

Title	Structural analyses of maize glutamine synthetase
Author(s)	海野, 英昭
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47660">https://hdl.handle.net/11094/47660</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	うん 海 の 野 ひで 英 あき 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20745 号
学位授与年月日	平成 18 年 12 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structural analyses of maize glutamine synthetase (トウモロコシ由来グルタミン合成酵素の結晶構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武  (副査) 教授 奥山 健二 教授 長谷 俊治 助教授 楠木 正己

#### 論文内容の要旨

グルタミン合成酵素 (GS) は植物の生育に必須の酵素蛋白質であり、ATP の加水分解を利用しアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを合成する。この反応は、植物の生育と発達において必要な代謝反応に広範囲に寄与するアンモニアの同化および再同化反応において、極めて重要な役割を担っている。高等植物グルタミン合成酵素の原子構造解明は、その詳細な反応メカニズムの理解に重要であるばかりでなく、それにより植物の生産性と農業への応用の観点において新たな洞察を得る事が可能となる。グルタミン合成酵素は、原核生物が属する type-I、真核生物が属する type-II、そしていくつかの原核生物が属する type-III の 3 つに分類されており、それらのグループ間におけるアミノ酸一次配列の相同性は低い。本報告までに原核生物由来として 2 種類の type-I GS 結晶構造解析が報告されているが、植物を含め type-II GS の構造報告は無く、type-I 以外の構造/反応機構等の詳細は不明であった。そこで植物におけるグルタミン合成の反応・制御メカニズムを解明する為、トウモロコシ由来 GS 蛋白質結晶の X 線構造解析研究を実施した。結晶構造決定のため、大腸菌による組み替え GS 発現系を用いたトウモロコシ由来 GS の発現、精製、および結晶化条件検討を行い、良質の GS 結晶を得た。その結晶および重原子誘導体結晶を用いて X 線回折データを収集し、重原子同形置換法による位相決定、構造精密化を経て ADP/MetSox-P/Mn 複合体結晶構造を分解能 2.63 Å で決定した。

その GS 複合体構造は 10 量体を有し、原核生物由来 GS とは大きく異なっていることが判明した。原核生物と比較すると、複合体構造の違いは単に構成するサブユニットの数のみならず、そのサブユニット同士の配置と相互作用が大きく異なっている事が明らかとなった。

グルタミン合成反応機構を詳細に調べるため、ATP アナログとの複合体 (AMP PNP/MetSox/Mn) の結晶化およびその構造決定を行った。その構造解析により、ATP からグルタミン酸へのリン酸基転移反応が、立体的反転を伴う  $S_N2$  反応を経由する associate mechanism により進行する事を明らかにした。

グルタミン合成酵素は植物において生育に必須の酵素であり、その阻害剤は除草剤として広く用いられている。その除草剤 (phosphinothricin) との complex (ADP/PPT-P/Mn) の結晶化およびその構造決定を行い、除草剤の阻害作用機構を明らかにした。この知見は新たな除草剤開発において極めて有用であると考えられる。

GS は植物において各種アイソザイムが存在し、特性の異なるものとして複数存在する。トウモロコシにおける

GS1a/GS1d アイソザイム間での熱安定性の大きな差は、161 位の Ile 一残基のみで決まる事がわかっている。本構造解析により明らかになった立体構造から、Ile161 がサブユニット間インタラクションに関わり、それにより熱安定性を高めている事が明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

トウモロコシ由来グルタミン合成酵素 (GS) は、グルタミン酸とアンモニアから ATP を利用してグルタミンを合成する酵素であり、根から吸収される無機態窒素化合物から生体内で利用可能な有機態窒素化合物を合成する系の鍵を握る酵素である。GS の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定した。その結果、本酵素は予想に反して 52 対称を持つ 10 量体構造であった。活性中心は 2 つの隣接するサブユニットで構成されていた。更に GS と除草剤である阻害剤との複合体の構造決定にも成功した。本阻害剤は基質類似であり、この構造に基づいて ATP からのリン酸基の転移反応が立体反転を伴う反応機構を明らかにすることができた。除草剤との複合体の構造は新しい除草剤設計の有用な指針となるものである。

この研究は GS の酵素反応機構の解明に大きく貢献するものであり、博士 (理学) の学位に値するものであると認める。