

クライオ電子顕微鏡による
グルタミン酸脱水素酵素機能発現時の
過渡的準安定構造解明

2024 年度

若林 大貴

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	若林 大貴
主 論 文 題 名 :				
クライオ電子顕微鏡によるグルタミン酸脱水素酵素機能発現時の過渡的準安定構造解明				
(内容の要旨)				
全ての生物は共通構造として細胞をもち、その中では様々な生体分子が協奏して機能することで、生命維持に関わるあらゆる素過程を支えている。従って、生体分子の機能発現機序の解明は、生命現象理解のために不可欠であり、生体分子の構造観察はその一助となる。生体分子の一種である酵素蛋白質は、基質分子や補酵素分子などのリガンドと構造内の活性サイトで特異的に結合し、構造変化を伴って酵素反応に最適な反応場を提供する。これにより基質分子を生成物へ変換する化学反応を触媒し、生体内の重要な機能に関わる。しかしながら、この機能発現過程において、リガンド結合と酵素の構造変化の相関や、酵素活性サイトへのリガンド結合過程は未だに不明な点が多く、直接観察した例は極めて少ない。 本研究では、酵素蛋白質の機能発現中動態およびそのリガンド結合との相関を解明することを目的とし、柔軟な構造変化を示す超高度好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) を対象とした構造解析を行った。酵素蛋白質 GDH は、同一のサブユニットが会合した六量体が機能単位である。水溶液中ではサブユニットを構成する一つのドメインが、89 番目トリプトファン側鎖の構造や水和水分子脱吸着と連動して大きく運動することが知られている。本研究で用いたクライオ電子顕微鏡による単粒子解析法は、大量の観察像から水溶液中に近い準安定構造を弁別可能である。これを X 線小角散乱測定で得られる溶液中の動態情報や X 線結晶構造解析から得られる高分解能な蛋白質水和構造を相補的に参照しながら用い、 (i) 酵素反応初期段階および定常段階、 (ii) 補酵素共存条件、 (iii) 89 番目トリプトファン残基のフェニルアラニン変異体の酵素反応定常段階 について GDH の構造解析を行った。反応中の GDH 構造解析では、機能発現中の準安定構造が同定されるとともに、反応段階に依存して、とりうる準安定構造数や反応経路が変化することが示唆された。補酵素共存下 GDH では、ドメイン運動がリガンド非結合時や反応中よりも狭い範囲に制限されており、特定の構造に対して補酵素が三つの準安定結合モードを経由しながら活性サイトへ進入する結合経路が同定された。変異体構造解析からは、トリプトファン残基周辺のアミノ酸側鎖配置および水和構造がドメイン運動を制御し、酵素活性へ間接的に大きく寄与することが示唆された。 以上の研究から、GDH についてリガンドの結合を含む機能発現に係る構造変化を統合的に理解することができた。この結果は、蛋白質の作用機序解明のために、作動中の構造解析が重要である一例であり、他の蛋白質への応用が期待される。				

No.

Registration Number	☒ "KOU" ☐ "OTSU"	Name	Taiki Wakabayashi
No.	*Office use only		
Thesis Title Structural study on transient metastable conformations appearing in the enzymatic reaction of glutamate dehydrogenase using cryogenic transmission electron microscopy			
Thesis Summary All living things comprise the cells, in which various biological macromolecules play essential roles in fundamental life processes. To understand how life is maintained, it is necessary to elucidate the mechanisms of macromolecular functions, with structural analysis providing a valuable approach to unravel the mechanisms. Of macromolecules, enzymes act as biological catalysts to facilitate chemical reactions necessary in life. In the catalytic process, enzymes incorporate ligand molecules, such as substrates and coenzymes, into their active sites and change their structures to optimize the coordinates of amino acid residues surrounding the substrates for the reaction. The substrates are then transformed into products essential for the biological processes in living cells. Although enzymes are involved in many aspects of life phenomena, the process in the ligand binding and structural changes remains to be fully elucidated. In this study, to investigate the structural dynamics of enzymatic reactions, such as the ligand binding and structural changes, I carried out cryogenic electron microscopy (cryoEM) studies on glutamate dehydrogenase (GDH) from a hyperthermophilic archaea. GDH is a hexamer composed of six identical subunits. Each subunit folds into a core domain for hexamer formation and an NAD domain for binding coenzymes. An active-site cleft harbors between the two domains. In solution, unliganded GDH exhibits an NAD-domain motion involving association/dissociation of hydration water molecules and conformational changes of Trp89 sidechain. CryoEM using single-particle analysis enables us to detect of metastable conformations in solution by applying the focused classification protocol to a large number of particle images. Therefore, using this approach combined with X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering, I studied the structures of wild-type GDH (i) during both the initial and steady stages of the reaction, (ii) in the presence of the coenzyme NADP. In addition, to understand the role of Trp89 in enzymatic reaction, I also studied (iii) the Trp89Phe-mutated GDH during the steady stage of the reaction. For the wild-type GDH in action, I succeeded to identify metastable structures adopted in the enzymatic reaction, which were not accounted in the enzyme kinetic theory, and proposed stage-dependent reaction pathways in concert with the variety of the metastable states. In the presence of NADP, the conformation of GDH was restricted to a specific metastable conformation of an unliganded GDH and NADP molecules entered the active site through sub-binding sites. The study on the mutated GDH suggested that amino acid residues around Trp89 and hydration structures controlled the NAD-domain motion and contributed to enzyme activity indirectly but significantly. This research provided a comprehensive understanding of the structural changes and ligand-binding events related to the enzymatic functions of GDH. The results demonstrated the effectiveness of cryoEM study for revealing the mechanisms of protein functions by capturing their metastable structures in action. This method could be applied to other proteins as well.			