生体触媒の機能解析と応用に関する研究[†]

(1996 年度日本農芸化学会功績賞受賞)

小 田 順 一

(京都大学化学研究所)

Key words : glutathione synthetase ; asparagine synthetase ; X-ray crystallography ; three - dimensional structure ; computer analysis

有機化学は元来動植物を構成する炭素化合物を研究の対象とする学問として始まった。しかし現在では、自然科学と言う巨大な科学の中であって、有機化学は有機諸物質の構造と性質並びに、これら物質相互間の反応を研究する学問として著しい変貌を遂げ、今尚目覚ましい進展を続けている。しかしながら、新しい世紀の化学には地球環境保全や省資源、省エネルギーの基盤の上に立つ新しい科学技術とそのための基礎研究が強く望まれている。このような今日の社会的要請に適うためにも、一つには生体や自然界に存在する機能物質に学び、その分子情報を精密に解析し、これを制御する化学、高度に利用する化学、模倣する化学が極めて重要となって来ている。

筆者はこのような観点から、生体の示す精緻な仕組みを理解し、その積極的な利用を図るため、生体反応の多彩な機能を独自に解明しながら、新しい触媒の開発を意図した研究を進めて来た。本総説ではその中の酵素タンパク質のアミノ酸配列及び構造と機能との解析について筆者らの研究を中心に述べる。

周知の如く生体内では酵素によって、温和な条件下で比類のない反応加速性と高度の立体特異性の制御が行われており、有機化学的にも学ぶ所は極めて多い。この魅惑的な特性を理解し活用するためには、言うまでもなくその機能を理解することが不可欠であり、そのためにはその立体構造を原子レベルで知る必要がある。

現在では得られる構造情報を基に生物機能の解明や物理学的諸性質、更には医薬や生物素子の設計を意図した研究、即ち「構造生物学」の研究が益々重要視されている。このことは必然的に解明されるタンパク質の立体構造の数にも級数的な増加をもたらしている。しかし、筆者らが研究を始める以前には、その立体構造が明らかにされた酵素の例は少なく、合成酵素に至っては皆無に近く、構造生物学という言葉も今ほど定着はしていなかった。

こうした状況下に有機合成化学へのフィードバックを念頭に、E 6 群に分類される ATP 依存性合成酵素に焦点を当て、その構造と機能の解明に着手した。また、酵素タンパク質の機能改変、構造モデルの構築への指針、更には分子進化についての情報を得るためコンピューターによるアミノ酸配列の機能解析にも取り組んできた。

I. ATP 依存性合成酵素の構造と機能

EC 6 群に分類される合成酵素は、ATP などのリン酸結合の開裂に共役して2つの分子を結合させる反応を触媒する酵素であり、生合成上重要な酵素が多い。以下にこれら合成酵素のうち X 線結晶解析を中心に行ってきたグルタチオン合成酵素とアスパラギン合成酵素の構造と機能について述べる。

1. グルタチオン合成酵素

(1) 三次元構造 グルタチオン合成酵素 (EC 6.3.2.3), 以下 GSHase は、 γ -Glu-Cys と Gly から、ATP を用いてグルタチオンを合成する酵素である。大腸菌由来の GSHase は、木村ら⁽¹⁾によって遺伝子配列が決定されており、316 アミノ酸残基より成る同一の単量体4分子から構成されている。また、その反応は ATP の γ -位のリン酸が γ -Glu-Cys に転移してできるアシルリン酸中間体に、Gly が求核攻撃することにより進行すると考えられている⁽²⁾(図1)。

[†] Studies on Functional Analysis and Application of Biocatalysts

Jun'ichi Oda (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

図 1 グルタチオン合成酵素の反応スキーム

本酵素について、大腸菌による大量発現と簡便な精製法とを確立⁽³⁾すると共に、結晶化に成功し⁽⁴⁾、そのX線結晶解析により 2.0 Å で 3 次元構造を決定した⁽⁵⁾。そ

