

# 超好熱性古細菌の中央代謝における鍵酵素の構造解析 Crystallography of key enzymes in the central metabolic pathways of hyperthermophilic Archaea

Yan Zhen, 伊藤史晃, 伏信進矢\*, 荒川孝俊, 若木高善

東京大学大学院農学生命科学研究科、〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Yan Zhen, Fumiaki Ito, Shinya Fushinobu\*, Takatoshi Arakawa and Takayoshi Wakagi  
Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657,  
Japan

## 1 はじめに

*Sulfolobus tokodaii* は約 80°C で生育する超好熱性古細菌であり、半リン酸化 Entner-Doudoroff (spED) 経路と呼ばれる非常に変わった解糖系を持つ。また、好気性生物であるため、主に TCA サイクルと呼吸鎖によりエネルギーを生産している。本課題の対象となる酵素は複雑なマルチコンポーネント酵素が含まれており、構造生物学的にも非常に興味深い。

(1) GAOR : spED 経路のグリセルアルデヒドからグリセリン酸への酸化反応に関わるグリセルアルデヒド酸化還元酵素(GAOR)は 3 種類のサブユニットからなるタンパク質であり、補酵素としてモリブデン補酵素、FAD、2つの鉄硫黄クラスターを持ち、電子受容体としてフェレドキシンだけでなく、O<sub>2</sub> も利用できる[1]。GAOR は、構造変化によりその電子受容体に変化する事が知られているキサンチン酸化還元酵素と同じ XO ファミリーに属する。

(2) PKOR : 通常の生物でピルビン酸、2-オキソグルタル酸などの 2-オキソ酸の酸化的脱炭酸を触媒するのは、NAD(P)を電子受容体とする巨大酵素複合体(分子量数百万)で、補酵素としてチアミンニリン酸(TPP)、リポ酸、FAD を持つ。一方古細菌では、Fd を電子受容体として、TPP と鉄硫黄クラスターを持つ分子量 10 万程度の比較的単純な酵素が同様の反応を触媒する。我々は *S. tokodaii* 菌体からピルビン酸とケトグルタル酸の双方を効率よく酸化する酸化還元酵素(PKOR)を精製し、この酵素が解糖系と TCA サイクルの両方で働く多機能酵素であることを示した[2]。

(3) GAPN : *Sulfolobus* 属の spED 経路は枝分れており、グリセルアルデヒド 3 リン酸から 3-ホスホグリセリン酸への NAD(P)<sup>+</sup>依存性の非リン酸化型酸化反応を触媒する脱水素酵素(GAPN)がその流量をアロステリックに制御している。近縁の古細菌 *S. solfataricus* の GAPN はグルコース 1 リン酸(G1P)により V 型の活性化を受ける ( $V_{max}$  が上昇する) が、我々は本菌の GAPN (配列同一性 66%) が K 型の活性化を受ける ( $K_m$  が下がる) ことを発見した[3]。さらに、キメラおよび変異体酵素により、その調節

に関わる領域がホモ 4 量体のサブユニット界面に存在することを突き止めた[4]。

本研究では spED 経路の酸化段階に関わる上記 3 種類の鍵酵素の構造を決定して分子機構を解明することを目的とする。

## 2 実験

GAOR、PKOR、GAPN、そして PKOR のホモログの PKOR2 の結晶化を行い、KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して回折測定実験を行った。

## 3 結果および考察

PKOR2 の結晶は構造解析に適しており、Se-SAD 法により位相決定し、分解能 2.1 Å で立体構造決定に成功した。また、ホモログである PKOR の構造も、以前測定していた 2.5 Å 分解能のデータを用いて決定することに成功した。

## 4 まとめ

PKOR2 と PKOR の結晶構造を決定することに成功した。これらの酵素には電子受容体の Fd の結合に適したポケットが存在し、モデリングにより、Fd の結合状態を推定することができた。

## 謝辞

実験をサポートして下さった KEK および PF のみなさんに感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Wakagi et al. *FEBS Lett.* **510**, 196 (2002)
- [2] Zhang et al. *J. Biochem.* **120**, 587 (1996)
- [3] Ito et al., *FEBS Lett.* **586**, 3097 (2012)
- [4] Ito et al., *BBA* **1844**, 759 (2014)

\* asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp