

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570105
 研究課題名(和文) 高等植物グルタミン合成酵素の構造・機能相関の研究
 研究課題名(英文) Structure and function relationships of higher plant glutamine synthetase
 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：

植物のグルタミン合成酵素(GS)は、細胞質局在型 GS1 とプラスチド局在型 GS2 が存在し、GS1 は多重遺伝子族によりコードされている。

GS1a His249Ala/MetSox-P/ADP, GS1a WT/PPT/AMPPNP の2種類の結晶解析を行った。前者から、His249 の側鎖と基質の水素結合が基質認識に重要な役割を担っていること、後者から PPT のリン酸化前とリン酸化後で酵素側の構造変化が無いことも判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

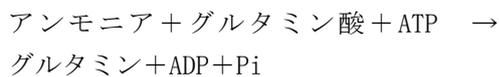
キーワード：X線、結晶、アンモニア同化、植物生理学、構造生物学、グルタミン合成酵素

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。



グルタミン合成酵素は原核生物では、チフス菌、結核菌の結晶構造が決定されているが、真核生物（動物、植物）では、我々のグループが明らかにしたトウモロコシの結晶構造は最初のものである (Unno H., et al., J. Biol. Chem., 281, 29287-29296 (2006))。

原核細胞のグルタミン合成酵素はホモ 12 量体である。真核生物のグルタミン合成酵素はこれまでホモ 8 量体であるといわれていたが、我々の結晶解析でホモ 10 量体であることが明らかになった。

核、真核生物の 12 量体、10 量体という数は、グルタミン合成酵素のアンモニアに対する高い親和性に必須であると推定される。

2. 研究の目的

阻害剤が機能しないグルタミン合成酵素の探索

これまで、トウモロコシのグルタミン合成酵素の 3 種類の複合体 1) リン酸化 MetSox + ADP 2) リン酸化 PPT + ADP 3) AMPPNP + MetSox の結晶構造解析をした。ここで、PPT(ホスヒノスリシン)と MetSox (メチオニンスルフォキシミン) は基質グルタミン酸を mimic する阻害剤で、PPT は広く農薬として使われている。PPT を結合するグルタミン合成酵素のアミノ酸残基の分布から、基質のグルタミン酸を認識する残基を推定し、アラニン置換し、

阻害剤が機能しないグルタミン合成酵素のミュータントを探す。このようなミュータントが見つければ、除草剤が利かないトウモロコシを作りだせる。

3. 研究の方法

1) トウモロコシ グルタミン合成酵素のイソ酵素 GS1a 各種ミュータントの結晶解析

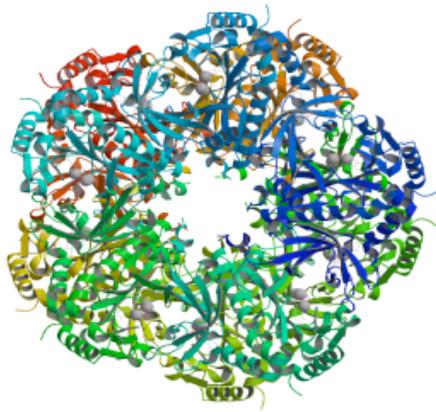
① イソ酵素 GS1a 各種ミュータントの発現、精製、複合体調整、結晶化、X 線回折データ測定、結晶解析をおこなう。

② これまで、E129A, E131A, E192A, H249A, R291A, E297A, R311A, R332A のミュータント作成と酵素活性の測定、結晶化を行った。H249A だけが、原子分解能の結晶解析が可能であった。引き続き、さらに結晶化を行なった。基質以外にも、アンモニアポケットまわりのミュータント作成と結晶化を行なった。