の主鎖構造を図 2 A に、そのサブユニットの模式図を図 2 B に示す。その構造から、4 量体は 2 量体が分子の中心で緩やかに接して形成されるため分子内部に大きな溶媒領域を有していること、活性中心はその溶媒領域に面していること、各サブユニットには 3 つのドメイン、即ち N 末、中央、及び C 末ドメインで構成され、基質アナログである γ -Glu-Abu (Abu=aminobutyrate) と ATP の結合部位はそれぞれのドメインの境界面に存在していることが分った。また、特徴的なのは、後述するようにはっきりとした電子密度を与えず、結晶状態でも一定の構造に固定されないフレキシブルなループ構造が基質結合部位の近傍に 2 ヶ所存在したこと (1 B の点線の部) と ATP 結合部位が新規の構造モチーフから構成されていたことである。従来、ATP は、所謂 Rossmannfold⁽⁶⁾ に結合すると言われていたが、GSHase では 2 つの逆平行 β -シートが ATP を挟み込むように配置しており、その近くに 2 つのフレキシブルなループが存在する新しい結合モチーフを有していることが分った。最近では、同様の ATP 結合モチーフはプロテインキナーゼ C⁽⁷⁾、セリン⁽⁸⁾ 及びアスパラギン酸⁽⁹⁾ tRNA 合成酵素など多くの酵素の ATP 結合部位にも見られ、普遍的に存在する ATP 結合フィールドの第 II の

図 2 A: グルタチオン合成酵素の 4 量体分子の結晶構造 (ワイヤーモデルで表示)

B: グルタチオン合成酵素の単量体分子の模式図。図は ADP, 2 つの Mg イオン, 硫酸イオン, グルタチオンの活性中心に結合した状態: 点線は、大小二つのフレキシブルなループを表す。酵素のみの結晶では、この領域は電子密度を与えない。

クラスとして認められている。

(2) フレキシブルループの役割 上述したように 2 個のループ、即ち Ile 226~Arg 242 のポリペプチド鎖から成る大ループと Gly 164~Gly 167 の小ループが柔軟な構造を取り、基質近傍に存在することから、これらのループは本酵素の機能発現にとって重要であることが予測された。

そこで、未変性状態においてアルギニン残基に特異的なペプチダーゼによる限定加水分解を行った所、酵素はループ上の Arg 233 の C 末端側のみで切断され失活したが、酵素全体の構造は保持されていることが示唆され、しかもその切断は基質の添加によって保護されることが判明した⁽¹⁰⁾。また、大ループ上の残基を他の残基で変異させた所、反応速度が著しく低下したことからループの可動性が触媒活性に重要であることが分った⁽¹¹⁾。更に、17 残基のループを 4 残基の Gly で置換したループ欠失型酵素では、活性が 1 万分の 1 に低下したばかりでなく、反応中間体が Gly の代わりに水と反応することにより γ -Glu-Cys 依存性 ATPase 活性を優先的に示すようになった。しかし、この欠失型酵素の結晶構造の解析を行った所、その三次元構造はループ以外の領域では野生型と完全に一致していた⁽¹²⁾。これらの事実はループが酵素の構造維持には無関係であり、他の領域とは独立に動き得る単位であることを示している。それと共に 2 個のループは ATP と γ -Glu-Cys が結合した後、その上から活性部位を覆うことによって、水の侵入を防ぎ、アシルリン酸中間体を加水分解から保護するだけでなく、グリシンへの選択性をも高める役割を担っているものと推論される。同様の中間体を水の攻撃から保護するループの働きは、triose-phosphate isomerase の場合⁽¹³⁾ にも見られたものであるが、合成酵素においても同じ機能を備えていることが始めて認められた。一般に ATP が反応に関与する酵素では、反応中間体が加水分解から逃れる必要が生じるが、その際酵素はエネルギー的に不利な全体の構造を変化させることなく、独立した部分的な構造単位の変化によって対応し得る巧妙な仕掛けを備えていたことになる。この合理的な仕組みの一端は、親和標識剤であるアデノシンテトラホスホピリドキサル(AP_4PL)を用いて検討した所、 AP_4PL が GSHase の Lys 18 残基を特異的に修飾していることが分った⁽¹⁴⁾。また、その標識酵素の X 線結晶解析⁽¹⁵⁾ からループは AP_4PL の

