

ヌクレオシド系抗生物質の骨格形成に関わる酵素の構造解析への取り組み Study on enzymes involved in the biosynthesis of nucleoside antibiotic

白石太郎¹, 永田隆平¹, 葛山智久^{1,*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Taro SHIRAISHI¹, Ryuhei NAGATA¹ and Tomohisa KUZUYAMA^{1,*}

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

1 はじめに

カブラザマイシンは、*Streptomyces* sp. MK730-62F2 株の培養抽出液から見つかったリボヌクレオシド系抗生物質であり、その構造はウリジンと 3 つの不斉炭素を含む特徴的な七員環およびアシル側鎖からなる。これまでにカブラザマイシン類の誘導体展開によって超多剤耐性結核菌にも活性を有する誘導体も見つかっている [1]。

これまでに我々はカブラザマイシンの生合成に着目して研究を進めてきた。その過程で生合成中間体が、最終産物にはないリン酸化修飾をされていることを明らかにした[2]。そこで種々の生合成酵素の構造解析を行い、基質認識の構造基盤を明らかにすること、さらにはリン酸化修飾の意義を解明するための知見の獲得を目指した。

2 実験

大腸菌 BL21(DE3)で発現させた酵素 A を Ni カラムとゲルろ過カラムで精製し、結晶化条件 [0.1 M succinic acid pH 4.8 and 10%–25% w/v polyethylene glycol 8000] にてハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化を行った。得られた結晶を液体窒素で凍結し、Photon Factory BL-1A, BL-17A, AR-NE3A にてリモート実験または全自動測定にて X 線回折実験を行った。位相決定には、重原子同型置換法または AlphaFold で作成した予測立体構造を用いた分子置換法を使用し、誘導体結晶の調製には K₂PtCl₄, KAu(CN)₂, HgCl₂, 5-amino-2,4,6-triiodoisophthalic acid, thimerosal の試薬を試した。

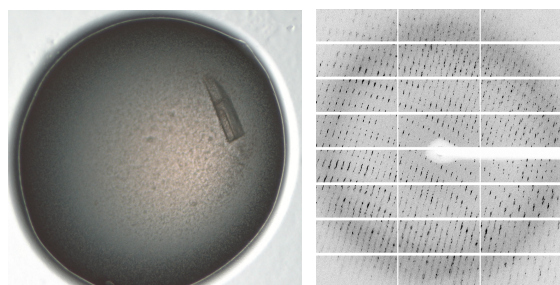


図 1. 酵素 A の結晶 (左) とその回折像 (右)

3 結果および考察

得られた結晶は概ねサイズが小さく (図 1)、ほとんどは双晶になっていると考えられた。調製した重原子誘導体結晶を用いて回折データを収集したが、位相決定には至らなかった。一方、予測立体構造を用いた分子置換法では位相決定に成功し、最終的に 2.5 Å 分解能で酵素 A の結晶構造を決定した。

この構造では、予想された基質結合部位に基質と考えられる電子密度がわずかに観察された。しかし、その電子密度は非常に不鮮明で、構造精密化を進めても基質結合様式を解釈できる妥当な電子密度は得られなかった。そのため、基質をモデリングするには至らなかった。

4 まとめ

カブラザマイシンの生合成酵素の一つについて結晶構造解析に取り組み、2.5 Å 分解能での構造決定に成功した。しかし、データの質が悪いためか、基質の電子密度を鮮明に観察することはできなかった。今後は、結晶の大型化や多数の結晶から得たデータをマージするなどして、データの質の向上が必要だと考えられる。

謝辞

回折実験でお世話になった Photon Factory のチームスタッフの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Y. Takahashi, et. al., *J. Antibiot.* (2013) 66, 171–178.
- [2] T. Shiraishi, et. al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* (2016) 62, 164–166.

* utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp