

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570111

研究課題名（和文） 高等植物グルタミン合成酵素の構築原理と基質認識機構
の構造生物学研究研究課題名（英文） structural basis of the decamer architecture of a higher
plant glutamine synthetase and substrate recognition mechanism

研究代表者

楠木 正巳 (KUSUNOKI MASAMI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：90135749

研究成果の概要（和文）：

この研究ではトウモロコシグルタミン合成酵素のイソ酵素 GS1a を用いた。5量体の会合領域のアミノ酸残基のミュータントを作成し、相互作用を調べた。Phe150 近傍の残基を網羅的に選び Ala 置換体を作製して、リング間結合部から基質 Glu の活性中心への入り口にまたがる領域に、 K_m が増大する変異残基が集中していることがわかった。活性部位からはなれた遠位領域上の G241A と W243A のそれぞれの結晶化を行い、分解能 2.10 Å、2.80 Å の回折データが得られた。結晶解析から基質親和性に関与する構造要因が活性中心とは別にリング相互作用残基付近にも存在することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We studied GS1a isoenzyme of maize glutamine synthetase in this research. Residues around Phe150 are responsible for interactions between two pentamers and we prepared many alanine-mutant enzymes for these residues. As a result we found the alanine mutants with high K_m values for residues at the location spanning the two-pentamer interaction region and the substrate glutamic acid entry region into the catalytic site. The former region is distant from the catalytic site and we obtained two good crystals of G241A and W243A mutant enzymes at 2.10 Å and 2.80 Å resolutions, respectively there. These crystal structures revealed that there is a region on the enzyme involved in the substrate affinity distinct from the catalytic site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

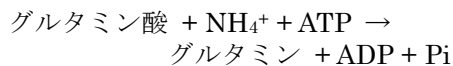
科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：窒素同化, 構造生物学, 結晶構造, グルタミン合成酵素, 植物生理, X線, 酵素反応, 活性部位

1. 研究開始当初の背景

植物は独立栄養を営んでおり、土壌や大気から獲得した無機態（無機物質）の栄養を有機化合物にしている。植物の三大栄養素は、窒素、カリウム、リンであり、窒素源は植物の成長を制限する重要な栄養素で、学術的にも農業生産にとっても大きな関心がある。高等植物では、窒素は硝酸イオンとアンモニアの形で根から吸収される。硝酸イオンは根や葉においてアンモニアに還元される。引き続きアンモニア同化反応において、アンモニアはグルタミン酸と反応しグルタミン酸側鎖のカルボキシル基のアミド化に使われ、グルタミンとして炭素骨格に組み入れられる。この反応はグルタミン合成酵素により触媒され、ATPがADPに加水分解されるエネルギーを利用する。

グルタミンは植物体の組織に移動し、窒素源として各種アミノ酸、核酸塩基などの窒素供給源となる。グルタミン合成酵素は次の反応を触媒し、窒素原子が有機化合物の炭素骨格に組み込まれる最初の反応であり、窒素同化のキー酵素とよばれている。



同一のサブユニット5つのリング構造が上に2つ重なった10量体構造をとる(図2)。10量体形成のメカニズムと生理機能についての興味もたれていたが、構造的な研究はなかった。また、基質であるグルタミン酸を結合し認識する残基がかなりわかっており、さらに研究を進め、それらの残基の役割を明らかにすることが必要であった。

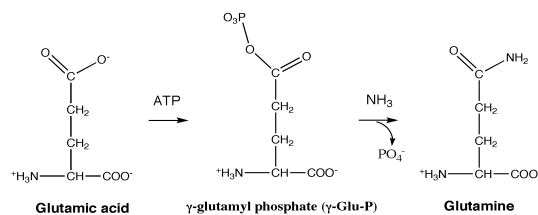
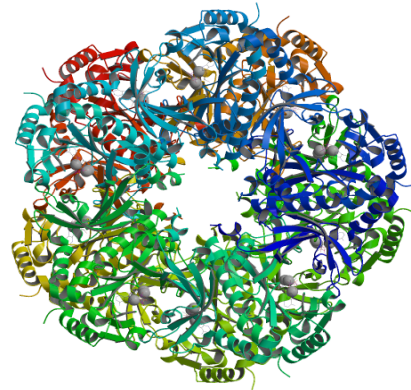


