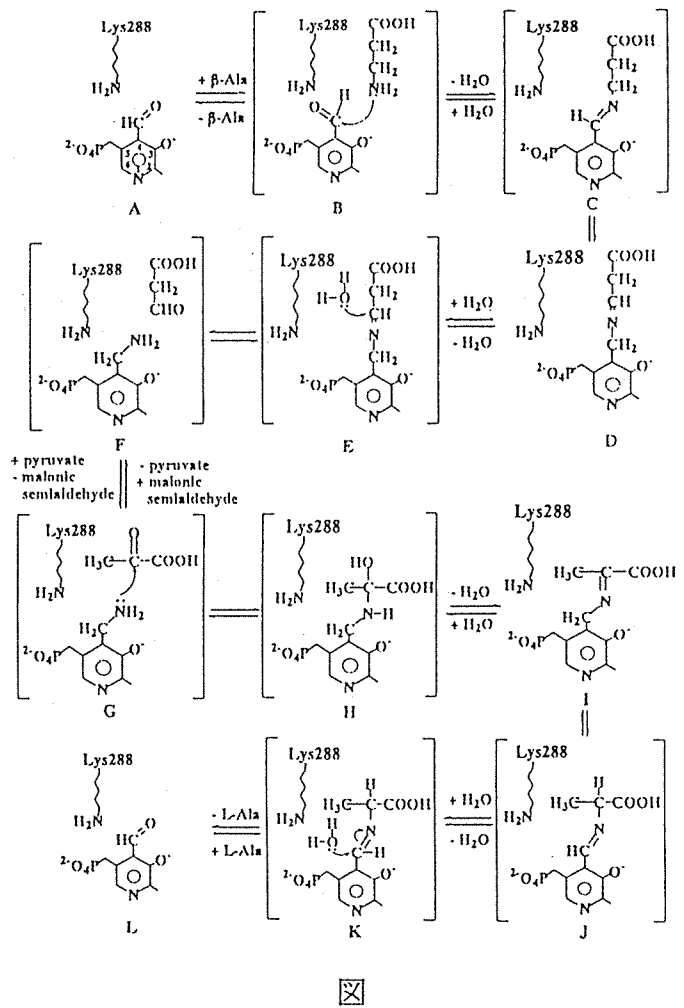
（高エネルギー物理学研究所）

アミノ基転移酵素はピリドキサル^{5'}-リン酸(PLP)を補酵素として持つPLP依存酵素で基質のアミノ基をケト酸に転移する反応を触媒する。アミノ基転移酵素は共通の性質として活性部位にあるリジン残基がPLPとの間でシッフ塩基を形成しており、また反応は共通の中間体即ちPLP-基質アミノ酸のシッフ塩基の形成を経て進行すると考えられてきた。天然には多くのアミノ基転移酵素が存在し、既に40種以上の酵素のアミノ酸配列が決定されており、酵素化学的な方法で反応の研究もなされている。しかしながら、3次元構造が得られているものは、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)、ホスホセリンアミノ基転移酵素、最近構造決定されたD-アミノ酸アミノ基転移酵素及び ω -アミノ酸:ピルビン酸アミノ基転移酵素(ω -APT)の4種である。そのうち結晶学的方法で反応機構の研究がなされているものはAspATのみである。

Pseudomonas sp. F-128の生産する ω -APTはPLP依存酵素で、 β -alanineからピルビン酸へのアミノ基の転移を触媒し、アミノドナーに対しては特異性が低く、アミノアクセプターに対しては極めて高い特異性を示す。この分子は449個のアミノ酸残基からなる結晶学的に同一なサブユニット4個からなり、アミノ酸配列は与那覇らにより決定された。結晶構造解析は渡辺らによりまず異常分散を考慮した多重同型置換法により分解能が2.0Åのデータを用いて行われ、得られた構造は更に分解能が1.6ÅのデータでプログラムPROLSQにより精密化された。本論文では ω -APTと種々のアミノドナー(β -Alanine, γ -Amino-n-butyrate, 6-Aminohexonate, L-Alanine, Isoamylamine)及びアミノアクセプターであるピルビン酸との複合体結晶の構造解析を行い、それらの構造に基づいて提唱された反応機構について報告する。

複合体結晶は透析法による共結晶法によってpH7.0の38%硫酸アンモニウム水溶液から調整された。強度データの収集は高エネルギー物理学研究所・放射光実験施設・BL6A2に設置された巨大分子用ワイセンベルグカメラにより200mm×400mmのイメージングプレートを記録媒体として行われた。L-Alanine複合体結晶の場合はまず3軸のまわりで1.5Å分解能まで、次いで露光時間を約3倍にして1.4Åまでのデータ収集を行った。Isoamylamine複合体結晶については1.5Å分解能、その他については1.8Å分解能までのデータ収集を行った。複合体結晶はいずれもNative結晶(空間群I222、a=124.7, b=137.9, c=61.5Å)と同型であった。強度データの処理にはプログラムWEISを用いた。精密化の初期構造としてはNative結晶の構造パラメータを使用し、プログラムはPROLSQとXPLORを利用した。基質複合体モデルの構築をプログラムFRODOを使用して3次元グラフィックスにより行った。精密化の結果、L-Alanine複合体結晶では分解能10.0~1.6ÅでR値が0.159、 β -Alanine, γ -Amino-n-butyrate, 6-Aminohexonate, Isoamylamine及びピルビン酸複合体結晶ではR値それぞれ0.220, 0.165, 0.196, 0.152, 0.208の構造を得ることが出来た。図に ω -APT及び種々の複合体の結晶構造に基づく反応機構を示す。図中Aの構造については既に渡辺らの解析で得られいたが、AspATのNativeの構造と異なり活性部位にあるLys288とPLPの間にはシッフ塩基の形成はみられない。このことはPLP酵素に対して50年間共通の性質と考えられてきた定説を覆すことになる。そこで、結晶化条件

