

## 超好熱性古細菌の新規なヘキソキナーゼの基質結合に伴う構造変化

西増弘志, 伏信進矢, 祥雲弘文, 若木高善  
 東京大学大学院農学生命科学研究科

### A novel hexokinase from hyperthermophilic archaeon and its structural changes on substrate binding

Hiroshi NISHIMASU, Shinya FUSHINOBU, Hirofumi SHOUN, Takayoshi WAKAGI  
 Department of Biotechnology, The University of Tokyo

#### 1. はじめに

超好熱性菌 (hyperthermophile) とは至適生育温度が 80°C 以上の菌であり [1], 進化系統樹の根元に近いところに位置し, 原始地球環境に近い高温環境に生育することから, 生命の起源に関する基礎研究対象になると考えられている。超好熱性菌の酵素は高度な熱安定性を持つことから産業利用への応用面においても注目されている。また, 古細菌 (Archaea) とは, 核を持たない単細胞微生物であるが, 真正細菌 (Bacteria) および真核生物 (Eukarya) とは分子系統樹上の位置, 生化学的性質, 分子生物学的性質などが決定的に異なる一群の生物である [2]。古細菌の定義は 1970 年代後半から始まり, 特に超好熱性古細菌の研究は近年進んで来ているものの, 最も基本的とされている中央代謝 (解糖系) に関わる酵素群ですら, いまだに不明な点が残されている。例えば, 超好熱性古細菌のうち *Pyrococcus* および *Thermococcus* 属では, 解糖系の序盤で高エネルギーリン酸結合を消費して基質をリン酸化する 2 種類の酵素 (最初にグルコースをリン酸化するヘキソキナーゼ/グルコキナーゼと, その下流でフルクトース 6 リン酸をリン酸化するホスホフルクトキナーゼ) が, ATP ではなく ADP を用いることが分かっている。我々のグループは以前 PF のビームラインを利用して ADP 依存性グルコキナーゼの立体構造を決定した (この酵素はグルコースのみを厳密に認識するためにグルコキナーゼと呼ばれる) [3]。ADP 依存性グルコキナーゼは, 通常の ATP 依存性ヘキソキナーゼとは全く別のファミリーであるが, 同様に ATP 依存性の糖基質リン酸化反応を行うリボキナーゼと似た立体構造を持ち, 基質 ADP は, リボキナーゼの ATP 結合部位とはリン酸 1 個分ずれた位置に結合することが分かった。さらに, この酵素は大小 2 つのドメインから成るが, 基質の結合に伴って, それらが大きく閉じることが明らかにされた [4]。基質に適合して酵素が構造変化を行うという概念は誘導適合 (induced fit) として知られており, この実例として最もよく知られているのが, 他でもない ATP 依存性ヘキソキナーゼである [5]。

#### 2. 新規なヘキソキナーゼの発見

##### 2-1. *Sulfolobus* 属の糖代謝系酵素に残された謎

*Sulfolobus tokodaii* strain 7 は別府温泉から採取された好気性・好酸性の超好熱性古細菌であり, その糖代謝経路は,

真核生物や嫌気性真正細菌など多くの生物に見られるエムデン・マイヤホフ (EM) 経路ではなく, 好気性真正細菌の一部に見られるエントナー・ドウドロフ (ED) 経路に似ている事が知られている [6]。EM 経路とは生化学の授業で必ず習う一般的な解糖系のことであり, *Pyrococcus* および *Thermococcus* 属の糖代謝経路は, 上記のように一風変わった ADP 依存性キナーゼの関与などがあるために, 変形 EM 経路と呼ばれている。一方, *Sulfolobus* 属などの糖代謝は, その最初の反応でグルコースはリン酸化されず, グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) によりグルコン酸に酸化されることなどから, 半リン酸化 ED 経路と呼ばれている [7]。*S. tokodaii* は全ゲノム解析が終了している菌であり [8], この半リン酸化 ED 経路の酵素群と目される遺伝子のほとんどを持つのに, EM 経路の初発酵素にあたるヘキソキナーゼの遺伝子は見つかっていなかった。ところが, 1984 年に報告された論文では, *Sulfolobus* 属の菌体内には ATP 依存性のグルコースリン酸化活性が検出されている [9]。さて, *Sulfolobus* 属は ATP 依存性ヘキソキナーゼを持つのか, それとも持たないのであろうか, というのが我々の最初の疑問点であった。

