

Thermus thermophilus 由来アスパラギン酸キナーゼ活性制御サブユニットの結晶構造解析

Crystal structure of the regulatory subunit of aspartate kinase

from *Thermus thermophilus*

吉田彩子¹, 富田武郎¹, 伏信進矢², 葛山智久¹, 西山真¹

Ayako Yoshida¹, Takeo Tomita¹, Shinya Fushinobu², Tomohisa Kuzuyama¹,

Makoto Nishiyama¹

(¹東京大学生物生産工学研究センター, ²東京大学大学院農学生命科学研究科)

(¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo,

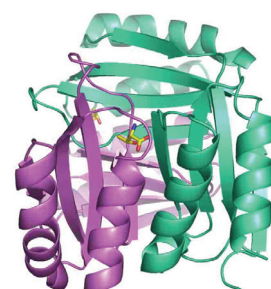
²Department of Biotechnology, The University of Tokyo)

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

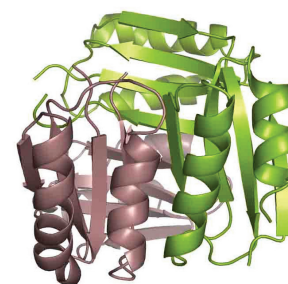
アスパラギン酸キナーゼ(Aspartate Kinase, AK)は、アスパラギン酸ファミリーアミノ酸のリジン、スレオニン、メチオニン生合成の初発酵素であり、ATPを用いてアスパラギン酸をリン酸化し、4-アスパルチルリン酸を生成する反応を触媒する。AKは植物、バクテリアに存在し、生合成経路の最終産物や中間産物によってフィードバック阻害を受けることが知られており、*T. thermophilus*由来AK (TtAK)ではスレオニンによって阻害を受けることが明らかとなっている[1]。TtAKはAKの中でも特徴的な四次構造をとっている[1]。一般にAKは酵素活性の本体である触媒ドメインと活性調節に重要な活性制御ドメインの2つのドメインからなるペプチド鎖によって構成され、それが2つまたは4つ会合したホモオリゴマー構造を持っている。一方、TtAKは上記のペプチド鎖(α サブユニット)に加え、活性制御ドメインのすぐ上流にも翻訳開始点を持つことから、活性制御ドメイン単体のサブユニット(β サブユニット)が合成される。その結果として α サブユニットの後半部分と β サブユニットが全く同じアミノ酸配列を持つこととなり、 α 、 β サブユニットが会合した $\alpha_2\beta_2$ 型のヘテロオリゴマー構造を形成している。このような特徴を持つTtAKの活性制御機構や耐熱化機構を明らかにすることを目的としX線結晶構造解析を行っている。

我々は、TtAKの活性制御を担う β サブユニットの、スレオニン存在下での結晶化に成功し[2]、Se-MAD法により2.15 Å分解能のTtAK-Thr複合体構造を決定した。また、スレオニン非結合構造も決定でき、それらの構造を比較することで活性制御メカニズムについての考察を行った。

また、TtAKと同じ四次構造を持ちながらリジンとスレオニンの共存在下でのみ阻害のかかる*Corynebacterium glutamicum*由来AKの β サブユニット(CgAK β)の1.58 Å分解能の結晶構造も明らかにしている[3]。DSC(示差走査型熱量計)による解析から、CgAK β のT_mは約50°C、TtAK β は約90°Cと大幅な熱安定性の違いがあることが分かった。構造の類似した(r.m.s.d.=1.72 Å)常温菌由来と好熱菌由来の2つの結晶構造を比較することで、それらの熱安定性の違いの要因を検証した。



TtAK β -Thr 複合体構造



TtAK β Thr 非結合型構造

Reference

- [1] M. Nishiyama *et al.*, *Microbiology* **141**, 1211 (1995)
 [2] A. Yoshida *et al.*, *Acta Crystallog. Sect. F*, **63**, 96 (2007)
 [3] A. Yoshida *et al.*, *J. Mol. Biol.* **368**, 521 (2007)