図1 グルタミン合成酵素のリン酸基転移とアンモニア付加反応

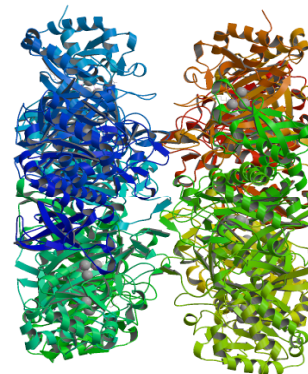
植物のグルタミン合成酵素の遺伝子は、多重遺伝子族であり、原核細胞のグルタミン合成酵素の遺伝子は単一である。これは、生理学的な機能と関係している。植物体の各所で発現する構成的酵素GS1と、根で発現し土壌中の窒素源で誘導される酵素GSrがあり、酵素反応速度、安定性などに生理学的に合理的な違いがある。トウモロコシでは酵素GS1は、遺伝子gs1a, gs1bのポリペプチド鎖から

モザイク状に構成されている。したがって、10量体は解離・会合している可能性がある。GSrも同様に遺伝子gs1c, gs1dのポリペプチド鎖のモザイクから構成されている。一方、原核細胞のグルタミン合成酵素の12量体は強固に結合している。我々はトウモロコシのグルタミン合成酵素GS1a(遺伝子gsa1を大腸菌で発現した産物)の結晶解析をおこなった。

これまで、酵素/基質アナログ/ATP or ATPアナログ複合体H249A/MetSox/AMPPNP, R332A/MetSox/ATPなどの結晶解析を行った。ここで、MetSoxは基質アナログ、AMPPNPは、ATPの基質アナログである。



(a)



(b)

図2 トウモロコシグルタミン合成酵素ホモ10量体の立体構造 (a)は5回軸、(b)は5回軸に垂直な2回軸から見た図。

2. 研究の目的

トウモロコシ由来のGSは高等植物で唯一結晶構造が明らかにされたものであり、構造機能相関の研究に適している。この研究ではグルタミン合成酵素のイソ酵素GS1aを用いた。その立体構造は同一の5つのサブユニットからなるリングが2つ積み重なった10量

体の2リング構造をとり、活性サイトはモノマー間にあり、分子全体で10ヶ所存在する。リング間の接触部位は各モノマーのF150周辺に位置し、この残基の改変により1リング構造(溶液)となったGS分子が得られる。F150は基質結合サイトから離れたところに位置しているが、1リングGSは基質Gluに対するKmが野生型の約50倍に増加することから、リング間のインターフェイスやその近傍が基質のグルタミン酸の親和性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで本研究ではこの領域がどのように酵素反応に関わっているかを詳細に調べるために、活性中心の近傍部位からリング間結合の遠位部までの残基を網羅的にアラニンに変異し、活性に及ぼす影響を調べた。このうち結晶になるもの2種類について結晶解析を行った。

3. 研究の方法

トウモロコシグルタミン合成酵素GS1aの10量体間の相互作用のアミノ酸残基(水素結合、疎水結合)のミュータント、基質であるグルタミン酸を認識するアミノ酸残基のミュータントを作成し、活性、安定性を測定し、結晶化した。良好な結晶が得られれば、結晶解析を行った。構造と機能、原核生物のグルタミン合成酵素との比較検討をおこなった。

グルタミン合成酵素のGS1aの10量体形成に重要な残基のミュータント酵素の作成と活性、安定性の測定と結晶化について以下の実験を行った。

トウモロコシグルタミン合成酵素の酵素GS1aの大腸菌の高発現系を用い、精製、結晶化を行った。活性測定、安定性測定は確立した方法は確立を用いた。ミュータントはStratagene社のQuikChangeキットを用いる。酵素の精製は、ゲルろ過、イオン交換、アフィニティーカラムを用いた。X線回折データは、つくば市高エネルギー加速器研究機構のシンクロトロン放射光装置Photon FactoryのX線装置を用いた。

nativeの結晶構造はすでに解かれているので、分子置換法により構造解析をおこない、引き続き座標精密化をおこなった。分子置換法はCCP4 MolRep、座標精密化はRefMac5を用いた。モデル座標精密化はcootを用いた。