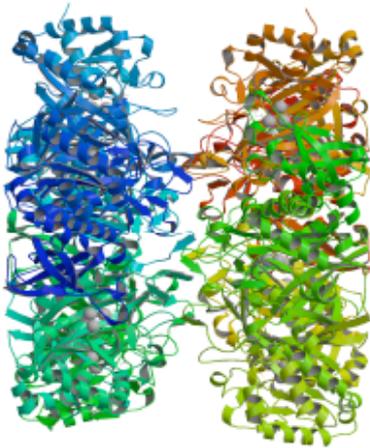
③ 原子分解能の結晶が得られれば、結晶解析を行い、構造と機能の關係の解析を行なった。

4. 研究成果

今回の研究で GS1a His249Ala/MetSox-P/ADP, GS1a WT/PPT/AMPPNP の 2 種類の結晶解析を行った (MetSox, methionine sulfoximine; PPT, phosphinothricin; AMPPNP, adenylymidodiphosphate)。前者の結晶解析により、His249 の側鎖と基質の水素結合が基質認識に重要な役割を担っていることがわかった。後者の結晶解析より PPT のリン酸化前とリン酸化後で酵素側の構造変化が無いことも判明した。まとめると、



(a)



(b)

図1 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。活性部位は5量体のサブユニット間にある。

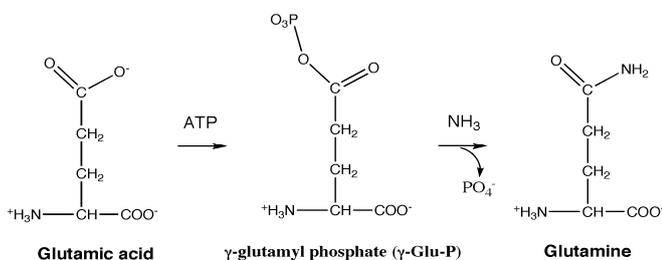


図2 グルタミン合成酵素のリン酸基転移とアンモニア付加反応

- 1) WT/PPT/AMPPNP と H249A/MetSox-P/ADP の結晶構造を得た。
- 2) PPT と MetSox の阻害活性の差がリン酸基転移前の構造から説明ができる。
- 3) PPT との複合体ではリン酸基転移前後で酵素側の構造変化がない。
- 4) H249 側鎖と基質の α -カルボキシル基との水素結合が基質認識の重要な役割を担っていることが説明できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Structural Basis for Substrate Recognition and Hydrolysis by Mouse Carnosinase CN2

Unno, H., Yamashita, H., Ujita, S., Okumura, N., Otani, H., Okumura, A., Nagai, K. and Kusunoki, M

J. Biol. Chem., 283, 27289-27299 (2008) 査読有り

- 2) C-Type Lectin-like Carbohydrate-R recognition of the Hemolytic Lectin CEL-III Containing Ricin-type β -Trefoil Folds,

Hatakeyama, T., Unno, H., Kouzuma, Y., Uchida, T., Eto, S., Hidemura, H., Kato, N., Yonekura, M. and Kusunoki, M.

J. Biol. Chem., 282, 37826-37835 (2007) 査読有り

- 3) Unno, H., Ichimaida, F., Suzuki, H., Takahashi, S., Tanaka, Y., Saito, A., Nishino, T., Kusunoki, M. and Nakayama, T.: Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis, Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, pp. 15182-15822 (2007) 査読有り

〔学会発表〕（計3件）

1) Structural study of enzyme inhibitor complexes of eukaryotic glutamine synthetase from *Zea mays*

Ozaki, T., Unno, H., Hase, T., Kusunoki, M.

国際結晶学会, 大阪, 2008年8月25日
Acta Cryst. (2008). A64, C280

2) 植物グルタミン合成酵素の活性中心構造の改変による基質認識機構の解析

山田雅子, 尾崎健, 楠木正巳, 長谷俊治
第80回日本生化学会、第30回日本分子生物学会 横浜パシフィコ2007年
12月11日-15日

3) トウモロコシ由来のグルタミン合成酵素のH249A変異酵素の構造学的研究

尾崎健・海野英昭・長谷俊治・楠木正巳
日本結晶学会 東京工業大学大岡山キャンパス、2007年12月1日-2日

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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