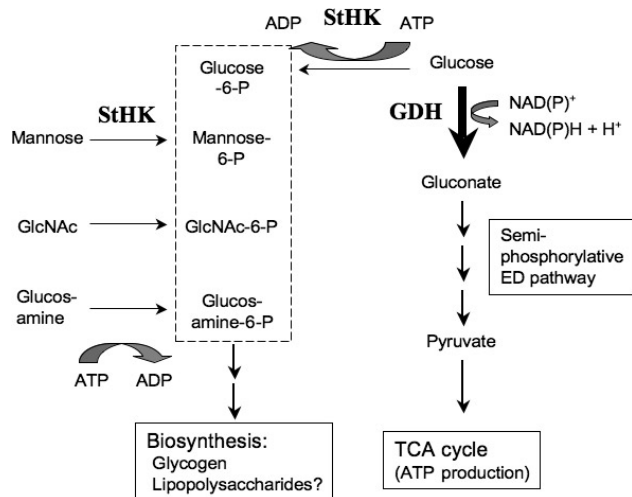
##### 2-2. *S. tokodaii* 菌体からの酵素の精製, 同定, 性質決定 [10]

まずは, 高温培養が可能なジャーファーマンターを用いて, *S. tokodaii* 菌体を 9L の培地中で培養し, これを 3 回繰り返す事により湿重量 124 g の菌体を得た。この菌体抽出液の中の ATP 依存性グルコースリン酸化活性は極微量であったが, 計 5 段階のカラムクロマトグラフィーを行うことにより, 最終的に 13 $\mu$ g の精製酵素タンパク質を得ることに成功した。このタンパク質を, *S. tokodaii* のヘキソキナーゼということで StHK と名付けた。MALDI-TOF 質量分析により, StHK はゲノム上で機能未知タンパク質 (hypothetical protein) とされている ORF ST2354 にコードされており, 既知のヘキソキナーゼやグルコキナーゼと有意な相同性を示さないことが確認された。以降の生化学的・構造生物学的な解析に十分なサンプルを得るために, 大腸菌を宿主とした異種発現系を構築した結果, 今度は大量 (2L の培養菌体から約 50 mg) の精製 StHK が得られた。StHK の基質特異性は広く, 糖基質ではグルコース, マンノース, 2-デオキシグルコース, グルコサミン, N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が, リン酸供与体 (ヌクレオ

チド) では ATP だけでなく CTP, ITP, GTP, UTP も基質になることが明らかとなった。ヘキソキナーゼはグルコース, マンノースなどいくつかのヘキソースに作用するためこの名が付けられている。しかし, StHK ほど広い基質特異性を持ち, 特にグルコースと GlcNAc をともに高い触媒効率でリン酸化出来る耐熱性酵素は前例がなかった。実際に, ほ乳類ではヘキソキナーゼに加えて, GlcNAc に特異的な GlcNAc キナーゼを持っていることが分かっている。さらに, 通常のヘキソキナーゼと異なる性質として, StHK の活性はリン酸供与体の反応産物である ADP により著しく阻害された。