γ -リン酸残基上に被さるように固定されていて、この位置は ATP と γ -Glu-Cys の反応点の真上に相当し、これまでの推察を分子レベルで裏付ける結果が得られた。

(3) 酵素生成物複合体の立体構造 本酵素と生成物 ADP, グルタチオン, リン酸との複合体の結晶構造の精密化を行い、原子レベルでのリガンド結合の相互作用の様子を明らかにした⁽¹⁶⁾ (図 2 B)。その結果、基質認識に関わる重要な残基を同定すると共に、これまで是不分明であった 2 個の Mg イオンも観察され、それらが生成物の安定化に大きく寄与していることが実証された。また、上述した 2 個のフレキシブルなループ構造が生成物を覆っている姿を完全に捉えることができ、ループが触媒反応と基質認識に重要な役割を果たしていることが一層明白となった。

(4) 遷移状態アナログによる阻害活性⁽¹⁷⁾ 反応機構の詳細を知るため図 1 に示した反応の遷移状態に着目し、その安定化アナログとして 4 面体型のリン酸エステルを C 末端側に持ち、グリシン部をプロピオン酸で置き代えたホスフィネート 1 を立体選択的に合成した。定常状態の速度論を用いて阻害活性を調べた所、化合物 1 は ATP の存在下で本酵素に対し著しい阻害活性を示した。その阻害定数 K_i は 21 nM に達し、基質であるグルタミルシステイン (K_m 0.24 mM) の 1 万倍も強力に酵素と結合することが判明した。また、阻害は時間と共に徐々にしかも不可逆的に進行し、しかも ATP の共存下でのみ強力な阻害が起こることから、化合物 1 がそのままの形で酵素を阻害するのではなく、酵素の活性中心内で酵素自信の作用によって、ホスフィネート部分にリン酸化を受け、実際の遷移状態と極めて類似した分子種 2 を生じ、そのものが強力に酵素と結合するため阻害が起こっているものと推定した (図 3)。

このことを実証するために、化合物 1 と ATP の共存下に酵素を結晶化し、得られた複合体結晶を X 線結晶

図 3 グルタチオン合成酵素の遷移状態アナログ阻害剤の作用機構

図 4 活性中心におけるリン酸化された遷移状態アナログの結合様式

解析した所、予測通りホスフィネートがリン酸化された分子種と ADP とが酵素の活性中心に強固に結合している様子が観察された (図 4)。また、その構造から遷移状態においてもフレキシブルな 2 つのループが活性中心を覆う形で固定化されている様子が確認され、ループが不安定な中間体を安定化し、効率よくペプチドカップリングを進行させる酵素の巧妙な仕組みがここでも明確となった。また、相互作用をしている残基を同定することができ、これらの残基の重要性は部位特異的変異による実験結果からも支持された⁽¹⁸⁾。

最近、ADP-forming であり、同様のアシルリン酸中間体を経ることから反応機構的にも類似性を示す D-Alanine : D-Alanine リ ガーゼ⁽¹⁹⁾ や Biotin carboxylase⁽²⁰⁾ などが、それらの間には一次配列上のホモロジーは存在しないにも拘わらず、GSHase と極めて類似した三次元構造を持つことが見いだされた⁽²¹⁾。このことは C-N 結合酵素の進化的な関係を伺い知る上で大変興味ある結果と言えよう。

2. アスパラギン合成酵素

大腸菌由来アスパラギン合成酵素 [EC 6.3.1.1 (AMP-forming)] は、330 アミノ酸残基で構成されるサブユニットの二量体として存在している。同酵素の反応では、 Mg^{2+} 存在下、ATP の AMP と PPI への分解を伴って、L-Asp と NH_3 から L-Asn が合成され、その際、反応中間体として β -Aspartyl-AMP を経由して進行することが判明している⁽²²⁾ (図 5)。しかし活性アミノ酸残基など反応の詳細については不明な点が多い。そこで、本酵素の反応機構及び基質認識機構を明らかにするために X 線結晶構造解析を行った。

