

L-アミノ酸リガーゼ SMU.1321c の結晶構造 Crystal structure of an L-amino acid ligase SMU.1321c

津田岳夫*, 小島修一

学習院大学理学部生命科学科, 〒171-8588 東京都豊島区目白 1-5-1

Takeo Tsuda,* and Shuichi Kojima

Department of Life Science, Faculty of Science, Gakushuin University, 1-5-1 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

1 はじめに

枯草菌などの微生物は、ペプチド骨格からなる抗菌作用を持つ化合物を生産できる。それらペプチドは基本的に2つの経路で生合成される。ひとつは、遺伝情報を基にリボソームで生合成された後、様々な翻訳後修飾を受けて成熟体になる経路である。この経路で生じるペプチド性抗生物質は、バクテリオシンと呼ばれている。もうひとつは、非リボソームペプチド合成装置(NRPS)によってアミノ酸が順次連結されてペプチドができる経路である。NRPSで合成されるペプチドには、Dアミノ酸や非蛋白質性のアミノ酸を含むことが可能となる。最近、これら2つの経路とは異なり、L-アミノ酸リガーゼと呼ばれるジペプチドを生産する酵素が見つかった。

L-アミノ酸リガーゼはATP依存的に2つのLアミノ酸を連結し α ジペプチドを生合成する。ATPはペプチドのN末端側になるアミノ酸のカルボキシル基をアシルリン酸化して活性化するのに使われると考えられている。1分子のジペプチドの生産に伴って1分子のADPとPiが放出される。NRPSがモジュールと呼ばれる単位が繰り返された巨大分子であるのに対し、L-アミノ酸リガーゼは400残基ほどの大きさの蛋白質である。蛋白質工学的な手法を用いてペプチドの生合成を目指す上で、L-アミノ酸リガーゼは手ごろな大きさで比較的シンプルな反応を行うため取り扱い易そうである。

最近、我々は枯草菌のL-アミノ酸リガーゼであるYwfEがADP-Mg-PiとADP-Mg-L-Alaを結合した結晶構造を1.9と2.0Åの分解能で決定し、L-Ala結合部位に変異を導入することで基質特異性を改変できることを報告した[1]。今回、YwfEとはN末端側になる基質アミノ酸に対する特異性が異なる*Streptococcus mutans*由来のL-アミノ酸リガーゼであるSMU.1321cが、ADPとSO₄²⁻を結合した結晶構造を1.8Åの分解能で決定した。

2 実験

Streptococcus mutans SMU.1321cはGST融合蛋白質として大腸菌で発現させ、グルタチオンカラムを用いて分離し、GST部分を切断後、ゲルろ過で精製

した。初期の結晶化スクリーニングはQIAGEN社のスクリーニングキットを用いて、蛋白質溶液に10mM ADPとMgCl₂を加え20°Cハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。結晶化条件の最適化を進めたところ、1.6–1.7 M Ammonium Sulfate、4% ethylene glycol、0.1 M MES-NaOH (pH 6.00–6.50)と1 mM DTTを含むリザーバー溶液で結晶が現れた。得られた結晶を20% ethylene glycolを含む溶液で抗凍結処理した。つくばPFのAR NE3AとAR NW12Aのビームラインを使用して回折データを収集した。位相決定はSe-Met置換体の結晶を用いたSAD法で行った。非対称単位中に2分子の蛋白質を含んでいた。モデル構築、精密化を行い、1.8Åの分解能で構造を決定した。

3 結果および考察

SMU.1321cは大きくA,B,Cの3つのドメインから構成され、Cドメインはさらに2つのサブドメインに分けられた(図1)。結晶化の際に加えたADPはBとC1ドメインの間に挟まれて存在していた。ADPは両ドメインに存在する保存されたアミノ酸残基によって認識されていた。結晶化の際に加えたMgイオンに相当する電子密度は見あたらなかった。一方、結晶化溶液中に含まれるSO₄²⁻が3つのドメインに囲まれた領域に存在していた。モルAでは、Aドメインの外側にも1分子SO₄²⁻が存在していた。