### 2-3. StHK の生理的意義

上記のような性質は, StHK の生理的意義について重要な示唆を与える。StHK の発現レベルは菌体内では非常に低く (全可溶性タンパク質の約 0.04%), その活性は同じ基質 (グルコース) を取り合う半リン酸化 ED 経路の GDH 活性の 10 分の一程度にすぎない。従って, エネルギーを産生する中央代謝に関わるとは考えにくく, その反応産物であるリン酸化糖 (グルコース 6 リン酸など) を出発物質とする生合成経路に関与すると考えられる (Fig. 1)。この酵素が ADP により強く阻害されるということから, この仮説は支持される。つまり, 細胞内 ATP 濃度が低下した場合に生合成に向かう活性を押さえ, グルコースがエネルギー生産に利用されやすくなるというわけである。また, 基質特異性が広いということは様々な糖をリン酸化できるということである。S. tokodaii のゲノムには, マンノース, グルコサミン, GlcNAc をリン酸化すると推測されるキナーゼをコードする遺伝子は見当たらないことから, StHK が細胞壁構成成分など複数の生合成経路に関与していると考えられる。実は, Sulfolobus の糖代謝酵素からは,



**Figure 1** Sugar metabolic pathways of *S. tokodaii*. The main glycolytic pathway of *Sulfolobus* is the semi-phosphorylative Entner-Doudoroff (ED) pathway whose initial step is catalyzed by glucose dehydrogenase (GDH) [7]. *S. tokodaii* hexokinase (StHK) catalyzes phosphorylation of various sugar compounds, and is thought to be involved in several biosynthetic pathways.

他にもいくつか広い基質特異性を持つものが見つかっており [11-13], これらの酵素はグルコースだけでなく, ガラクトースや GlcNAc の代謝にも関与することが示されている。多くの生物の糖代謝経路では基質を厳しく選別する別個の酵素が働くのに対して, 原始的環境に生育する好熱性古細菌では, 「寛容な」少数の酵素が働いていることが多いようである。

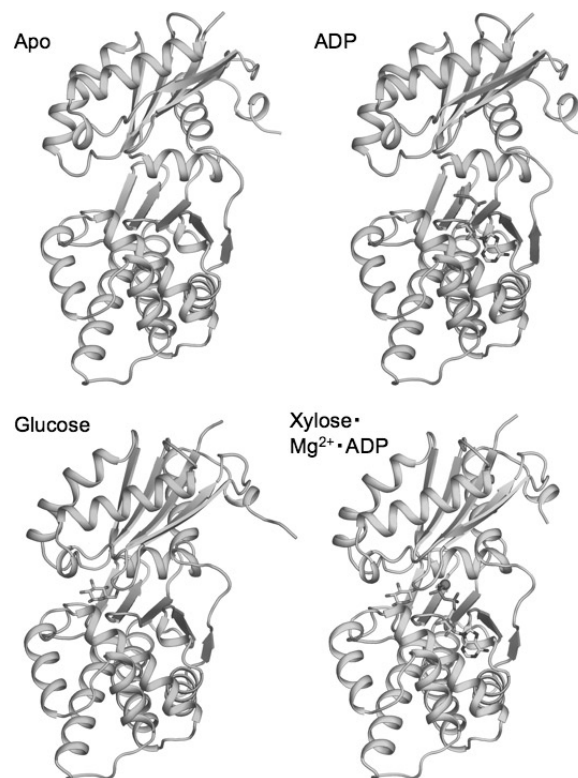
### 3. StHK の構造生物学 [14]

#### 3-1. 結晶化と構造決定

上記のように異種発現系で十分な量のタンパク質が得られること, 耐熱性の酵素であることから, 本酵素の結晶化条件の探索には有利な点が揃っていた。幸いにして良質の結晶が得られ (Fig. 2), 高度に自動化された PF の構造生物学ビームラインを利用することにより, 迅速に構造決定



**Figure 2** Crystals of StHK. Apo, glucose complex, and Xylose-Mg<sup>2+</sup>-ADP complex crystals are shown. The ADP complex crystals were prepared by soaking ADP to the Apo crystals.



**Figure 3** Overall structures of StHK in four different states. Apo and ADP complex structures are in the open conformation, whereas glucose complex and Xylose-Mg<sup>2+</sup>-ADP complex structures are in the closed conformation. ADP, glucose, and xylose are shown as stick models, and Mg<sup>2+</sup> is shown as a sphere.



