

Title	ヒトアデニレートキナーゼの活性部位に関する蛋白質工学的研究
Author(s)	金, 暁駿
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37054
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

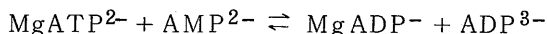
【 4 】

氏名・(本籍)	きむ 金	ひよ 暁	ずん 駿
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	第	9 1 4 1	号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ヒトアデニレートキナーゼの活性部位に関する蛋白質工学的研究		
論文審査委員	(主査) 教授 北川 勲	(副査) 教授 今西 武	教授 岩田 宙造 教授 富田 研一

論 文 内 容 の 要 旨

アデニレートキナーゼは生物界に広く分布する酵素で、アデニンヌクレオチドのすみやかな動的平衡を保つことにより、細胞内ATPの生産系と利用系のバランスを保つ、重要な役割を果している。細胞質アデニレートキナーゼ (EC 2.7.4.3., AK1) は194残基のアミノ酸からなる、分子量21700ダルトンのもっとも小型のリン酸転移酵素として知られている。

AK1はMg²⁺の存在下、つぎのリン酸転移反応を可逆的に触媒する。



基質であるMgATP (あるいはMgADP) とAMP (あるいはADP) はそれぞれ異なる所に結合する。すなわち、AK1は2つのヌクレオチドの結合部位を持っている。しかし、AKと基質の複合体のX線結晶解析が為されておらず、X線結晶解析とNMRの結果から推定されている基質結合部位は一致していない。基質結合部位を明らかにするため、幅広い研究が為されてきたが、現在までのところ、統一的な結論は得られていない。本研究では、遺伝子操作の方法でヒト筋肉アデニレートキナーゼ (hAK1) 及びその変換体を調製し、構造活性相関を調べ、触媒部位及び基質結合部位の同定を行った。

I 組換えヒト筋肉型アデニレートキナーゼ (hAK1) 及びその変換体の作成

ヒト筋肉アデニレートキナーゼのアミノ酸配列をもとに、全長596塩基対の人工遺伝子を設計し、化学合成したデオキシオリゴヌクレオチドを酵素的に結合させ、遺伝子を合成した。それをtrpプロモーターを持つ発現ベクターに組み込み、直接発現させるプラスミド (pAK) を作製した。また、変換体遺伝子はカセット変異法もしくはオリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法で作製した。目的とする蛋白質は、pAKを含んだ大腸菌をM9-casamino acid 培地でtrpプロモーターの誘導を

かけ24時間培養し、集菌後、破碎した大腸菌の可溶性画分をPhosphocelluloseとSephadex G-75の2段階のカラムクロマトグラフィーにかけることにより精製し、1Lの培養液から25-35mgの蛋白質を得た。

II アデニレートキナーゼの基質結合部位の同定

リン酸転移酵素の場合、リン酸基の結合部位は触媒部位でもあることに着目し、化学修飾実験から予測された活性部位の残基、X線結晶解析から示唆された活性部位の残基、およびNMR解析から推定された活性部位の残基について、単アミノ酸残基置換効果を調べた。

1. 化学修飾から予想された活性部位残基 (Tyr-95 および Arg-97) の変換

Tyr-95をPheに、Arg-97をAlaにそれぞれ置換した変換体酵素、Y95FhAK1とR97AhAK1を作成した。各変換体の反応速度定数を測定した結果、両変換体とも基質に対する親和性(K_m)は天然型に比べ大きい変化はないが、変化の幅はむしろAMPの方が大きかった。この結果から、Tyr-95とArg-97はATPを認識する残基ではなく、むしろAMPに関係している可能性が示唆された。さらに、R97AhAK1の酵素活性は天然型の約1%に低下していることからArg-97は酵素活性に重要な残基であるが、必須な残基ではないことが示唆された。また、Y95FhAK1の酵素活性は天然型とほぼ同じであった。

2. X線結晶解析から予想された活性部位残基 (Arg-44, 97, 128, 132, 138, 149) の変換

X線結晶解析のモデルでは44, 97, 128, 132, 138, 149番目のArg残基とATPあるいはAMPのリン酸基との相互作用が予想されている。そこで、各ArgをAlaに置換し(R44AhAK1, R128AhAK1, R132AhAK1, R138AhAK1, R149AhAK1)、反応速度定数を調べた。

K_m AMPの変化はR44AhAK1は天然型の44倍、R138AhAK1は20倍、R149AhAK1は18倍、R132AhAK1とR128AhAK1は13倍、11倍に大きくなった。また、R128AhAK1の K_m MgATPは天然型の値の2.6倍、R132AhAK1は1.8倍、R149AhAK1は8倍に大きくなったが、AMPに対する親和性をもっとも低かったR44AhAK1とR138AhAK1の K_m MgATPは天然型とほぼ同程度であった。更に、触媒能(k_{cat}/K_m)を比べるとR138AhAK1, R149AhAK1, R132AhAK1の3つの変換体では天然型の k_{cat}/K_m 値の10-4%になっていた。

3. NMR解析から予想された活性部位残基 (Asp-119) の変換

NMR解析による基質結合部位では、Asp-119がMgATPの Mg^{2+} と静電的相互作用によりリン酸基の転移を触媒することが予想されていた。そこで、Asp-119をAsnに置換した変換体D119NhAK1を作成しその性質を調べた結果、アミノ酸置換による基質の親和性と触媒能に大きな変化は認められなかった。

以上の解析から今までに為された殆どの実験結果をうまく説明できるアデニレートキナーゼの新しい基質結合部位を考えた。

III 結 論

1. ヒトの細胞質アデニレートキナーゼ (hAK1) をコードする鎖長596塩基対の人工遺伝子を合

成し、また、天然型及びその変換体を大量に産生できる大腸菌における発現系を確立した。

2. アデニレートキナーゼの活性部位について、保存性の高いアルギニン残基のアラニン置換 (R44A, R97A, R123A, R132A, R138A, R149AhAK1) により, Arg-132, Arg-138, Arg-149 の3つの残基が酵素活性に必須であることを明らかにした。またArg-44はAMPのアデニンと糖部分を認識し, Arg-128はATPの結合に関与することを明らかにした。
3. 化学修飾から示唆されていたTyr-95とArg-97は酵素活性に必須な残基ではないことを明らかにした。また, NMR解析から予想されたAsp-119の Mg^{2+} と静電的相互作用による触媒作用は見られなかった。
4. 以上の結果をもとに, 従来の実験結果をも合理的に説明できるアデニレートキナーゼの新しい基質結合部位モデルを提案した。

論文の審査結果の要旨

アデニレートキナーゼは、細胞内のATPの生産系と利用系のバランスを調節する重要な酵素で、ATP結合蛋白質の典型例としても注目されている。

本論文では、まず人工遺伝子を合成して大腸菌によるヒト筋肉型アデニレートキナーゼの生産系を確立し、次いで遺伝子の人工変異により部位特異的にアミノ酸残基を変換した酵素を作製し、その活性を調べることで、その基質結合部位および触媒に関与する残基を明らかにしている。本酵素の $MgATP$ およびAMP結合部位に関しては、X線結晶解析やNMRなどによる多くの研究にもかかわらず、決定的な結論が得られていなかったが、本研究によりこれを確定する強力な証拠が得られ、新しいモデルが提示された。

以上の成果は、薬学博士の学位請求論文として、充分価値のあるものと認められる。