

論文内容の要旨

博士論文題目

X-ray Structural Studies of the Histidine-containing Phosphotransfer Domain of the Anaerobic Sensor Kinase ArcB from *Escherichia coli*

(大腸菌由来嫌気性センサーキナーゼArcBのヒスチジンリン酸転移ドメインのX線構造研究)

氏 名 加藤 昌人

細菌、カビ、植物に広く存在する情報伝達機構である二成分系(two-component system)は、外来情報を受け取るセンサーキナーゼとその情報により遺伝子発現などの制御を行う応答調節蛋白質で構成されており、それらのヒスチジン残基とアスパラギン酸残基間の1回のリン酸化反応(His-Asp phosphorelay)によって情報が伝えられると信じられてきた。しかし、最近になって複数回のリン酸化反応で情報が伝達される系が見つかり、His-Asp-His-Aspリン酸化リレー(His-Asp-His-Asp phosphorelay)と呼ばれるようになった。そこでは、新規なヒスチジンリン酸転移 (HPt) ドメインが重要な役割を担っていることが分かった。著者は大腸菌の嫌気性センサー蛋白質ArcBのC末HPtドメインの結晶構造を世界で初めて決定し、以下のことを明らかにした。HPtドメインは、6本の α ヘリックスのみからなる腎臓様の構造をしており、主となる4本の α ヘリックスは束になり、4ヘリックスバンドルと総称される超二次構造を形成していた。ヘリックスD上の活性残基His715のイミダゾール環は、隣接ヘリックスE上のGln737の側鎖と水素結合して、 ϵ 位のNH基を腎臓型の内側の曲面に突出させた状態で存在した。このことから、リン酸化は ϵ 位の窒素原子で起こると推論した。Gln737に対応する他のHPtドメインの残基はグルタミン酸であるが、これらもGln737と同様な役割を担っていると考えられる。他の保存残基もこのヘリックスD、Eに集中しており、特に疎水性残基は4ヘリックスバンドルの疎水性コアを形成するように配列して、全体構造形成に重要な役割を果たしていた。これらの事実や、先にNMRより決定された走化性センサーキナーゼCheAの構造との類似性などから、本構造が他のHPtドメインにおいても普遍的であると推察した。本研究で明らかになったCheAのリン酸化転移ドメインとの構造類似性を契機に、ArcBのHPtドメインは、本来の応答調節蛋白質ではないCheYをリン酸化できることがin vitroの実験で示された。その生理学的意義はまだ明らかではないが、著者はリン酸化のメカニズムを考察するために、それらの複合体モデルを構築した。その結果、CheYの丸い分子表面とHPtドメインの湾曲した内面が良く一致することが分かった。CheYにはリン酸化に必須なMg²⁺が結合しており、反応時にリン酸基が配位すると考えられている。今回、以前から提唱された2配位モデルとともに我々独自の1配位モデルを構築して、各モデルの妥当性を検討した。二成分系には、細菌毒性を制御する系が多く含まれる。例えば、百日咳菌のBvgSはArcBと同様にHPtドメインを用いたHis-Asp-His-Aspリン酸化リレーで、百日咳毒素を誘導することが知られている。今回決定された本構造は、アミノ酸置換体作製や阻害剤の設計などに有益な指針を与えると考えられる。また現在、His-Asp-His-Aspリン酸化リレーの生理学的な意味として、フォスファターゼなどによる経路途中での情報伝達制御が考えられている。今後の展開において、本構造が役に立つことが期待される。

氏 名 加藤 昌人

(論文審査結果の要旨)

平成10年2月16日に、提出された論文は、以下に述べるように、バイオサイエンス博士の学位論文として合格と判断した。

提出された論文は、X線結晶解析の方法を用いた蛋白質の三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明からなる。

三次元構造決定では、試料の十分な精製、良質な結晶の調製、高分解能の観測強度データの収集、4つの重原子誘導体結晶を用いた重原子同型置換法による位相決定、精度の高い三次元構造の精密化がなされており、技術的信頼性は高い。特に、分解能2.5Åでの位相決定は解析初期の段階から高い精度を実現する高度の技術を示している。更に、分解能5.7Åで行われた最終の構造精密化は、多くの蛋白質の構造決定がなされている今日においても、特筆すべき精度である。蛋白質のX線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質の発現や精製などの生化学実験から、X線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの全ての方法についての深い造詣を示すものと判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した生化学的データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。これらは、活性部位の同定とともに、その構造的特徴と各活性残基の機能的役割、湾曲したドメインの全体構造と基質蛋白質との構造的相補性、活性部位を含む重要な残基の保存性の詳細な検討から導き出されたこのドメインの原核生物と真核生物とにわたる普遍性を明らかにしたことであり、また、マグネシウムイオンへの配位を介したリン酸転移反応のメカニズムを説明する2つのモデルの提唱である。また、論文全般におりて、記述の明解さも水準に達していると判断された。

以上に述べたように、His-Asp-His-Aspリン酸リレー系における重要な機能モジュールであるヒスチジンリン酸転移ドメイン (HPtドメイン) の三次元構造をを世界に先駆けて高精度で決定し、その構造と機能の関係を明らかにしており、その新規性と科学的価値は極めて高いと判断した。