図 5 アスパラギン合成酵素の反応スキーム

(1) 3 次元構造 まず野生型の酵素でその結晶化を試みたが、X 線結晶構造解析に適した結晶は得られなかった。そこでサブユニットあたり 2 個存在する Cys を部位特異的変異導入法により Ala に置換した変異型酵素 (C 51 A/C 315 A) を作成⁽²³⁾、結晶化を行った。沈澱剤に硫酸アンモニウムを用いた系で $0.5 \times 0.3 \times 0.05$ mm 程度の板状結晶を得ることができた。結晶学的データを得るために撮影したプレセッション写真から、結晶は単斜系、空間群 $P 2_1$ 、格子定数 $a = 52.9 \text{ \AA}$, $b = 126.2 \text{ \AA}$, $c = 52.8 \text{ \AA}$, $\beta = 105.3^\circ$ と決定できた⁽²⁴⁾。回折強度データは、Rigaku 社製 R-Axis IIc を用いて $2.5 \text{ \AA}$ 分解能まで収集した。構造解析を重原子同型置換法で行うため、重原子誘導体の検索を行った結果、2 種類 ($Sm_2(SO_4)_3$, $K_2Pt(CN)_4$) の重原子誘導体結晶が得られ、 $2.7 \text{ \AA}$ 分解能までの回折強度データを収集した。位相計算及び位相改良をプログラム PHASES を使用して行った所、位相の確からしさを表す平均の Figure of Merit は 0.83 となった。得られた位相より電子密度を計算し、プログラム TURBO を用いてモデルを構築し、プログラム X-PLOR による精密化を行った所、現在、R 値 0.19 のモデルが得られている。電子密度を基に構築した本酵素の 3 次元構造は 6 本鎖の逆平行 β -シートと、11 本の α -ヘリックスから成り立っていることが明らかとなった⁽²⁵⁾ (図 6)。本酵素にはアミノ酸配列上、相同性のある蛋白質は存在しないが、この 3 次元構造は

図 6 アスパラギン合成酵素の単量体の結晶構造の模式図

酵母由来のアスパラギン酸 tRNA 合成酵素 (AspRS) の触媒反応ドメイン⁽²⁶⁾と非常によく似ていた。

(2) 活性中心 アスパラギン合成酵素と AspRS はともに aminoacyl adenylate を中間体とする 2 段階の反応で進行する同じ反応スキームが考えられている。しかしながら、アスパラギン合成酵素と AspRS では、同じアスパラギン酸を基質とするが、ATP と反応するカルボキシル基が、アスパラギン合成酵素では β 位、AspRS では α 位が反応するという点で異なっている。しかし、これら 2 つの合成酵素の立体構造が極めて類似していたことから、その 3 次元構造を重ね合わせ、一次配列を比較した所、AspRS で活性に必須であるとされている残基がアスパラギン酸合成酵素においても良く保存されていることが判明した。このことは、アスパラギン酸合成酵素が基質や反応機構の似ている AspRS を巧みに利用し、必要な残基を保持したまま進化して来たことを示唆している。

そこで、それらの残基の重要性を実証するために、AMP と L-Asn を浸漬させた複合体結晶の解析強度データを収集し、差フーリエ法により L-Asn と AMP の位置を決定した。この位置より、同定された反応に関わるアミノ酸残基は、アスパラギン酸 tRNA 合成酵素の活性アミノ酸残基とほとんど同じであり、Asn の認識には K 77, E 120, R 225 によるネットワークが、AMP の認識には R 100 が重要な役割を果たしていることが確かめられた。また、基質アスパラギン酸の β -位

図 7 生成物アスパラギン、AMP 近傍の結合様式

のカルボキシル基が ATP の α 位のリン原子の近くに配向していること、Mg イオンが生成物の安定性に寄与している様子が捉えられた (図 7)⁽²⁷⁾。

これらの結果は、酵素はある反応機構を行うための骨格構造が既に用意されていて、基質特異性を至適化しながら進化するという考えを示唆することから、酵素の立体構造構築原理を考える上で重要な知見を提供するものである。

