

1 目的

タンパク質の立体構造を表示し、動かす方法について学ぶ。さらに、課題を通してタンパク質の構造と機能の関係について考える。

2 実験操作

2.1 使用ソフト

UCSF Chimera

2.2 操作

- ①UCSF Chimera というソフトを用いて、4つの酵素(EcPurT, GkPurM, TtThiL, EcPurK)の立体構造を表示した。
- ②酵素の立体構造を回転・移動させて大きさと向きを調整し、立体構造の似ている酵素ペアを探した。
- ③NCBI のタンパク質ベース検索機能を利用して、それぞれの酵素の情報を取得した。
- ④DBGET Search-COMPOUND で、化合物の構造に関する情報を取得した。

3 実験結果

ソフトにてそれぞれのタンパク質の立体構造を表示・比較した結果、構造の特徴より、GkPurM と TtThiL、EcPurT と EcPurK が似ている酵素ペアであると判断した。以下にその画像を添付した。

また、それぞれの酵素について、NCBI のタンパク質データベースの検索機能により取得した酵素反応の情報を、(1)～(4)に示した。

酵素反応についての記述は赤色、類似構造についての記述は緑色にしてある。

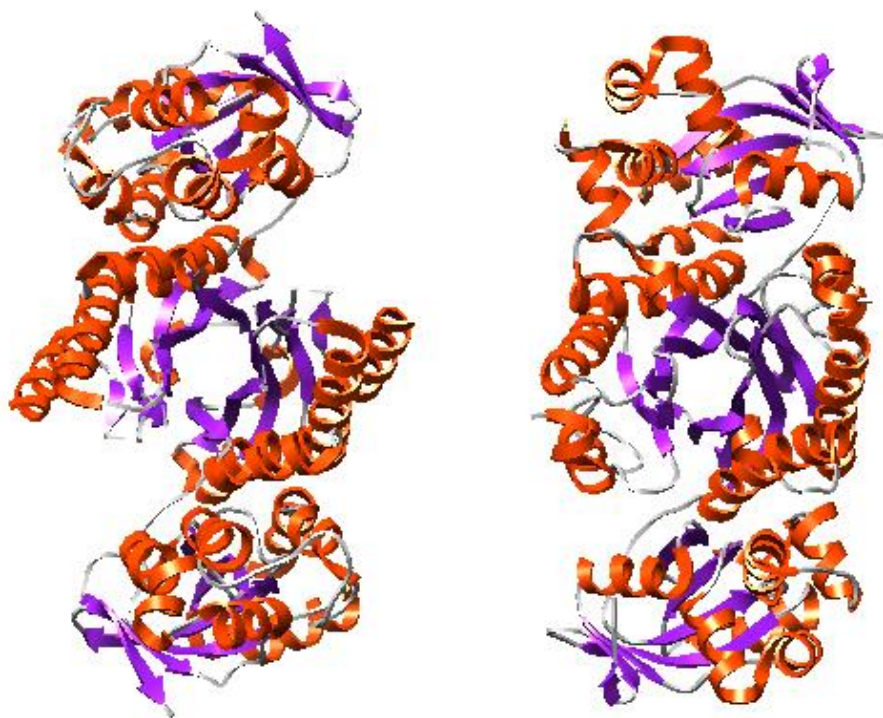


図 1. 酵素 GkPurM(2Z01) と TtThiL(2YXZ) の立体構造

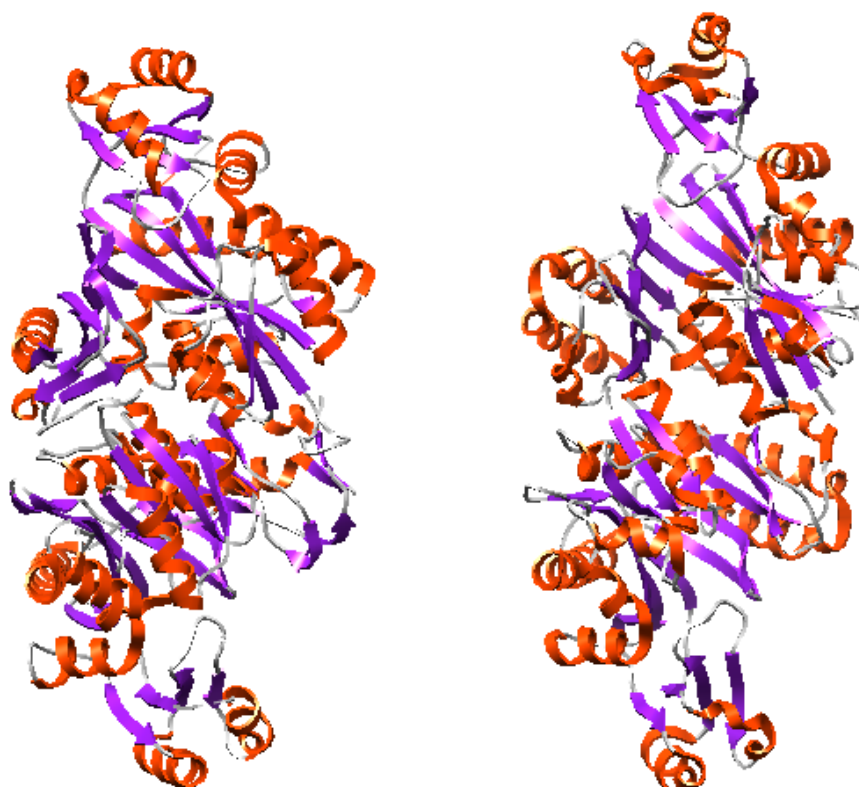


図 2. 酵素 EcPurT(1KJ8) と EcPurK(3ETH) の立体構造

(1) EcPurT (1KJ8)

<LOCUS>

PURT_ECOLI 392 aa linear BCT 05-DEC-2018

<DEFINITION>

RecName: Full=Formate-dependent phosphoribosylglycinamide formyltransferase; AltName: Full=5'-phosphoribosylglycinamide transformylase 2; AltName: Full=Formate-dependent GAR transformylase; AltName: Full=GAR transformylase 2; Short=GART 2; AltName: Full=Non-folate glycinamide ribonucleotide transformylase; AltName: Full=Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2.

<ACCESSION>

P33221

<COMMENT>

On Apr 26, 2005 this sequence version replaced gi:2118243.

[FUNCTION]

