

## 2-アミノイソ酪酸モノオキシゲナーゼの構造解析 Structure Analysis of the 2-Aminoisobutyric acid Monooxygenase

日比慎<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>富山県立大学工学部生物工学科  
〒939-0398 富山県射水市黒河 5180  
Makoto HIBI<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology,  
Toyama Prefectural University,  
5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398, Japan

### 1 はじめに

地球上には隕石などの飛来を通じて、大量の地球外有機化合物が常に降り注いでいる。2-アミノイソ酪酸 (Aib) はこのような地球外有機化合物の一種である。年間数百キログラムもの Aib が宇宙から飛来しており、地球への地球外有機化合物の供給において主要な役割を果たしてきた。地球外有機化合物は非生物由来であるが、地球上にはこれらの有機化合物を栄養源として上手く利用する微生物が存在する。我々は Aib を唯一の炭素源として利用する放線菌 *Rhodococcus wratislaviensis* を発見し、この放線菌が Aib をいかにして利用するかについて解析を行ってきた。

我々は本放線菌 *R. wratislaviensis* が5段階の酵素反応経路により Aib をピルビン酸に変換することを解明している。この酵素反応経路の第1段階に働く酵素は、Aib モノオキシゲナーゼであり、Aib 分子中のメチル基を選択的に水酸化する活性を示す。Aib モノオキシゲナーゼは、フェレドキシン還元酵素 (電子伝達ユニット) ・Rieske 型フェレドキシン (電子伝達ユニット) ・ヘテロ四量体タンパク質複合体 (触媒ユニット) からなる3成分モノオキシゲナーゼであった。

本年度は、この Aib モノオキシゲナーゼの触媒ユニット (AibH1H2) に関して、立体構造を決定することに成功した[1]。

### 2 実験

*R. wratislaviensis* 由来 AibH1H2 を N 末端 His タグ融合タンパク質として大腸菌 JM109 で発現させた。セレノメチオニン含有培地中で発現させた SeMet-AibH1H2 は Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した SeMet-AibH1H2 複合体を用いて結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて、PF BL-5A で回折強度データを収集した。その後、単波長異常分散法により位相を決定し、モデル構築と構造精密化を行い、最終構造を得た。

### 3 結果および考察

SeMet-AibH1H2 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、0.05 M Tris-HCl (pH 8.5)、0.5 M ammonium sulfate、6% (v/v) glycerol の結晶化条件下で結晶が得られた。SeMet-AibH1H2 複合体を分解能 2.8 Å で構造決定した。空間群は C222<sub>1</sub> であり、非対称単位中に2つの SeMet-AibH1H2 複合体が含まれていた。単波長異常分散法による位相決定の後、SeMet-AibH1H2 複合体のモデル構築と精密化を行い、最終構造を得た ( $R_{\text{work}} = 19.0\%$ ,  $R_{\text{free}} = 25.0\%$ )。AibH1 と AibH2 は 36 個の水素結合と多くの van der Waals 相互作用で結合しており、全体としてはヘテロ四量体複合体構造を形成していた (図 1)。AibH1 と AibH2 はともに (β/α)<sub>8</sub>-barrel (TIM-barrel) 構造を保持していた。

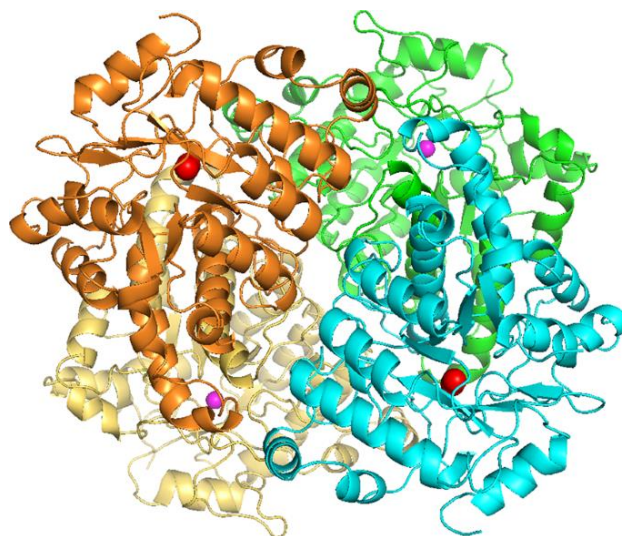


図 1 : AibH1H2 ヘテロ四量体複合体構造

AibH2 には二つの非ヘム鉄イオンが Asp25、His27、His211、Glu26、Asp337、His340 に配位結合しており、本酵素の二核鉄活性中心を形成していると考えられた。一方で、AibH1 には一個の亜鉛イオンが

Asp24、His26、His201、Glu255、Asp328 に配位結合していた (図 2)。

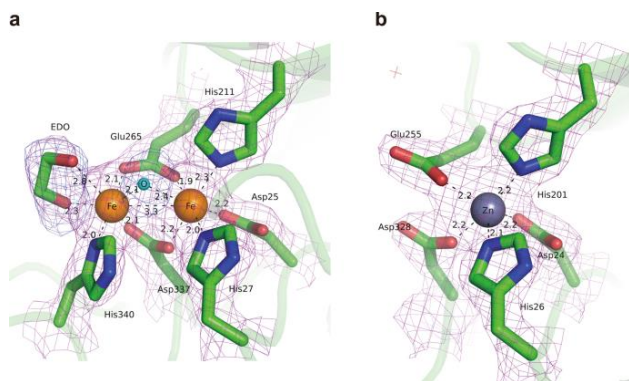


図 2 : AibH2 (a) と AibH1 (b) の金属結合部位

#### 4 まとめ

放線菌 *R. wratislaviensis* 由来 Aib モノオキシゲナーゼの触媒ユニットは、2 つの非ヘム鉄イオンを含むサブユニットと、1 つの亜鉛イオンを含むサブユニットから構成されており、これまでに報告されたことのないユニークな全体構造を持つ二核非ヘム鉄酵素であることを、結晶構造解析により明らかにした。

#### 謝辞

PF ビームラインスタッフの方々におきましては、回折データの収集にあたり、大変お世話になりました。心より感謝致します。

#### 参考文献

[1] M. Hibi *et al.*, *Commun. Biol.* 4, 16 (2021).

\* hibi@pu-toyama.ac.jp