II. 酵素機能の進化的関係に関する研究

タンパク質の分子進化は、種分化と機能分化の二つに大別できる。種分化とは異なる生物種間で共通な機能を有するタンパク質の進化であり、機能分化とはタンパク質が新しい機能を獲得するに至る進化である。なかでも、機能分化の過程を解析することは、現在の代謝経路がどのようにして創りだされてきたかを明らかにすることであり、そこから得られる知見は代謝の制御などを知る上で非常に有用と考えられる。通常、機能分化の過程は、異なる機能を有したタンパク質の構造あるいは配列間に見られる類似性により明らかにされる。そこで、いくつかの酵素の間では化合物 (リガンド) の認識能を保持したまま新しい触媒活性を獲得することで機能的に分化したと考えられる例が見られることから、共通のリガンドを認識する酵素間でその配列を詳細に比較することで、機能分化についての新たな知見が演繹的に得られるものと推論した。しかし、酵素の機能とアミノ酸配列や立体構造との関係を網羅的に調べる方法はこれまでの所いまだ確立されていない。そこで、まず機能分化の過程を明らかにすること

を目的として、各酵素のアミノ酸配列とその認識するリガンドとを対応づけたデータベースの構築を行った。さらに、このデータベースから得られる共通の機能を有するアミノ酸配列グループから、進化的に有意であると考えられるアミノ酸配列モチーフを抽出する方法を開発した。

1. Ligand Chemical Database の構築⁽²⁸⁾

Ligand Chemical Database は、各酵素のアミノ酸配列あるいは立体構造とその酵素が基質や阻害剤として認識する化合物とを対応づけたデータベースである。このデータベースには、これまでに IUBMB(International Union of Biochemistry and Molecular Biology)⁽²⁹⁾ により分類されている酵素がすべて含まれており、その総数は 3,490 種(Release 13.3; March 1996) にのぼる。データベースの各エントリーはそれぞれひとつの EC 番号に対応している(図 8)。まず、EC 番号があり、酵素名がつづく。CLASS の欄には EC 番号の上位 3 つの数値があらわしている酵素のクラスが記述してある。例えば、酸化還元酵素は、EC 番号の最初の数値の 1 と対応している。以下、系統名、代表的な反応式、反応に関与する化合物、コメント、この酵素が関与するヒトの遺伝病の記述があり、最後に配列データベースや立体構造データベースへのリンクがある。このリンクを辿ることで、実際のアミノ酸配列を得ること、また、立体構造が既知の場合にはその三次元座標の情報を得ることが可能である。

現在も当研究所の金久實教授の研究室との共同研究によりデータベースの更新が行われており、インターネットを通じて一般に公開されている(<http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.html>)。

2. モチーフ抽出プログラムの開発⁽³⁰⁾

非常に遠縁なアミノ酸配列であっても、局所的な共通配列パターンが認められる場合がある。これらのパターンは、酵素の活性部位などの機能的な重要性から保存されていると考えられる。このような局所的な共通配列パターンを一般にモチーフと呼ぶ。例えば、アミノアシル tRNA 合成酵素(クラス 1)に見られる H-I-G-H 配列や、ホスホグリセリン酸キナーゼに見られる N-G-P-X-G-x-F-E といった配列である。あるアミノ酸配列についてこれまでに知られているモチーフの有無を検索することは、配列データベースに対するホモロジー検索とならび、類縁タンパク質の検索や機能の推定の有力な手段となり得る。そのため、様々なタンパク質についてのモチーフを集めたデータベースも存在する^(31,32)。

一般にモチーフは、類縁タンパク質のアミノ酸配列のマルチプルアライメントから局所的に保存されているパターンとして得られる。しかし、マルチプルアライメントを作成するのが困難なほど全体の配列類似性が低いものの間にも、モチーフが認められる場合がある。そのため、あるアミノ酸配列グループについて、配列全域にわたるマルチプルアライメントを行うことな