Involved in the de novo purine biosynthesis. Catalyzes the transfer of formate to 5-phospho-ribosyl-glycinamide (GAR), producing 5-phospho-ribosyl-N-formylglycinamide (FGAR). Formate is provided by PurU via hydrolysis of 10-formyl-tetrahydrofolate. PurT is also able to cleave acetyl phosphate and carbamoyl phosphate to produce ATP with acetate and carbamate, respectively.

{ECO:0000269|PubMed:8117714, ECO:0000269|PubMed:9184151}.

[CATALYTIC ACTIVITY]

Reaction=ATP + formate + N(1)-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide = ADP + H(+) + N(2)-formyl-N(1)-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide + phosphate;

Xref=Rhea:RHEA:24829, ChEBI:CHEBI:15378, ChEBI:CHEBI:15740,

ChEBI:CHEBI:30616, ChEBI:CHEBI:43474, ChEBI:CHEBI:58426,

ChEBI:CHEBI:58457, ChEBI:CHEBI:456216;

Evidence={ECO:0000269|PubMed:8117714, ECO:0000269|PubMed:9184151}.

[BIOPHYSICOCHEMICAL PROPERTIES]

Kinetic parameters: KM=10.1 uM for GAR (at pH 8)

{ECO:0000269|PubMed:8117714, ECO:0000269|PubMed:9184151}; KM=45 uM for

ATP (with formate) {ECO:0000269|PubMed:9184151}; KM=77.4 uM for ATP (with acetate at pH 8) {ECO:0000269|PubMed:8117714, ECO:0000269|PubMed:9184151};

KM=319 uM for formate (at pH 8) {ECO:0000269|PubMed:8117714,

ECO:0000269|PubMed:9184151}; KM=3.68 mM for acetate (at pH

8){ECO:0000269|PubMed:8117714}; Note=Kcat is 37.6 sec(-1) for transformylase activity (at pH 8). Kcat is 0.309 sec(-1) for acetate kinase activity (at pH 8).

{ECO:0000269|PubMed:8117714}.

