

バチライシン生合成酵素の結晶構造解析 Crystal structure analysis of bacilysin biosynthesis enzymes

津田岳夫*, 小島修一

学習院大学理学部生命科学科、〒171-8588 豊島区目白 1-5-1

1 はじめに

枯草菌が生産する抗生物質で、「バチライシン」と呼ばれるジペプチドがある(図1)。バチライシン生合成には、*ywf* 遺伝子クラスター上に存在する7つの蛋白質が関与することが知られている。まず、*YwfB, C, D, G, H* 酵素によって、プレフェン酸を前駆体として非蛋白質性 L-アミノ酸であるアンチカプシンが合成される。合成されたアンチカプシンは、*YwfE* タンパク質によって ATP 依存的に L-アラニンと連結されることでバチライシンが産生される。

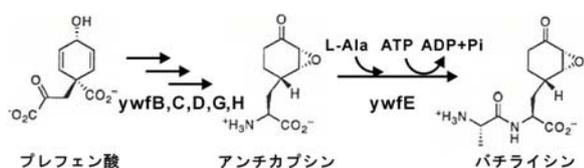


図1: バチライシン合成経路。

同じくプレフェン酸を前駆体として生合成されるものは、フェニルアラニンやチロシンという芳香族アミノ酸がある。一方、アンチカプシンは芳香環ではなくシクロヘキサン骨格からなる。抗菌活性を有するエポキシ基が、どのように生合成されるかも謎である。さらに、最近発見された L-アミノ酸リガーゼの研究は D-アミノ酸リガーゼに比べ進んでいない。

本研究では、バチライシン合成酵素群の X 線結晶構造解析を行い、これら特徴的な反応機構の解明を目指している。今回は、酸化還元酵素である *YwfD* と L-アミノ酸リガーゼである *YwfE* の2つに着目して、リガンド共存下で結晶を得て、PF の放射光を利用してデータ収集を行った。

2 実験

YwfD、*E* 蛋白質は、大腸菌で発現し、各種クロマトグラフィーにて高純度に精製された。結晶化初期スクリーニングは、*QIAGEN* 社のキットを用いてハンギングドロップ蒸気拡散法で行い、それを基にして更なる条件の最適化を進めた。得られた結晶を抗凍結処理し、PF にて回折データを収集した。*YwfE* に関しては *Se-Met* 置換体結晶を用いた SAD 法によるデータも収集した。

3 結果および考察

YwfE に関しては、1.9 Å 分解能で ADP-Mg が結合した状態の構造を決定した[1]。全体構造は3つのドメインから構成され、ATP-grasp ファミリーに属した。D-アミノ酸リガーゼ等にはない、C2-domain が存在していた。ADP と2つの Mg^{2+} は3つのドメインに囲まれた領域に存在しており、このファミリーで保存されたアミノ酸によって認識されていた。

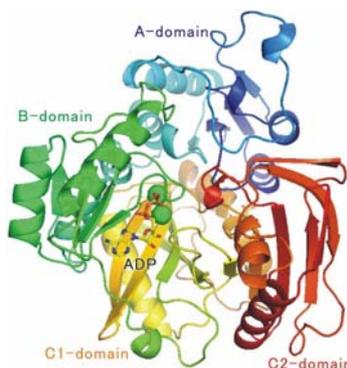


図2: *YwfE* の全体構造。

ADP は B(緑)と C1(黄色)ドメインの間に存在している。C2(赤)ドメインは直接 ADP などと結合していないようだ。2つの Mg^{2+} は緑色の球で示す。

基質となる L-アミノ酸が結合した状態を現す結晶は得られていないが、今回の構造を基にして反応を推測することが可能となった。

一方、*YwfD* については 1.5 Å 分解能のデータセットが得られ、現在、構造解析を進めている。

4 まとめ

今回、我々はバチライシン合成に関わる酵素のうち、L-アミノ酸リガーゼ *YwfE* の構造を決定した。*YwfE* は ATP-grasp ファミリーに保存されたアミノ酸残基を用いて ADP を認識していることが明らかになった。C2-domain は間接的に基質認識に関わっているようだ。今後、他の酵素の構造決定を進める。

謝辞

PF スタッフの皆様のご支援に深く感謝いたします。

参考文献

[1] T. Tsuda, T. Suzuki & S. Kojima. *Acta Cryst.* **F68** (2012) 203-306.

* takeo.tsuda@gakushuin.ac.jp