4. 研究成果

活性中心の近傍部位からリング間結合の遠位部(F150)までの残基を網羅的にアラニンに変異し、活性に及ぼす影響を調べた。作製した14種類の変異体に対してGln、ADPとヒ酸を用いたトランスフェラーゼ活性とGluとATPを用いたシンテターゼ活性の2種類の方法で活性評価を行った。そして2種

類の活性がWTと比べてともに減少していない残基をClass I、トランスフェラーゼ活性が大きく減少しシンテターゼ活性が減少していない残基をClass II、ともに大きく減少した残基をClass IIIに大別した。活性中心近辺のループ構造に位置するT293, H296がClass II、そのループとリング間結合部位の間にあるG241, W243がClass IIIに分類された。本来の基質であるGluに対する親和性に活性中心の遠位領域が関与していることを示す結果であり、GSの触媒機構を考える上で新たな知見である。

Phe150近傍の残基を網羅的に選びAla置換体を作製して、リング間結合部から基質Gluの活性中心への入り口にまたがる領域に、Kmが増大する変異残基が集中した。活性部位からはなれた遠位領域上のG241AとW243Aのそれぞれの結晶化を行い、分解能2.55Å、2.80Åの回折データが得られた。結晶解析から基質親和性に関与する構造要因が活性中心とは別にリング相互作用残基付近にも存在するらしいことがわかった。H249QとF150V, G241A, W243Aの3種類では共にグルタミン酸に対する親和性が低下するが、阻害剤の感受性には明瞭な差があり、前者のみが野生型より阻害効果が著しい。

H249Q変異体では、Gln残基の側鎖が、His残基の側鎖がもつ活性の役割を部分的に果たしているため、活性が少しだけ残ることがわかった。

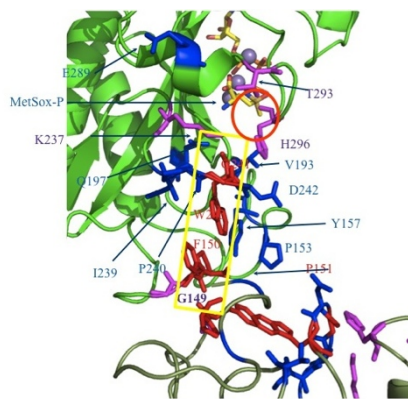


図3 グルタミン合成酵素の10量体形成に重要なF150付近と活性部位の図

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

① トウモロコシ由来グルタミン合成酵素GS1aとGS1d活性の変化の構造学的研究、尾崎健・中川敦史・長谷俊治・小林大千・楠木正巳, 日本結晶学会年会, 北海道大学, 札幌, 2011年11月24-25日

② Distant residues of maize glutamine

synthetase affecting substrate affinity,
M. Kusunoki, T. Ozaki, A. Nakagawa, T. Hase, 国際結晶学会, マドリード, スペイン,
2011年8月27日

③ トウモロコシ由来グルタミン合成酵素
GS1aの変異体G241AとW243Aの結晶構造
解析, 尾崎健・中川敦司・長谷俊治・楠木正
巳, 日本結晶学会, 大阪大学コンベンション
センター, 吹田, 2010年12月4-5日

④ Mutational study of maize glutamine
synthetase (GS1a): Identification of two
distinct sites necessary for high affinity
for glutamate, T. Ozaki, M. Yamada, G.
Estivill, A.J. Márquez, A. Nakagawa, M.
Kusunoki and T. Hase, International
Symposium on the Nitrogen Nutrition of
Plants, 犬山, 日本2010年6月26-30日

⑤ 植物グルタミン合成酵素の基質認識機構
の研究: グルタミン酸への親和性を決定する
活性中心遠位領域の同定, 尾崎健・楠木正
巳・高木淳一・中川敦司・長谷俊治, 日本生
化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2009年
10月21-24日

[その他]

[http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/No2/
/Kusu_Lab/research.html](http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/No2/Kusu_Lab/research.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠木正巳 (KUSUNOKI MASAMI)
山梨大学大学院・大学院医学工学総合研究
部・教授
研究者番号: 90135749

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長谷 俊治 (HASE TOSHIHARU)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 00127276