ENTRY	EC 2.7.1.30
NAME	Glycerol kinase
CLASS	Transferases
	Transferring phosphorus-containing groups
	Phosphotransferases with an alcohol group as acceptor
SYSNAME	ATP:glycerol 3-phosphotransferase
REACTION	ATP + Glycerol = ADP + sn-Glycerol 3-phosphate
SUBSTRATE	ATP
	UTP
	Glycerol
	L-Glyceraldehyde
	Glycerone
PRODUCT	ADP
	sn-Glycerol 3-phosphate
COMMENT	Glycerone and L-glyceraldehyde can act as acceptors; UTP (and, in the case of the yeast enzyme, ITP and GTP) can act as donors.
DISEASE	MIM: 307030 Glycerol kinase deficiency
PATHWAY	MAP00051: Fructose and mannose metabolism
DBLINKS	University of Geneva ENZYME DATA BANK: 2.7.1.30
	PDB: 1GLA 1GLB 1GLC 1GLD 1GLE
	PIR: B42157 B45868 KIECGL PQ0058 S02067 S04595 S33907
	S36175 S40869

図 8 Ligand Chemical Database

		bbbbbb	bbbbbb			aaaaaaaaaaaaaaaa
				↓		
cAPK	181	IQVTDFGFAKRVKG--RTWTL-----CGTP-EYLAPEIILSKGYNKAVIDWALGVLIYEMAA-GYPFFF				
cGPK	497	AKLVDFGFAKKIGFGKKTWTF-----CGTP-EYVAPEIILNKGHDISADYWSLGILMYELLT-GSPFFS				
hck	372	CKIADFGLARIIED---NEYTAREGAK-FPIKWTAPAEAINFGSFTIKSDVWSFGILLMEIVTYGRIPYP				
src	400	CKVADFGLARLIED---NEYTARQGA-K-FPIKWTAPAEALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTKGRVPYP				
lck	378	CKIADFGLARLIED---NEYTAREGAK-FPIKWTAPAEAINYGTFTIKSDVWSFGILLTEIVTHGRIPYP				
fes/fps	695	LKISDFGMSREEAD---GIYAASGGLRQVPVKWTAPAEALNYGRYSSES DVWSFGILLWETFSLGASPYP				
AC1	375	EMGLDMIDTITSV---AEATEVDLNMN-VGLHTGRVLCGVLGLRKWQYDVWSNDVTLANVMEAGLPKG				
AC2	359	KMGLDMCEAIKKV---RDATGVDINMR-VGVHSGNVLCGVIGLQKWQYDVWSHDVTLANHMEAGVPGR				
AC3	389	LMGLAMVEAISYV---REKTKTGVDNR-VGVHTGTVLGGVLGQKRWQYDVWSTDVTVANKMEAGGIPGR				
AC4	343	RMGLDMCRAIRKL---RVATGVDINMR-VGVHSGSVLCGVIGLQKWQYDVWSHDVTLANHMEAGVPGR				
AC5	447	EMGVDMIEAISLV---REVTGVNVNMR-VGIHSGRVHCGVLGLRKWQFDVWSNDVTLANHMEAGG-GRR				
AC6	447	EMGVDMIEAISLV---REVTGVNVNMR-VGIHSGRVHCGVLGLRKWQFDVWSNDVTLANHMEAGG-AGR				
AC8	481	EMGLSMIKTIRFV---RSRTKHDVDMR-IGIHSGLVLCGVIGLGLRKWQFDVWSNDVDIANKLESOGIPGR				
CaAC	345	EMGLDMIDAIATV---VEATDVILNMR-VGIHTGRVLCGVLGLRKWQFDVWSNDVTLANHMEAGGEPGR				

図9 プロテインキナーゼ（上段）とアデニル酸シクラーゼ（下段）との間に見つかった類似性をもった領域。酵素名の後の数値はアライメント中の最初のアミノ酸残基の残基番号を表す。プロテインキナーゼの立体構造における α -ヘリックス（a）、 β -ストランド（b）をアライメントの上に示した。また、プロテインキナーゼの配列中でリン酸化を受ける部位を矢印（↓）で示した。両方の酵素で類似したアミノ酸部位は太字で示した。