を行うことが出来た。さらに、この酵素は2種類の基質(糖とリン酸供与体であるヌクレオチド)が結合することから、様々なリガンドの存在下で結晶化スクリーニングを行った結果、複数の状態の結晶構造を得ることが出来た (Fig. 3)。そのうち、代表的な4種類の状態である、(1) 基質の結合しないアポ状態、(2) ADP との2者複合体、(3) グルコースとの2者複合体、(4) キシロース・ $Mg^{2+}$ ・ADP との4者複合体について記述する。

### 3-2. アポ構造—全体構造

StHK のアミノ酸配列は既知のヘキソキナーゼやグルコキナーゼと有意な相同性を示さないと前述したが、その立体構造はヘキソキナーゼ・ファミリーに属する酵素と似ており、ATP 結合モチーフの存在等からも、このファミリーに属することが分かった。しかし、ヘキソキナーゼ・ファミリーとはコアとなる3次構造(フォールド)は共有するものの、基質の結合するループなど周辺領域では大きな違いが見られた。StHK は大小2つのドメインからなり、その間に基質結合ポケットが存在した。アポ構造は開いたコンフォメーションをとっていた。

### 3-3. グルコース複合体構造—糖結合

この構造は閉じたコンフォメーションを取っており、大小両ドメインの間で4つのループが形成するポケットに、グルコースが結合していた。これまでの研究から、ヘキソキナーゼ・ファミリーの酵素の多くは10度程度のドメインの回転を伴った構造変化が起こる事が知られている [15]。ところが、StHK へのグルコース結合に伴うドメインの回転は約25度であり、より大きな構造変化が起こっていた。グルコースは多くの水素結合で認識されており、グルコースに対する高い親和性 ( $K_m = 0.050$  mM) を説明出来る。基質特異性が広いことと、この結果は一見相容れないものであるが、現時点では、GlcNAc のような大きい基質が結合する場合には、若干の構造変化が起こって基質を受容すると考えている。StHK は GlcNAc 存在下でも、グルコース複合体と同様の条件で外見の異なる結晶が得られたが、良好なX線回折が得られなかった。このことから、GlcNAc 複合体はグルコース複合体とは似て非なるコンフォメーションを取ることが示唆される。GlcNAc のN-アセチル基が結合する部分のループ構造は通常のヘキソキナーゼとは大きく異なっていることから、この部分の配列が糖基質に対する基質特異性の決定要因であると考えられた。

