Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Structural Studies on Glutathione Synthetase from Escheri-chia coli B |
| Author(s) | 山口, 宏 |
| Citation | 大阪大学, 1991, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/37220 |
| 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

【23】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 山口　宏（やまぐち　ひろし） |
| 学位の種類 | 理学博士 |
| 学位記番号 | 第 9649 号 |
| 学位授与の日付 | 平成3年3月26日 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科　高分子学専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | Structural Studies on Glutathione Synthetase from *Escherichia coli* B（大腸菌由来グルタチオン合成酵素の構造研究） |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授　勝部　幸輝<br>(副査)<br>教授　高木　俊夫　　教授　小高　忠男　　教授　小林　雅通 |

## 論文内容の要旨

グルタチオン合成酵素はγ－Glu－CysとGlyよりATPを用いてグルタチオンを合成する酵素である。316アミノ酸残基より構成されるサブユニットの4量体として存在する大腸菌B由来のグルタチオン合成酵素を用い，その立体構造と機能発現との関連を解明するためX線結晶構造解析を行った。結晶は硫酸アンモニウムを沈澱剤としてリン酸緩衝液およびトリス－塩酸緩衝液より得た。リン酸緩衝液より得た結晶（空間群$P6_{2}22$, $a=88.0$, $c=164.2$Å）を用い，多重同型置換法によって得た電子密度図により分子モデルを構築した。構造の精密化は，シンクロトロン放射光によって収集した2.2Å分解能のデータを用いて，約230個の水分子を含めて行い，R値20.9%を得た。トリス－塩酸緩衝液より得た結晶（$P6_{2}22$, $a=87.8$, $c=170.2$Å）の構造も2.7Å分解能で精密化し（R値20.9%），リン酸緩衝液より得た結晶の構造と本質的に同一であることを確認した。また，ATPおよび基質類似物質であるγ－Glu－Abuとの複合体結晶を調製し，それぞれの結合部位をD－フーリエ合成によって決定した。グルタチオン合成酵素のサブユニットは，2次構造に富む3つのドメインより構成されている。Ile－226よりGly－242はGlyに富む領域で，明瞭な電子密度を示さないことから柔軟性に富むループを形成していると考えられる。4量体分子は222対称をもち，2つの密に接した2量体が，更に相互作用して4量体を形成しており，向かい合った2量体の間に大きな溶媒チャンネルを有している。ATPおよび基質の結合部位は，この溶媒チャンネルに面している。柔軟性をもつループは基質結合部近傍に存在し，基質結合によりループの柔軟性が低下することが，酵素と基質複合体との間のD－フーリエ合成において示唆された。また，アルギニルエンドペプチダーゼ（Arg－C）により，本酵素はこのループのほぼ中央部のArg－233で特異的に切断され失活することがわかった。それに対し，基質の存在下では，Arg－

Cによる切断に対する保護効果が観測された。また，ループを4つのGly残基で置換したループ欠損型酵素（DEL）も失活した。さらに柔軟性を変化させる目的で，ループ中のGlyやProを他の残基で置換した変異型酵素も，活性等に変化が見られた。このうち失活したDEL及びG240Vの構造を解析し，その構造を野生型の構造と比較したが，ループ構造以外には有意な構造変化は観測されなかった。これらのことより，ループが基質の結合に関与しており，その柔軟性が活性発現に重要な役割を果たしていることがわかった。

## 論文審査の結果の要旨

グルタチオン合成酵素は，最近，その構造や機能についての研究が活発に行なわれるようになり，その詳細な立体構造の決定がつよく望まれていた。

山口宏君は，大腸菌Bが産生するグルタチオン合成酵素の立体構造をX線結晶解析法で決定するとともに，酵素－ATP，酵素－γ－Glu－Abuおよび酵素－ATP－γ－Glu－Abuの3種の酵素－基質複合体の構造解析を行ない，各基質の結合部位を決定した。また，これらの立体構造に基づいて作成した部位特異的変異酵素の構造解析をも行なうことによって，アミノ酸置換に伴う構造および活性の変化を系統的に研究し，次のような知見を得た。

(1)結晶化条件の異なる2種の結晶について2.2Åおよび2.7Åの分解能で構造解析を行ない，両者の分子構造が基本的に同じであることから，結晶中の本酵素の分子構造は溶液中のそれと大差がない。(2)ATPの結合部位の構造は，従来から考えられていたロスマン構造とは異なる新しいタイプの構造である。(3)酵素は等価なサブユニットからなる4量体を形成しており，各サブユニットは3つのドメインからなっている。ATPおよびγ－Glu－Abuが結合するドメインには，明瞭な電子密度を与えない残基番号226～242の17残基からなるペプチド鎖分（IPQGGETRGNLAAGGRG）がある。この部分は，一定の構造をとらずにゆらいだ構造をとっており，溶媒領域につき出している。これをフレキシブルループと名付けた。

ついで，このフレキシブルループについて詳しく検討し，(1)このループをGly－Gly－Gly－に置換した変異酵素は失活するが，ループ以外の構造は野生型酵素と同じである。(2)ループ中のGlyやProを，Valに置換した酵素の構造は，いずれも野生型と基本的に同じであるが，それらの活性は著しく低下し，またループの柔軟性も低下する。(3)ATPなどの基質が結合したときループの柔軟性は減少し，ループは酵素の基質結合部位付近に固定される傾向がある。などの結果を得た。これらのことから，フレキシブルループはインデュースフィッティングに似た機構で，酵素に結合した基質や中間体を溶媒分子から保護し，酵素の特異性を高めているとの結論を得た。

本論文では，グルタチオン合成酵素の立体構造およびその酵素がもつ特異性について独創的な研究を行なっている。これは，今後の蛋白質工学に関する基礎研究に対し，大きく貢献するものと期待される。したがって，本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。