



Title	Exploring the Nucleotide-Binding Sites in Adenylate Kinase by Site-Directed Mutagenesis
Author(s)	岡島, 俊英
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3060122
DOI	10.11501/3060122
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	岡島俊英
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 10123 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 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 生物化学専攻
学位論文名	Exploring the Nucleotide-Binding Sites in Adenylate Kinase by Site-Directed Mutagenesis (部位特異的変異導入によるアデニレートキナーゼの基質結合部位の探索)
論文審査委員	(主査) 教授 福井 俊郎 (副査) 教授 二井 将光 教授 倉光 成紀

論文内容の要旨

アデニレートキナーゼは MgATP と AMP 間の可逆的なリン酸基転移反応を触媒し、細胞内のエネルギーバランスの維持に重要な役割を担っている。本研究では本酵素の基質結合部位を明らかにすることを主な目的として、ニワトリ骨格筋由来アデニレートキナーゼを対象に、部位特異的変異導入法による解析を行った。X線結晶解析から明らかにされている立体構造をもとに、AMP 結合部位と想定されている Thr39, Leu66, Val167, 及び、Gln101 などの残基で構成される保存性の高い領域に着目した。

まず、Leu66 を Gly, Ala, Val, Gln, 及び Trp に置換した変異型酵素を作製し、それらの酵素化学的性質を解析した結果、すべての変異型酵素では、野生型酵素に比べ、AMP に対する K_m 値のみが大きく増加していることが判明した。また、野生型、Ala, Val, 及び Trp 変異型酵素は基質結合に伴う正の協同性を示すのに対し、Gly 及び Gln 変異型酵素は負の協同性を示した。Trp 変異型酵素のインドール環由来の蛍光を指標として基質による消光を解析したところ、両基質が酵素上の相手側基質の結合部位にも結合することが示唆された。これらの結果より、Leu66 は本酵素の AMP 結合部位近傍に存在し、疎水の相互作用による基質の認識、及び基質結合に伴うアロステリックな構造変化に重要な役割を担うと考えられた。

次に、PCR を用いて Val166 及び Gln101 にランダムな変異を導入した。変異型酵素遺伝子を導入した大腸菌アデニレートキナーゼ温度感受性変異株の 45 °C における生育効果、及び粗抽出液中の酵素活性の違いから、67 位残基の許容性は広いが、101 位残基のそれは狭く Gln である必要性が高いと考えられた。精製した数種類の両変異型酵素の反応速度論的性質では、AMP に対する K_m 値のみが大きく増大していた。すなわち、Leu66 変異型酵素の解析結果と併せて考えると、これらの残基によって形成さ

れる局所的な疎水の領域がAMPのアデニン環の結合部位と結論された。また、Va167-Ala 変異型酵素には dAMP に対し、Gln101-His または Met 変異型酵素は UMP に対してそれぞれ野生型酵素よりも高い比活性を示し、両部位への変異導入により本酵素の基質特異性を改変し得る可能性が示唆された。

そこで、ヌクレオチドリン酸に対する特異性の改変を目的として、1 残基変異 (Thr39-Ala, Leu66-Ile)、両者を含んだ 2 残基変異、さらに、Gln101-Asn を加えた 3 残基変異を導入した変異型酵素を作成した。CMP 及び UMP に対する特異性を調べた結果、いずれの酵素も UMP に対しては低い酵素活性しか示さなかったが、Thr39-Ala 及び二重変異型酵素の CMP に対する活性は、野生型酵素に比べ k_{cat}/K_m 値でそれぞれ 17 倍及び 5 倍に増大していた。これらの結果及び立体構造の詳細な検討により、Thr39 は AMP の結合には関与しないが、CMP に対する反応性を抑える役割をもつと考えられた。Leu66 の Ile への置換は CMP に対する反応性を保ちつつ、AMP に対する反応性のみを特異的に低下させた。以上、本研究によりアデニレートキナーゼの基質認識の分子的根拠が示され、それを基にして基質特異性を改変することが可能となった。

論文審査の結果の要旨

岡島俊英君の研究は、アデニレートキナーゼの基質結合部位について詳細な構造解析を行なうと共に、この酵素の基質特異性を部分的に改変することに成功したものである。酵素学ならびにタンパク質工学の立場からみて、新しい内容を含むものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。