[PATHWAY]

Purine metabolism; IMP biosynthesis via de novo pathway;

N(2)-formyl-N(1)-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide from

(1)-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide (formate route): step 1/1.

CO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01643, ECO:0000305|PubMed:8117714,

ECO:0000305|PubMed:9184151}.

[SUBUNIT]

Homodimer. {ECO:0000269|PubMed:10913290,ECO:0000269|PubMed:11953435,

ECO:0000305|PubMed:8117714}.

[INTERACTION]

P22939:ispA; NbExp=4; IntAct=EBI-553029, EBI-553011.

[SIMILARITY]

Belongs to the PurK/PurT family.{ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01643}.

(2) 2Z01 (GkPurM)

<LOCUS>

PUR5_GEOKA 346 aa linear BCT 25-OCT-2017

<DEFINITION>

RecName: Full=Phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase; AltName: Full=AIR synthase; AltName: Full=AIRS; AltName: Full=Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase.

<ACCESSION>

Q5L3D0

<COMMENT>

[CATALYTIC ACTIVITY]

ATP + 2-(formamido)-N(1)-(5-phospho-D-ribosyl)acetamidine = ADP + phosphate + 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00741}.

[PATHWAY]

Purine metabolism; IMP biosynthesis via de novo pathway; 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole from N(2)-formyl-N(1)-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide: step 2/2.

{ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00741}.

[SUBCELLULAR LOCATION]

Cytoplasm {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00741}.

[SIMILARITY]

Belongs to the AIR synthase family. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00741}.

(3) 2YXZ (TtThiL)

<LOCUS>

THIL_ECOLI 325 aa linear BCT 25-OCT-2017

<DEFINITION>

RecName: Full=Thiamine-monophosphate kinase; Short=TMP kinase; Short=Thiamine-phosphate kinase.

<ACCESSION>

P0AGG0

<COMMENT>

[FUNCTION]

Catalyzes the ATP-dependent phosphorylation of thiamine-monophosphate (TMP) to form thiamine-pyrophosphate (TPP), the active form of vitamin B1. Cannot use thiamine as substrate. Is highly specific for ATP as phosphate donor. {ECO:0000269|PubMed:4567662, ECO:0000269|PubMed:6284709}.

[CATALYTIC ACTIVITY]

ATP + thiamine phosphate = ADP + thiamine diphosphate.

{ECO:0000269|PubMed:4567662}.

[ENZYME REGULATION]

Is markedly activated by the monovalent cations K(+), NH₄(+), and Rb(+). Is significantly inhibited by ADP, AMP, p-chloromercuribenzoate, N-ethylmaleimide, pyrophosphate, and EDTA. {ECO:0000269|PubMed:4567662}.

[BIOPHYSICOCHEMICAL PROPERTIES]

Kinetic parameters: KM=1.1 uM for thiamine-monophosphate {ECO:0000269|PubMed:4567662}; KM=270 uM for ATP {ECO:0000269|PubMed:4567662}; pH dependence: Optimum pH is about 8.0. {ECO:0000269|PubMed:4567662}.

[PATHWAY]

Cofactor biosynthesis; thiamine diphosphate biosynthesis; thiamine diphosphate from thiamine phosphate: step 1/1.

[MISCELLANEOUS]

Reaction mechanism of ThiL seems to utilize a direct, inline transfer of the gamma-phosphate of ATP to TMP rather than a phosphorylated enzyme intermediate. {ECO:0000250}.

[SIMILARITY]

Belongs to the thiamine-monophosphate kinase family. {ECO:0000305}.

(4) 3ETH (EcPurK)

<LOCUS>

PURK_ECOLI 355 aa linear BCT 22-NOV-2017

<DEFINITION>

RecName: Full=N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase; Short=N5-CAIR synthase; AltName: Full=5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide synthetase.

<ACCESSION>

P09029

<COMMENT>

On or before Jun 21, 2005 this sequence version replaced gi:67999, gi:131645.

[FUNCTION]

Catalyzes the ATP-dependent conversion of 5-aminoimidazole ribonucleotide (AIR) and HCO(3)(-) to N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide (N5-CAIR). {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01928, ECO:0000269|PubMed:8117684}.

