

細菌におけるメナキノン合成経路酵素の立体構造解析 Structural study of an enzyme of menaquinone synthesis in bacteria

福岡大祐、秋山友了、佐々木康幸、矢嶋俊介*

東京農業大学バイオサイエンス学科、〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

1 はじめに

人を含め哺乳類においてビタミン K は、血液凝固因子の活性化を担う重要な化合物である。しかし、哺乳類はビタミン K を自ら合成できないため、植物（ビタミン K1）や腸内細菌（ビタミン K2）から得ている。細菌においてメナキノン（ビタミン K2）はシキミ酸経路で合成されたナフトキノン骨格とイソプレノイド鎖からなる化合物である。大腸菌や枯草菌において合成経路が詳しく研究されてきた。

近年、放線菌にはその経路に存在するいくつかの対応する遺伝子が存在せず、コリスミ酸から新規経路を経て、メナキノンが合成されることが明らかとなった。また、データベース解析から放線菌の他 *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* などの病原性菌もこの新規経路を持つ一方、乳酸菌は既知経路を使用していることが明らかとなり、この経路があらたなドラッグターゲットとして注目を集めている。

この経路の特徴として、コリスミ酸に続く化合物として通常の代謝物としては知られていないフタロシンが合成される。フタロシンはある種の放線菌の二次代謝産物として発見され、誘導体には制癌作用があることが認められている。経路第一段階目の酵素がフタロシン合成の一部になっていると考えられているが、まだ詳細は不明である。そこで、この経路を有する好熱性放線菌である *Acidothermus cellulolyticus* 11B 由来酵素の立体構造を明らかにし、フタロシンを合成する反応機構を明らかにすることを目指している。

2 実験

データベース情報を元に *A. cellulolyticus* 11B におけるメナキノン合成経路の初発酵素である *Acel_0261* 遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系 pET22b(+)ベクターに導入した。サンプルの結晶化は全てハンギングドロップ蒸気拡散法で行ない、4℃で静置した。回折強度データの処理は HKL2000 でおこなった。

立体構造の構築は、PDB ID: 2NXO をサーチモデルとした分子置換法により MOLREP を用いて行ない初期構造を求めた。変異体の構造解析は、得られた立体構造をサーチモデルとした分子置換法により解を求めた。

3 結果および考察

得られた結晶について 2.3 Å 分解能で回折データを収集した。空間群は $P2_1$ に属しており、非対称単位にモノマーが 2 分子存在していた。XtalView でのモデル構築と Refmac5 を用いた精密化を行なった。N 末端および C 末端の各 1 残基を除いてすべてモデリングができた。分子の中心に大きな電子密度が観察され、基質あるいは反応物かと期待された。しかしながら、現在想定されている反応における化合物構造とは一致せず、化合物は未同定である。しかし、その空間が活性部位と考えられたため、酵素に変異を導入し構造解析を行うこととした。結晶化、構造解析を行うことができた変異体については、野生型と同じ空間群であったが格子常数がことなり、非対称単位に 1 分子が含まれていた。全体構造は野生型と同一であった。

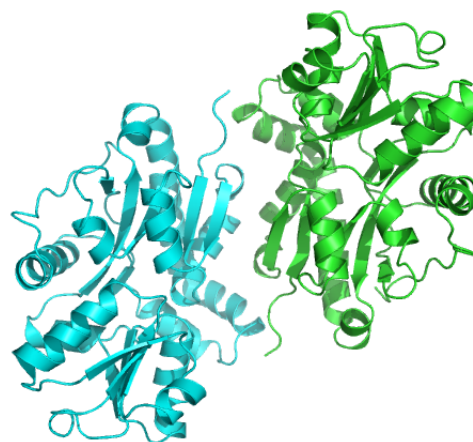


図 1 : Acel_0261 の立体構造

4 まとめ

今回、*A. cellulolyticus* 由来のメナキノン合成経路初発酵素の立体構造を明らかにした。今後は、変異体などの解析を行い反応機構の解明を目指す。

謝辞

データ測定にあたり PF スタッフの方々に深く感謝致します。

* yshun@nodai.ac.jp