く局所的な共通パターンを抽出する方法がいくつか考案されている^(33,34)。ところが、実際のモチーフには挿入・欠失がしばしば見られるにもかかわらず、これまでに考案されたプログラムは、それらを扱うことはできなかった。そこでわれわれは挿入・欠失も考慮したモチーフ抽出プログラム GAPE (Gap Allowing Pattern Explorer) を開発した⁽³⁰⁾。このプログラムはユーザーが指定した任意のアミノ酸配列グループに対し、挿入・欠失を考慮したモチーフ抽出が可能である（ほぼ同時に Jonassen らも挿入・欠失を考慮したアルゴリズムを考案している⁽³⁵⁾）。また、得られたモチーフについて、そのパターンが統計的にどのくらい有為なものであるかを計算し、モチーフとあわせて出力するようになっている。

先に述べた Ligand Chemical Database を用い、いくつかの共通基質を認識する酵素のアミノ酸配列グループに対し GAPE を適用し、モチーフの探索を行った。その結果、テトラヒドロ葉酸関連酵素のアミノ酸配列グループから H-X-S-L-L-P-X3-G-X10-G というパターンが統計的に有為なものとして保存されていた。このパターンを持つアミノ酸配列を配列データベースから検索したところ、10本の配列が得られた。そのうちの9本はテトラヒドロ葉酸関連酵素のものであり、残りの1本は機能が未知の酵母ゲノムの配列であった。このモチーフが共通して見られることから、この酵母ゲ

ノムの配列もテトラヒドロ葉酸の認識に関与するものであることが示唆された。また、シグナル伝達に関与する酵素であるプロテインキナーゼとアデニル酸シクラーゼの間に進化的関係を示すモチーフが存在することを見出した。プロテインキナーゼにおいて、このモチーフは酵素活性を制御するリン酸化部位近傍に存在する。モチーフを基にアライメントを作成した場合、アデニル酸シクラーゼにおいても対応する部位にリン酸化の候補となるトレオニン残基が保存されていることから、リン酸化を受けるサイトである可能性が高いと考えられる（図9）。

本研究は京都大学化学研究所生体分子機能研究部門の多数の共同研究者の協力によって行われたものである。また、一部は他の国内外の共同研究者による成果であります。ご協力戴いた共同研究者の方々並びに共同研究者の勝部幸輝大阪大学名誉教授、木村光京都大学教授とその研究室の方々に厚く御礼を申し上げます。また、井上雄三京都大学名誉教授を始め終始御指導、御鞭撻を賜りました多くの諸先生、諸先輩方にこの場を借りて深甚の謝意を表します。

- (1) H. Gushima, S. Yasuda, E. Soeda, M. Yokota, M. Kondo, and A. Kimura: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 9299 (1984).
- (2) A. Meister: *Methods Enzymol.*, **113**, 393 (1985).