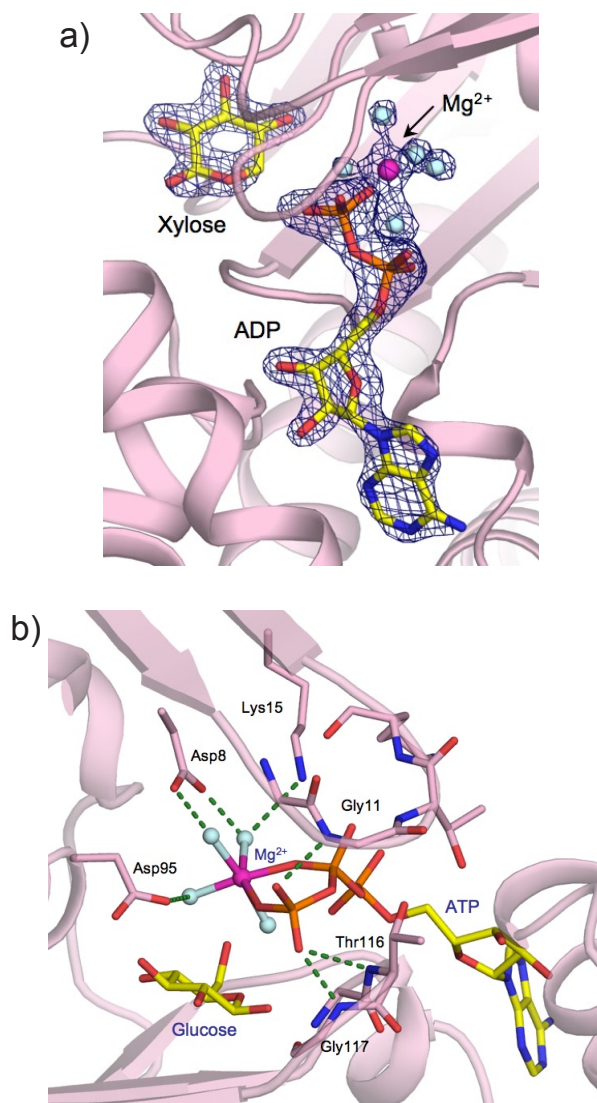
### 3-4. ADP 複合体構造—ヌクレオチド結合

この構造は、アポ状態の結晶に対してADPを浸漬することにより得られ、開いたコンフォメーションのまま、ADPは大ドメインの上につきとらるよう結合していた。ADPとの結合は多数の相互作用から成り、この酵素のATPに対する高い親和性 ( $K_m = 0.12$  mM) に加えて、ADPによる著しい阻害 ( $K_i = 18$   $\mu$ M) を説明出来る。しかし、アデニン環部分は主に疎水的でポケットに包まれてお

り、水素結合は1本しか見受けられなかった。このことは、StHK がATP以外の様々なヌクレオチドを基質にできる事実と一致する。StHK は開いた状態のままADP (またはATP) を結合出来ると考えられるのに対し、解糖系に関わる一般的なヘキソキナーゼ (またはグルコキナーゼ) では、グルコースが結合して閉じたコンフォメーションにのみATPが結合すると考えられている [16]。実際に、これらの酵素では、ADPによる強い阻害は報告されていない。

### 3-5. キシロース・ $Mg^{2+}$ ・ADP 複合体構造—マグネシウム結合

この構造は閉じたコンフォメーションを取っており、 $Mg^{2+}$  イオンと、それに配位結合する全ての原子の状態がはっきりと観測された (Fig. 4)。ヘキソキナーゼにおいては、 $Mg^{2+}$  イオンと、水を介してそれを認識する残基が触媒反応において重要であることが確認されている [17]。し



**Figure 4** Active site structure of StHK.

(a) Electron density map of the Xylose- $Mg^{2+}$ -ADP complex structure. The electron density for  $Mg^{2+}$  and coordinating waters was clearly observed. (b) Modeling of glucose and ATP in the active site. Glucose and ATP were modeled on the basis of the Xylose- $Mg^{2+}$ -ADP complex structure. The residues involved in  $Mg^{2+}$  binding are labeled.

かし、ヘキソキナーゼ・ファミリーにおいて  $Mg^{2+}$  が結合している結晶構造はこれまで解かれておらず、今回決定した複合体構造は、このファミリー全体の反応機構において、より正確な知見を与える極めて重要なものであった。また、キシロースと ADP の位置に基づいて活性部位にグルコースと ATP をモデリングしたところ、反応直前の状態として妥当な構造が得られ、触媒機構の詳細が明らかになった。

### 3. おわりに

本研究によって、ヘキソキナーゼ・ファミリーでは初めて、同一の酵素で4種類もの異なる状態の結晶構造が得られたことになる。この酵素の反応サイクルに沿った「スナップショット」を見てみると、糖結合は構造変化を誘導する一方、ヌクレオチド結合は構造変化を誘導しないという事が明白になった。StHK の反応順序は先に ATP が結合する場合と、先にグルコースが結合する場合が考えられるが、その両方における構造変化を動画にして、当研究室のホームページ (<http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp>) で公開しているので見て頂きたい。動画を作成してみて初めて気づいたことであるが、グルコース複合体と糖・ヌクレオチド・ $Mg^{2+}$  複合体はどちらも閉じた構造を取っているものの、後者の方がヌクレオチド・ $Mg^{2+}$  の結合に伴って、より「引き締まった」構造になることが分かる。

