（様式 甲5）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者 氏 名	論 文 審 査 担 当 者
細 野 晃	主 査 教 授 鏡 山 博 行 副 査 教 授 宮 﨑 瑞 夫 副 査 教 授 清 水 章 副 査 教 授 佐 野 浩 一 副 査 教 授 玉 井 浩

主論文題名

Glutamine:phenylpyruvate Aminotransferase from an Extremely Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus* HB8
（高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 に見出されたグルタミン：フェニルピルビン酸アミノ基転移酵素）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

≪研究目的≫

現存する蛋白質について網羅的に立体構造・機能の解析を行い、生命現象を理解しようとする構造ゲノム科学 / プロテオミクスプロジェクトが世界的に進行しているが、一次・高次構造が明らかになっても機能が不明である蛋白質が多く、構造が解明された蛋白質の機能解析を如何に行うかが緊急の課題となっている。申請者は我国におけるタンパク 3000 プロジェクトのモデル生物である高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 において見出された遺伝子 C223RA12 を題材として機能未知蛋白質の機能解析を試みた。

≪方法≫

T. thermophilus HB8 のゲノムより単離した C223RA12 遺伝子を発現ベクターpET-20b (Novagen) に組込み、本ベクターによって大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RP 細胞 (Stratagene) を形質転換し、C223RA12 組換え蛋白質の大量発現系を構築した。蛋白質精製は、陰イオン交換（東ソーTOYOPEARL DEAE-650M）および疎水性（東ソーTOYOPEARL Phenyl-650M）カラムクロマトグラフィーによって行った。電子吸収スペクトルは二光軸分光光度計（日立 U-3300）によって測定し、高速反応の追跡はストップドフロー分光装置 (Applied Photophysics SX.17MV) を用いた。

≪結果≫

C223RA12 遺伝子の推定アミノ酸配列（381 残基）に対して FASTA プログラムによる相同性検索を行った結果、*T. thermophilus* などのアーキアやノンプロテオバクテリア由来アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST, EC 2.6.1.1) に対して約 40% の相同性を有したが、それ以外の種由来の AST とは約 10% の相同性であった。精製 C223RA12 蛋白質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で分子量約 42000 の単一バンドを示した。またゲル濾過クロマトグラフィーにおいて分子量約 82000 の単一ピークを示し、このことからホモ二量体構造を形成することが示唆された。

C223RA12 蛋白質は 280 nm 及び 430 nm に吸収極大を示し、これがピリドキサールリン酸 (PLP) に由来するものであることをフェニルヒドラジン法により確認した。PLP 結合 C223RA12 蛋白質は各種アミノ酸との反応でピリドキサミンリン酸 (PMP) 結合蛋白質に変化し、また PMP 結合蛋白質はケト酸との反応で PLP 結合蛋白質に戻った。このことから本蛋白質はアミノ基転移酵素であることが示された。そこでストップドフロー分光装置を用いて C223RA12 蛋白質と各種アミノ酸及びケト酸との反応を速度論的に解析したところ、C223RA12 蛋白質はキヌレニンを含む芳香族アミノ酸、グルタミン、メチオニンに対して高い反応性を示したが、アラニンやアスパラギン酸、グルタミン酸とは反応しなかった。この基質特異性は、哺乳類由来グルタミン：フェニルピルビン酸アミノ基転移酵素 (GlnATφ, EC 2.6.1.64) と極めてよく似ており、アミノ酸配列において約 30%の相同性を示した。

≪考察および結論≫

以上より、*T. thermophilus* C223RA12 蛋白質は哺乳類 GlnATφ のオルトログであることが判明した。哺乳動物以外で GlnATφ が見出された最初の例である。*T. thermophilus* は芳香族アミノ酸の生合成の最終段階を触媒する芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素（EC 2.6.1.57）を欠如している。*T. thermophilus* GlnATφ はその基質特異性により、*T. thermophilus* において芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素の機能を代替していると考えられる。またポリアミンの合成に伴って消費されたメチオニンの再合成系の最終段階を触媒する機能も考えられる。哺乳類の GlnATφ はキヌレニンを基質としてキヌレン酸を生成する反応を触媒する。キヌレン酸は興奮性シナプスのアンタゴニストであり、神経変性疾患や統合失調症と関連性があることから、GlnATφ は創薬ターゲットとして注目されるが、哺乳類酵素の立体構造解析は困難である。申請者は大阪市立大学のグループとの共同研究により *T. thermophilus* GlnATφ 蛋白質の X 線結晶解析に成功した（Goto et al., *J. Biol. Chem.*, in press)。立体構造が明らかとなった *T. thermophilus* GlnATφ は本酵素に対する阻害剤開発に向けた代替モデルとなることが期待される。

（様式　甲6）

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲　第683号	氏　　名	細　野　晃
論文審査担当者		主査　教授　鏡　山　博　行 副査　教授　宮　﨑　瑞　夫 副査　教授　清　水　章 副査　教授　佐　野　浩　一 副査　教授　玉　井　浩	

主論文題名

Glutamine:phenylpyruvate Aminotransferase from an Extremely Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus* HB8
（高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 に見出されたグルタミン：フェニルピルビン酸アミノ基転移酵素）

論文審査結果の要旨

ポストゲノム時代に於ける生命科学研究の主要な潮流に構造ゲノム科学 / プロテオミクスプロジェクトがある。これはタンパク質の立体構造・機能の解析を網羅的に行うというものであるが、一次・高次構造が明らかになっても機能が不明であるタンパク質も多い。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 に見出された C223RA12 タンパク質もその一つである。申請者はバイオインフォマティクス的手法、分光学的手法さらに遷移相速度論的解析を駆使することで本タンパク質の機能解析に取り組み、本タンパク質が哺乳類由来グルタミン：フェニルピルビン酸アミノ基転移酵素のオルトログであることを明らかにしている。この知見は哺乳類以外の生物で本酵素が見出された最初の例であり、その基質特異性により本酵素の生理的意義として芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素を欠如した生物での代替酵素としての役割、またメチオニンの再合成における役割を提唱している。

本酵素は興奮性シナプスのアンタゴニストであるキヌレン酸の生成反応を触媒する。キヌレン酸はハンチントン病や統合失調症等の脳疾患時に中枢神経細胞に蓄積していることが知られている。哺乳類酵素の立体構造解析は困難であり、解析データは未だ提出されていない。本研究において申請者が同定した *T. thermophilus* 酵素は、立体構造を明らかにしていることもあり、中枢神経疾患に対する創薬研究へ貴重な情報を与えることが期待できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

The Journal of Biochemistry　134(6): 843-851, 2003