- (3) H. Kato, M. Kobayashi, K. Murata, T. Nishioka, and J. Oda : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3071 (1989).
- (4) H. Kato, H. Yamaguchi, Y. Hata, T. Nishioka, Y. Katsube, and J. Oda : *J. Mol. Biol.*, **209**, 503 (1989).
- (5) H. Yamaguchi, H. Kato, Y. Hata, T. Nishioka, A. Kimura, J. Oda, and Y. Katsube : *J. Mol. Biol.*, **229**, 1083 (1993).
- (6) M. G. Rossmann, A. Liljas, C.-I. Brändén, L. J. Banaszak : in *The Enzymes* (ed. P. D. Boyer), Vol. II, 61, *Academic Press, New York* (1975).
- (7) D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, and J. M. Sowadski : *Science*, **253**, 407 (1991).
- (8) S. Cusack, C. B. Berthet-Colominas, M. Härtlein, N. Nassar, and R. Leberman : *Nature (London)*, **347**, 249 (1990).
- (9) M. Ruff, S. Krishnaswamy, M. Boeglin, A. Poterszman, A. Mitschler, A. Podjarny, B. Rees, J. C. Thierry, and D. Moras : *Science*, **252**, 1682 (1991).
- (10) T. Tanaka, H. Kato, T. Nishioka, and J. Oda : *Biochemistry*, **31**, 2259 (1992).
- (11) T. Tanaka, H. Yamaguchi, H. Kato, T. Nishioka, Y. Katsube, and J. Oda : *Biochemistry*, **32**, 12398 (1993).
- (12) H. Kato, T. Tanaka, H. Yamaguchi, T. Hara, T. Nishioka, Y. Katsube, and J. Oda : *Biochemistry*, **33**, 4995 (1994).
- (13) E. Lolis, T. Alben, R.C. Davenport, D. Rose, F. C. Hartman, and G. A. Petsko : *Biochemistry*, **29**, 6609 (1990); E. Lolis, and G. A. Petsko : *Biochemistry*, **29**, 6619 (1990); D. Joseph, G. A. Petsko, and M. Karplus : *Science*, **249**, 1425 (1990).
- (14) T. Hibi, H. Kato, T. Nishioka, J. Oda, H. Yamaguchi, Y. Katsube, K. Tanizawa, and T. Fukui : *Biochemistry*, **32**, 1548 (1993).
- (15) T. Hibi, T. Nishioka, H. Kato, K. Tanizawa, T. Fukui, Y. Katsube, and J. Oda : *Nature Structural Biology*, **3**, 16 (1996).
- (16) T. Hara, H. Kato, Y. Katsube, and J. Oda : *Biochemistry*, in press.
- (17) J. Hiratake, H. Kato, and J. Oda : *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 12059 (1994).
- (18) T. Hara, T. Tanaka, H. Kato, T. Nishioka, and J. Oda : *Protein Engng.*, **8**, 711 (1995).
- (19) C. Fan, P.C. Moews, C.T. Walsh, and J. R. Knox : *Science*, **266**, 439 (1994).
- (20) G. L. Waldrop, I. Rayment, and H. M. Holden : *Biochemistry*, **33**, 10249 (1994).
- (21) P. J. Artymiuk, A. R. Poirrette, D. W. Rice, and P. Willett : *Nature Structural Biology*, **3**, 128 (1996).
- (22) S. K. Hinchman, S. Henikoff, and S. M. Schuster : *J. Biol. Chem.*, **267**, 144 (1992).
- (23) A. Sugiyama, H. Kato, T. Nishioka, and J. Oda : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 376 (1992).
- (24) T. Nakatsu, H. Kato, and J. Oda : *Acta Crystallogr.*, **D 52**, 604 (1996).
- (25) 中津 亨, 加藤博章, 小田順一 : 日本農芸化学会 1995 年度大会講演要旨, 89 (1995).
- (26) J. Cavarelli, G. Eriani, B. Rees, M. Ruff, M. Boeglin, A. Mitschler, F. Martin, J. Gangloff, J.-C. Thierry, and D. Moras : *The EMBO. J.*, **13**, 327 (1994).
- (27) 中津 亨, 加藤博章, 小田順一 : 日本農芸化学会 1996 年度大会講演要旨, 160 (1996).
- (28) M. Suyama, A. Ogiwara, T. Nishioka, and J. Oda : *Comput. Appl. Biosci.*, **9**, 9 (1993).
- (29) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology : "Enzyme Nomenclature : Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (Academic Press, San Diego), (1992).
- (30) M. Suyama, T. Nishioka, and J. Oda : *Protein Engng.*, **8**, 1075 (1995).
- (31) A. Bairoch and P. Bucher : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3583 (1994).
- (32) A. Ogiwara, I. Uchiyama, Y. Seto, and M. Kanehisa : *Protein Engng.*, **5**, 479 (1992).
- (33) H. O. Smith, T. M. Annau, and S. Chandrasegaran : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 826 (1990).
- (34) A. F. Neuwald and P. Green : *J. Mol. Biol.*, **239**, 698 (1994).
- (35) I. Jonassen, J. F. Collins, and D. G. Higgins : *Protein Sci.*, **4**, 1587 (1995).