[CATALYTIC ACTIVITY]

ATP + 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole + HCO(3)(-) = ADP + phosphate + 5-carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole.

{ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01928, ECO:0000269|PubMed:8117684}.

[PATHWAY]

Purine metabolism; IMP biosynthesis via de novo pathway; 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxylate from 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole (N5-CAIR route): step 1/2. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01928, ECO:0000269|PubMed:8117684}.

[SUBUNIT]

Homodimer. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01928, ECO:0000269|PubMed:10569930, ECO:0000269|PubMed:19053251}.

[SIMILARITY]

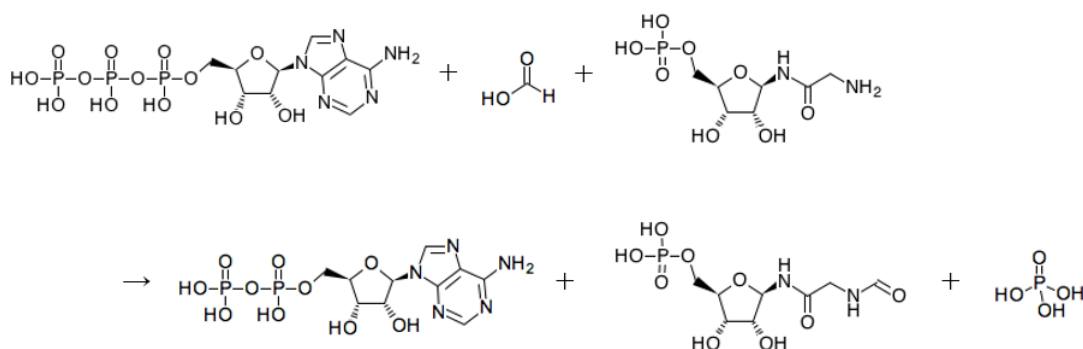
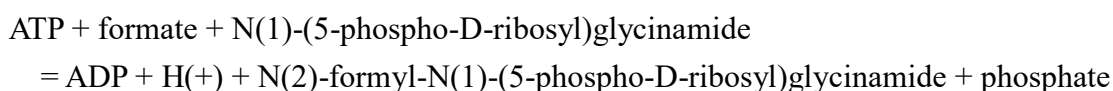
Belongs to the PurK/PurT family. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_01928, ECO:0000305}.

[CAUTION]

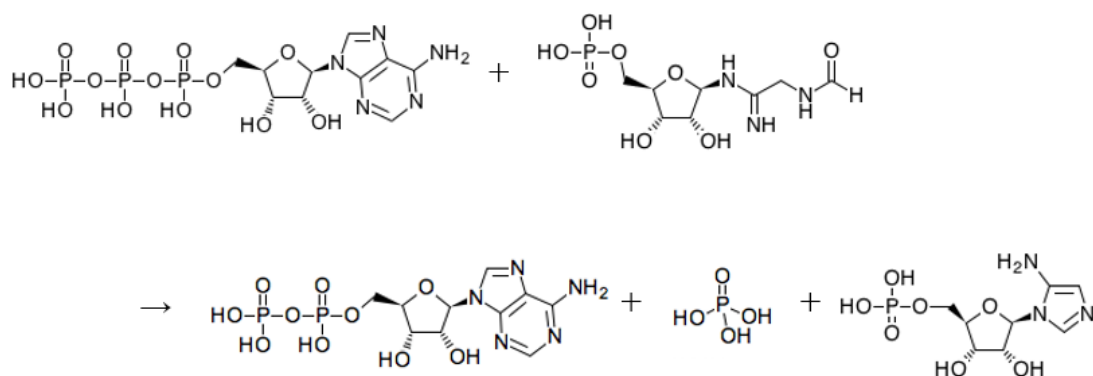
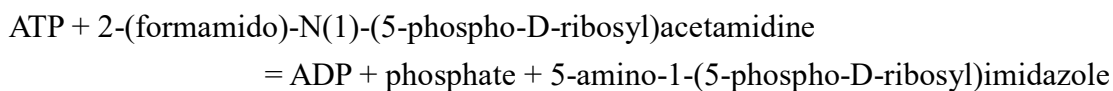
Was originally thought to be the ATPase subunit of phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, with catalytic subunit PurE. {ECO:0000305|PubMed:2464576}.