シンクロトロン放射光施設における構造生物学ビームラインの充実を背景とした、ここ数年の構造ゲノミクスの進展にともなって、好熱菌の酵素の構造と機能においては、特に深い理解が得られるようになった。しかし、データベース上に存在するゲノム配列の中には、依然、数多くの機能未知タンパク質をコードする ORF が含まれており、組換えタンパク質を扱っているだけでは分からないことも多い。大量の生体サンプルからのタンパク質の精製は苦勞することも多いが、本研究においては新規酵素の発見から分子メカニズムの解明に至る、実り多い結果につながった。

### 引用文献

- [1] Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. Brock Biology of Microorganisms, 8th Ed., Prentice Hall, New Jersey (1997)
- [2] 古賀洋介, 亀倉正博 (編). 古細菌の生物学, 東京大学出版会, 東京 (1998)
- [3] Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H. & Wakagi, T. Structure **9**, 205 (2001)
- [4] Ito, S., Fushinobu, S., Jeong, J. J., Yoshioka, I., Koga, S., Shoun, H. & Wakagi, T. J. Mol. Biol. **331**, 871 (2003)
- [5] Anderson, C. M., Zucker, F. H. & Steitz, T. A. Science **204**, 375 (1979)
- [6] Siebers, B. & Schonheit, P. Curr. Opin. Microbiol. **8**, 695 (2005)
- [7] Ahmed, H., Ettema, T. J., Tjaden, B., Geerling, A. C., van der Oost, J. & Siebers, B. Biochem. J. **390**, 529 (2005)
- [8] Kawarabayasi, Y., et al. DNA Res. **8**, 123 (2001)
- [9] De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Giardina, P., Poerio, E. & Buonocore, V. Biochem. J. **224**, 407 (1984)
- [10] Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. J. Bacteriol. **188**, 2014 (2006)
- [11] Theodossis, A., et al. J. Biol. Chem. **279**, 43886 (2004)
- [12] Zhang, Z., Tsujimura, M., Akutsu, J., Sasaki, M., Tajima, H. & Kawarabayasi, Y. J. Biol. Chem. **280**, 9698 (2005)
- [13] Milburn, C. C., Lamb, H. J., Theodossis, A., Bull, S. D., Hough, D. W., Danson, M. J. & Taylor, G. L. J. Biol. Chem. **281**, 14796 (2006)
- [14] Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. J. Biol. Chem. **282**, 9923 (2007)
- [15] Grueninger, D. & Schulz, G. E. J. Mol. Biol. **359**, 787 (2006)
- [16] Lunin, V. V., Li, Y., Schrag, J. D., Iannuzzi, P., Cygler, M. & Matte, A. J. Bacteriol. **186**, 6915 (2004)
- [17] Zeng, C., Aleshin, A. E., Hardie, J. B., Harrison, R. W. & Fromm, H. J. Biochemistry **35**, 13157 (1996)

(原稿受付日: 2007年9月7日)

### 著者紹介

西増弘志 Hiroshi NISHIMASU

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻

日本学術振興会特別研究員

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

TEL: 03-5841-5149 FAX: 03-5841-5152

略歴: 2007年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了, 2006年より現職。農学博士。

趣味: キックボクシング (0勝1敗), 野球

現在の所属: 東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情専攻 グローバル COE 特任助教

伏信進矢 Shinya FUSHINOBU

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻

助教

TEL: 03-5841-5151 FAX: 03-5841-5151

e-mail: asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴: 1997年東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程中退, 同年より現職。農学博士。

趣味: ボクシング観戦

祥雲弘文 Hirofumi SHOUN

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻

教授

趣味: 囲碁, カラオケ

若木高善 Takayoshi WAKAGI

東京大学大学院・農学生命科学研究科応用生命工学専攻

准教授

TEL: 03-5841-5152 FAX: 03-5841-5152

e-mail: atwakag@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴: 東京大学農学部大学院農芸化学専門課程博士課程修了, 1996年より現職。農学博士。

趣味: もと東京大学音楽部管弦楽団所属