を変えたり、精密化の方法を変えたりして検討を続けたが結果は同じであった。最近杉尾らにより構造解析されたD-アミノ酸アミノ基転移酵素は、ポリエチレングリコールを沈殿剤に用いて結晶化されているにも拘わらず活性部位にシッフ塩基が形成されていない結果が得られた。さらにこの経路中、D中間体は β -Alanine複合体の構造に相当し、I中間体の構造はL-Alanine複合体の構造に相当する。またPLPとPMPにより周りの環境に大きな変化がないので、Fの構造はピルビン酸とPLPの複合体結晶の構造と同様な配置をとると考えられる。これらの中間体の構造を基に図の反応機構は矛盾なく説明できる。なお酵素反応機構はAspATとは異なっている。



(論文審査結果)

これまでの蛋白質結晶構造解析は主として3次元構造と機能との関係を研究する目的で行われてきた。しかしながら、放射光X線は非常に強力な単色及び白色X線源として利用できることから、酵素の反応機構を研究するのに適している。反応機構を研究するためには反応中間体を捕らえその構造を解析することが必要である。反応にはいろいろなレベルがあり、時間レベルより寿命の長い反応は現在PFにある巨大分子用ワイセンベルグカメラによるデータ収集システムを利用して行うことが可能でありそれより速い反応を追跡するにはラウエ法を利用しなければならない。

博士論文の提出者である池水信二君は蛋白質X線結晶構造解析の研究をすでに鳥取大学工学研究科修士課程において始め、スギナのフェロドキシン(Fd)Iの結晶構造解析を1.8Å分解能で決定した。この結果は現在Acta Cryst. Dに受理されている。

「X線結晶構造解析による ω -アミノ酸：ピルビン酸アミノ基転移酵素の反応機構の研究」は論文提出者の修士課程で身につけた経験を基に、“独創的な発想と考え方を丁寧な解析に織り込んでまとめ上げた非常に斬新な研究”の成果である。

本論文では上記酵素の反応機構を明きらかにするために、 β -alanine, γ -aminobutyric acid, 6-aminohexonate, L-alanine, Isoamylamine等のアミノ供与体及びアミノ受容体であるピルビン酸とのPLP型の酵素の複合体結晶を調整し、強度データの収集には高エネルギー物理学研究所放射光実験施設BL6A2の巨大分子用ワイセンベルグカメラとイメージングプレートを用いて分解能1.8Å迄のデータ収集を行った。このうち特にL-alanineでは照射時間を変えることにより分解能1.4Åまでのデータ収集を行っている。それらのデータを使いそれらの複合体結晶構造の解析を行いアミノ供与体の場合には補酵素と供与体との間にシッフ塩基が形成されていることを証明した。この供与体のある場所にはnativeな酵素では水が存在するため、このような高分解能の解析により初めて中間体の存在を確認することができた。また、電子密度分布を解析することにより中間体の2重結合位置をも決定できた。これらの解析結果に基づいて本酵素の反応機構を提唱した。

池水君は一般には殆ど例のない酵素と基質の反応中間体を結晶中で捕らえることに成功し、その精密な構造解析に基づいてAPTの反応機構の仮説を証明した。これらは蛋白結晶学的にも酵素科学的にも非常にレベルが高い。

これまで酵素反応機構の研究は主に阻害剤を使って進められてきた。また、真の反応機構を追跡するために低温でクライオソルベント中で強度データを収集する等の方法が開発されてきた。しかしながら前者の場合反応が止まるのでデータ収集に掛ける時間を気にする必要がないという利点はあるがそれが真の反応中間体の構造であるとは云い難い。後者の場合には生体内の酵素の存在状態とは全く異なった有機溶媒中に結晶を置くので得られた中間体の構造を使って生体内での反応機構を議論することには問題がある。本論文は上記の2つの方法の欠点を全て取り除いた“水溶液中で酵素と基質の最適反応条件で浸透法をもちいず共結晶法により作成された結晶を用いたもの”であることから、「真の酵素反応を反映した研究法」であると云える。しかしながら、一般には酵素反応はミリ秒オーダーで進行するのでこのように中間体を捕らえることは非常にむずかしいことからこれまでは挑戦がなされなかった。そこでこの研究の成果および方法はアミノ基転移酵素反応のモデルになると共に、広くビタミンB6を含む酵素反応機構研究のモデルとしても極めて重要である。これら多くの観点からこの研究は大変独創的であり斬新なアイデアに基づくものである。以上の研究成果は博士論文に相応する内容であると判断した。