The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and Functional Analysis of Nucleoside Diphosphate Kinase from Thermus thermophilus HB8
Author(s)	武石, 俊作
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45617
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏　　名	武　石　俊　作（たけ いし しゅん さく）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１９０７３　号
学位授与年月日	平成 16 年 12 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Structural and Functional Analysis of Nucleoside Diphosphate Kinase from *Thermus thermophilus* HB8 （高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来ヌクレオシド二リン酸キナーゼの構造及び機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　金澤　　浩　　教　授　福山　恵一　　講　師　増井　良治

論　文　内　容　の　要　旨

ほとんど全ての細胞がヌクレオチドを *de novo* 合成するか、核酸分解物から合成できる。このヌクレオチドの代謝経路において、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ（nucleoside diphosphate kinase（NDPK））は（デオキシ）ヌクレオシド二リン酸（(d)NDP）のリン酸化反応を触媒することで、核酸合成の前駆体である（デオキシ）ヌクレオシド三リン酸（(d)NTP）を生成してヌクレオチドプールの濃度を調整する役割を担っていることが知られている。しかし、リン酸化触媒や基質認識の機構については未解明の部分が残っている。そこでこれらを明らかにするために、そのタンパク質が安定で、立体構造解析や分子機能解析に適した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の NDPK（ttNDPK）を用いて、X 線結晶構造解析ならびに基質との反応速度論的解析を行った。

ゲル濾過法を用いて溶液中での会合状態を調べたところ、6 量体であった。ttNDPK の立体構造解析の結果、真核生物由来で必要と考えられていたサブユニットの C 末端間の相互作用は会合に必要でないことがわかった。基質として、ADP, GDP, CDP, UDP, dTDP, dADP, ATP が結合した ttNDPK の立体構造を解析した。基質の塩基部分の認識には、Phe57 との π-π 相互作用が主に寄与していることが示唆された。また（d)GDP に対してのみ同一サブユニット内の Glu が寄与していることがわかったが、真核生物では隣のサブユニットの Glu または Gln がこの役目を担っていると推察される。

NDPK の 6 量体は 3 組の 2 量体からなるが、その 2 量体の内の一方に ATP が、他方に ADP とホスホヒスチジンとなっている反応中間体が結合した状態を捕らえることに成功し、今回初めて野生型酵素と ATP 及び反応中間体の複合体結晶構造を決定することができた。これらはリン酸基転移の前後の構造であり、逆反応を防ぐための準安定状態だと考えられる。更に Mg^{2+} は γ リン酸の酸素と結合している状態で、ATP との複合体においてのみ観測された。これらをもとにリン酸基転移反応のメカニズムを提唱した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ヌクレオシド二リン酸（NDP）をヌクレオシド三リン酸に変換する反応を触媒するNDPキナーゼの触媒機構と基質認識機構を明らかにするため、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の NDP キナーゼ（ttNDPK）を用いて、X線結晶構造解析ならびに基質との反応速度論的解析を行った。基質として、ADP, GDP, CDP, UDP, dTDP, dADP, ATP が結合した ttNDPK の立体構造を解析した結果、基質の塩基部分の認識には、Phe57 との π-π 相互作用が主に寄与していること、また（d)GDP に対してのみ同一サブユニット内の Glu が寄与していることがわかった。また、会合の際に基本構造となるダイマーの一方に ATP が、他方に ADP とホスホヒスチジンとなっている反応中間体が結合した状態を捕らえることに成功し、今回初めて野生型酵素と ATP 及び反応中間体の複合体結晶構造を決定することができた。更に Mg^{2+}はγリン酸の酸素と結合している状態で、ATP との複合体においてのみ観測された。これらをもとにリン酸基転移反応のメカニズムを提唱した。