

抗生物質 BD-12 の生合成研究に見出したグリシンオキシダーゼ様酵素の S-SAD 測定の予備的解析

X-ray crystallographic analysis of the glycine oxidase-like enzyme found in the studies on the antibiotic BD-12 biosynthesis by S-SAD phasing

新倉春香、伊藤貴文*、日弁隆雄、濱野吉十
福井県立大学, 生物資源学部, 生物資源学科
〒910-1195 福井県永平寺町松岡兼定島 4-1-1

Haruka NIKURA, Takafumi ITOH, Takao HIBI, Yoshimitsu HAMANO
Department of Bioscience and Biotechnology, Fukui Prefectural University,
4-1-1 Kenjojima, Matsuoka, Eihei-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1195, Japan

1 はじめに

抗生物質 BD-12 は、抗菌活性に重要な *N*-formimidoyl glycine 残基を有することを特徴とし (図 1 の囲い部分)、生合成中間体である glycinothricin を経由して生合成されることをこれまでに明らかにしている [1, 2]。BD-12 生合成遺伝子群に見出した *orf 1* は、*N*-formimidoyl 基生合成酵素 [1, 3] に相同性を示したことから、生合成中間体を基質に *N*-formimidoyl 基を導入する責任酵素と考えられた。そこで、*Orf 1* の組換え酵素を用いて解析したところ、本酵素が *N*-formimidoyl 化反応を触媒する新規酵素であることを確認した。また、*Orf 1* は glycine を基質に酸化的脱炭酸を触媒するが (図 1)、一般的なグリシンオキシダーゼの反応機構とは異なり、脱アミノ化を行わず、その反応機構の詳細は不明である。本研究では、X 線結晶構造解析によって、本酵素の触媒機構の解明を目指した。

2 実験

Orf 1 の組換えタンパク質 (r*Orf 1*) を放線菌 *Streptomyces lividans* 中に発現させた。発現した r*Orf 1* を Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製し、Turbo3C にて限定加水分解処理を行った。そして、His タグが欠失した酵素を陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。結晶は、4 M ギ酸ナトリウム、0.3 M DNSB-195、2.5 mg/ml 酵素、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 mM DTT、0.5 mM EDTA の条件で得られた。この結晶に関して、Photon Factory BL-1A にて波長 2.7 Å を用いて X 線回折データの収集を行った。そして、硫黄を用いた SAD 法による立体構造の構築を検討した。

3 結果および考察

結晶は C222₁ 空間群に属し、3 Å 前後までの回折像を与えた。しかし、収集した回折データだけでは、硫黄による位相の決定にまでは至らなかった。現在、結晶化条件を最適化し、結晶を作製中である。また、

結晶の凍結条件など測定方法のさらなる最適化も行っている。

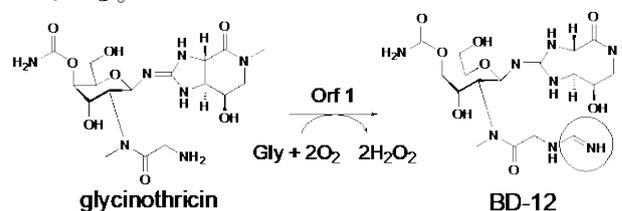


図 1 : *Orf 1* 反応機構

4 まとめ

今回取得した X 線回折データだけでは、立体構造を構築できるほどの良好な位相を決定することはできなかった。今後、測定条件を最適化し、複数の結晶を用いて、位相の決定および立体構造の決定を行いたい。

参考文献

- [1] C. Maruyama *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 82, 3640-3648 (2016).
- [2] H. Niikura *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 125, 148-154 (2018).
- [3] T. Dairi *et al.*, Mol. Gen. Genet. 236, 49-59 (1992).

* ito-t@fpu.ac.jp