

祖先型 class II キラターゼ CfbA の基質識別機構 Tetrapyrrole substrate discrimination of an ancestral class II chelatase CfbA

藤城貴史*

埼玉大学大学院理工学研究科, 〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

Takashi FUJISHIRO

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-okubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan

1 はじめに

キラターゼは、ヘムやビタミン B12 などの金属-テトラピロール型の補因子の生合成系において、基質となる環状テトラピロールの中心部に 2 価金属イオンを嵌め込む反応を触媒する酵素である。構造分類学上、キラターゼは 3 つのクラスが存在するが、このうち、class II は最も多種多様であり、シンプルな金属はめ込み機構を有するキラターゼ反応の基礎研究に利用されてきた。近年、class II の中でも最も初期に発生したと考えられる"祖先型"キラターゼ CfbA が、古細菌特有の補因子 F430 の生合成経路において、Ni²⁺と sirohydrochlorin (SHC) を基質として利用し、生成物 nickel-sirohydrochlorin (Ni-SHC)、を合成可能であることが示された[1,2]。また、CfbA の SHC 結合型、Ni-SHC 結合型、反応中間体型の構造解析もなされ、CfbA による Ni-SHC 合成の触媒機構の解明と、触媒残機である His の重要性も提示されてきた[3,4]。一方で、class II キラターゼの分子進化と構造の関係については、上記のように祖先型 CfbA の天然基質 SHC に対する詳細な分子機構が明らかとなったにも関わらず、未だ多くのことが不明である。そこで本研究では、CfbA と、SHC 以外の種々のテトラピロールの複合体の X 線結晶構造解析を行い、class II キラターゼの分子進化の構造科学的理解を目指すものとした。

2 実験

CfbA の結晶に種々のテトラピロールをソーキングして、CfbA-テトラピロール複合体を結晶内で作成した。X 線回折データは 100 K で収集し、XDS、XSCALE によるデータ処理、Molrep による分子置換、Coot によるモデリング、Refmac5 と Phenix-refine による構造精密化を実施した。テトラピロール分子のモデルは、Prodrig により作成した。

3 結果および考察

それぞれ 5 種のテトラピロール (Uroporphyrin III: UPIII, uroporphyrin I: UPI, coproporphyrin III: CPIII, coproporphyrin I: CPI, protoporphyrin IX, PPIX)をソーキングした結晶から得られたデータを用いて構造解析を行った結果、UPIII 結合型、UPI 結合型 CfbA の

構造解析に成功した。一方、CPIII、CPI、PPIX は、その電子密度が観測されなかった。

UPIII 結合部位は、天然基質の SHC とほぼ同じ位置であり、そのプロピオン酸や酢酸置換基と、近傍のアミド-NH、Ser11 側鎖との相互作用などもほぼ一致していた。これに対し、UPI は UPIII や SHC の結合位置から、より溶媒側、触媒残基である His から離れた位置に収まっており、水素結合ネットワークにより固定化されているものの、そのままでは金属イオンのはめ込み反応が困難であった。実際に活性測定の結果、UPIII では Ni キラターゼ活性が見られたものの、UPI はほぼ活性が見られず、構造と機能の相関関係が説明された。UPIII や UPI は祖先型 CfbA の基質 SHC と、一部の子孫型キラターゼ PpfC、CpfC の基質 PPIX、CPIII の中間の疎水性を示す。よって今回の結果から、キラターゼの分子進化は活性部位の構造のみだけでなく、疎水性／親水性の度合いの変化をもたらしたことが示唆された[5]。

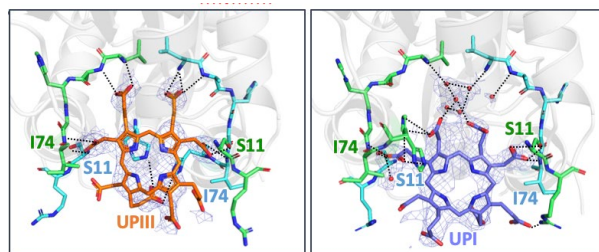


図 1 : UPIII (左)、UPI 結合型 (右) の CfbA.

謝辞

X 線データ測定に際し、PF のビームラインスタッフの方々、また結晶顕微 UV-visible 測定では KEK の引田理英助教にお世話になり、御礼申し上げます。

参考文献

- [1] S. J. Moore, *et al.*, *Nature*, **543**, 78–82, (2017).
- [2] K. Zheng, *et al.*, *Science* **354**, 339–342, (2017).
- [3] T. Fujishiro, *et al.*, *Chem. Sci.* **12**, 2172–2180, (2021).
- [4] Y. Oyamada, *et al.* *FEBS Open Bio*, **14**, 1291–1302, (2024).
- [5] S. Ogawa, *et al.*, *Protein Sci.* **33**, e5208, (2024).

*tfujishiro@mail.saitama-u.ac.jp