また、それぞれの酵素反応について、反応式とその構造式を以下に示した。

(1) EcPurT (1KJ8)

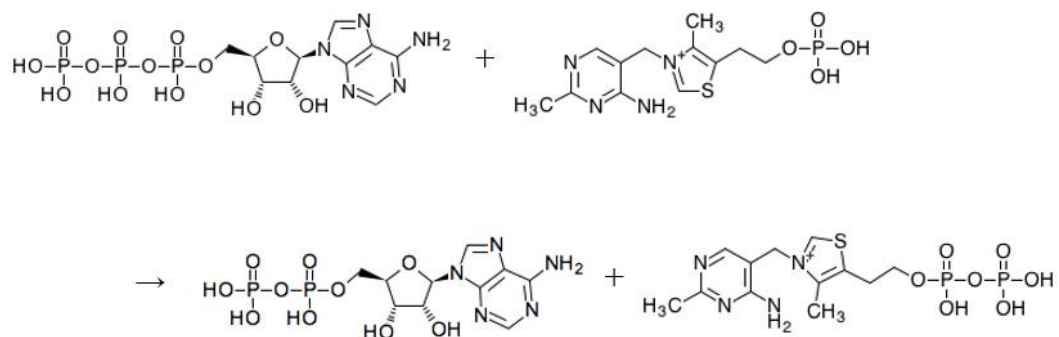


(2) 2Z01 (GkPurM)



(3) 2YXZ (TtThiL)

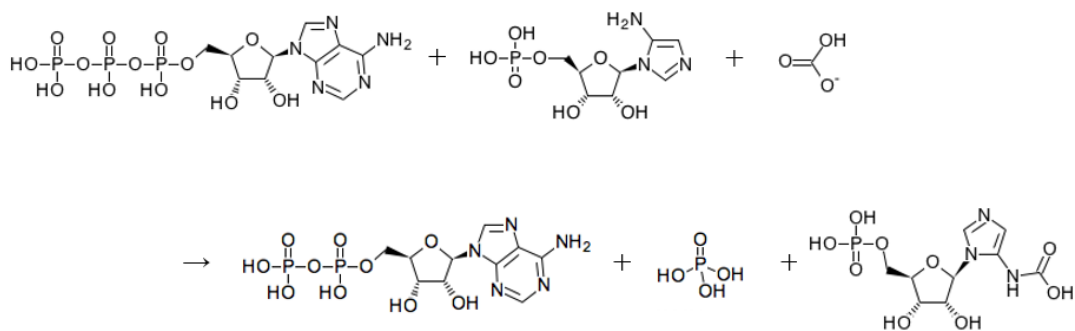
ATP + thiamine phosphate = ADP + thiamine diphosphate



(4) 3ETH (EcPurK)

ATP + 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole + HCO₃⁻(3-)

= ADP + phosphate + 5-carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole



4 考察

4.1 GkPurM と TtThiL との類似性

GkPurM による反応では、ATP が ADP とリン酸塩に分解されている。構造上の変化は、ATP から一つのリン酸基が分離しただけである。

TtThiL による反応では、GkPurM のものと同様に、ATP が ADP へと分解されている。ATP の構造上の変化も同様であるが、一つ違いがあるのは、分離したリン酸塩がチアミン一リン酸に付加し、チアミン二リン酸へと変化していることだ。

GkPurT と TtThiL ではある分子に別の分子からリン酸基を結合させる反応が生じている。どちらも ATP が基質にあり、反応が進んでいる。

4.2 EcPurT と EcPurK との類似性

EcPurT による反応では、ギ酸と 5'-phospho-ribosylglycinamide との間で脱水が生じ、同時に ATP が ADP に分解されていることがわかる。つまりこの反応においてエネルギーが消費されていることがわかる。

EcPurK による反応では、ATP の分解とともに HCO_3^- (重炭酸イオン) を別の物質と結合させる反応が起こっている。

EcPurT と EcPurK では分子間でアミド結合が形成されている。またこれらの反応で ATP が ADP とリン酸に分解されていることから、エネルギーが消費されていると考えられる。

5 参考文献・HP

[1] NCBI タンパク質データベース

URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

[2] DBGET Search - COMPOUND

URL : https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?compound