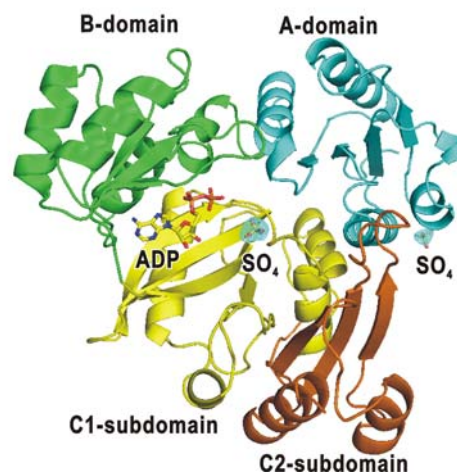


図1 : SMU.1321cの全体構造。

図2は SMU.1321c が ADP と SO_4^{2-} を結合した構造 (左) と YwfE が ADP, Mg^{2+} と Pi を結合した構造 (右) を示している。結合した SO_4^{2-} は保存された His265 と Arg285 の側鎖の窒素原子と Gly288 主鎖アミドで認識されており、YwfE 構造で見られた Pi とほぼ同じ位置に配置されている。異なる点は YwfE では2つの Mg イオンに Pi の酸素原子が配位しているのに対し、SMU.1321c では Mg イオン自身が存在していない。その結果として、 SO_4^{2-} が ADP の β 磷酸基から少し離れた位置に存在し、Gly288 と水素結合を形成し得たようだ。

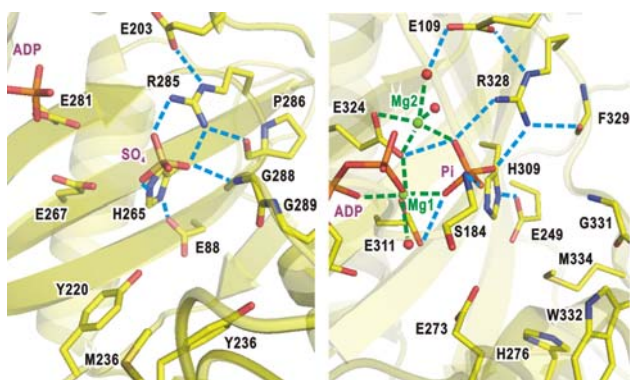


図2 : SMU.1321c (左) と YwfE (右) の触媒領域の構造。

YwfE が N 末端側になる基質 L-Ala を結合した構造では、L-Ala は Glu273, Glu311, Arg328, Gly331 と静電的相互作用し、側鎖 C β 原子は Trp332 と Met334 と VDW 接触して存在していた。YwfE では Trp332 を Ala に置換することで、新たに L-Met や L-Phe を基質として認識できるように基質特異性が改変されたことを我々は報告している[1]。Trp332 は結合する基質の大きさを決める重要な残基であると言えよう。YwfE の Trp332 と同じ位置に SMU.1321c では Gly289 が存在する。その結果として、Gly289 の周囲には空洞が生じているようだ。その空洞は疎水的な側鎖で構成されているように見える。このことは SMU.1321c が Phe の様な大きな疎水的なアミノ酸を基質として好むことに一致しているようだ。ポケット内に2つの Tyr 残基が存在することは、ベンゼン環同士の相互作用の存在を期待させる。

SMU.1321c の N 末端側になる基質 L-Phe の結合様式を解明するため、L-Phe を加えて結晶化を試みた。しかしながら、得られた構造には L-Phe ではなく SO_4^{2-} が活性部位に結合していた。これは、結晶化溶液に高濃度に硫酸アンモニウムが存在しており、それがほぼ同じ場所に結合するであろう L-Phe の結合を邪魔しているようだ。現在、SMU.1321c の予想される基質結合ポケット内に変異を導入することで基

質特異性を改変することを目指し、変異体を用いた機能解析を進めている。

4 まとめ

今回の研究では、新たに L-アミノ酸リガーゼ SMU.1321c が基質を結合した構造を決定できた。結合した SO_4^{2-} は、YwfE の Pi 結合部位に一致しており、両者とも保存された Arg と His 残基で認識されていた。予想される N 末端側の基質結合ポケット内のアミノ酸は、Phe など疎水的な側鎖で構成されていた。今回の結果を含めて、ようやく3種類の L-アミノ酸リガーゼの構造が明らかになった。これらの情報を蓄積することは、目的のペプチドを合成する「機能改変酵素の創出」を目指す上で重要な知見を与えることと期待される。

謝辞

本研究は、つくば PF スタッフの皆様の皆様のご支援によって進めることが可能でした。ここに深く感謝致します。

参考文献

[1] T. Tsuda *et al.*, *Biochemistry* 2530, **53** (2014).

* takeo.tsuda@gakushuin.ac.jp