

Title	Novel Reaction Mechanism of GTP Cyclohydrolase I. High Resolution X-Ray Crystallography of <i>Thermus thermophilus</i> HB8 Enzyme Complexed with a Transition State Analogue, the 8-Oxoguanine Derivative
Author(s)	田中, 容子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46503
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	田中容子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19797 号
学位授与年月日	平成 17 年 9 月 30 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	Novel Reaction Mechanism of GTP Cyclohydrolase I. High Resolution X-Ray Crystallography of <i>Thermus thermophilus</i> HB8 Enzyme Complexed with a Transition State Analogue, the 8-Oxoguanine Derivative. (GTP cyclohydrolase I の新規反応機構; <i>Thermus thermophilus</i> HB8 由来酵素・8-oxoguanine 誘導体・複合体の高分解能 X 線結晶解析)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 福山 恵一 教授 金澤 浩 講師 増井 良治

論文内容の要旨

GTP シクロヒドロラーゼ I (GTP cyclohydrolase I; GTPCH1) は分子量 20,000~30,000 のサブユニットからなる 10 量体タンパク質で、細菌からヒトまで広く保存されており、各種間のアミノ酸配列相同性も高い。この GTPCH1 は GTP を基質としてジヒドロネオプテリン三リン酸を産生する酵素で、単一酵素にもかかわらず、約 10 ステップの反応過程を経て、GTP のプリン塩基とリボース環よりプテリジン環を生成する多段階反応を触媒する。遷移相の速度論的解析から、律速段階は反応機構の後半に存在することが報告されているが、その詳細は知られていなかった。

現在までに、ヒト、ラット及び大腸菌 GTPCH1 の立体構造が決定されているが、もっとも分解能の高い場合でも 2.55 Å である。それらの構造を基にして反応機構が提唱されているが、基質類似物質と、活性に必須な亜鉛イオンがともに結合した GTPCH1 の立体構造は、明らかにされていない。さらに、反応機構を議論する際に必要な水分子の位置が明らかになった構造も報告されていない。そこで、X 線構造解析に適した高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 GTPCH1 (tGTPCH1) を用いて構造・機能解析を行った。

基質非存在下における tGTPCH1 の立体構造は、ヒト GTPCH1 をモデルとした分子置換法を用い、非対称単位中にサブユニットが 5 個存在する構造として、分解能 2.2 Å で解析できた。Cys と His 残基が配位している活性中心の亜鉛の位置は、異常分散の測定により確定した。分子機能解析により、8-oxo-GTP や 8-oxo-dGTP が tGTPCH1 に対して、それぞれの解離定数が 5.4 nM, 0.22 μM 高い親和性を示すことが明らかになった。そこで、8-oxo-GTP または 8-oxo-dGTP との複合体の立体構造を、それぞれ、分解能 2.0, 1.82 Å で解析した。基質類似物質と亜鉛イオンの存在する三者複合体としては、初めての報告である。亜鉛の第 4 配位子は、基質無しの場合には水分子であったが、8-oxo-guanine との複合体では O8 原子であった。また、反応に重要と考えられる水分子が特定できるとともに、His110 イミダゾール環の回転も明らかになった。8-oxo-GTP が $K_m=4.2 \mu M$ の 1000 倍という非常に強い親和性 ($K_s=5.4 \text{ nM}$) を示すこと、および、その結合様式から、8-oxo-guanine は遷移状態アナログであると考えられた。これらの立体構造の結果に基づいて、触媒活性に重要な金属イオン、水分子、His110 イミダゾール環の回転などを考慮した新規の反応機構を提唱した。

論文審査の結果の要旨

GTP シクロヒドロラーゼ I (GTPCH1) は、GTP を基質とし、多段階反応を経てジヒドロネオプテリンを生成するホモ 10 量体の酵素である。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の GTPCH1 に、基質類似物質の 8-オキソ-GTP や 8-オキソ-dGTP が強く結合することを発見したので、それらの基質類似物質と GTPCH1 との複合体について、高分解能の X 線結晶解析を行ったところ、これら基質類似物質は、遷移状態アナログであることが示唆された。その結合様式をもとにして、活性部位のアミノ酸残基、亜鉛イオン、水分子の役割を考慮した新規な酵素反応機構を提唱することが可能になった。

よって本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。