

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

Daisuke Fukuoka, Tomonori Akiyama, Yasuyuki Sasaki and Shunsuke Yajima

Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

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、誘導体には抗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。昨年度は、全体構造を明らかにした結果、タンパク質構造の中心に低分子化合物の結合が観察された。この化合物の結合部位が活性部位と想定されたため、周辺残基の変異体を作成し、構造解析を行った。

2 実験

Acel_0261 タンパク質の化合物結合部位周辺のシステイン、チロシン、セリン、アスパラギン、スレオニンをアラニンに変換した。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 °C 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、野生型の構造をサーチモデルとして、MOLREP を用いて分子置換法により初期構造を得た。その後、REFMAC5 で精密化計算と Coot によるモデリングを繰り返した。

3 結果および考察

野生型の結晶は幅のある棒状であったのに対し、変異体の結晶はどれも細い棒状であった。そのため、BL-17A の使用が有効であった。一方見た目の結晶の形に比べ、分解能はどれも 2.2 Å 程度を得ることができた。野生型の空間群が $P2_1$ であったのに対し、変異体では $P2_1$ あるいは $C2$ の 2 種類が得られた。 $P2_1$ の場合では、格子常数は野生型とほぼ同一であり全体構造も同一であった。空間群が $C2$ の結晶では構造変化が期待されたが、得られた全体構造に変化は見られなかった。また、空間群 $P2_1$ の場合に a 軸の長さが 2 倍になる結晶が出現した。この結晶では分子置換による解が得られない。

変異導入により、化合物結合部位周辺のアミノ酸残基において、側鎖の向きに変化が見られるものがあつた。また、化合物の結合において、その位置が少しずれた変異体構造があつた。すなわちその残基が結合に重要な役割を果たしていることが予想された。しかし、化合物の結合が失われたような変異体構造は無く、すべて結合している状態であつた。

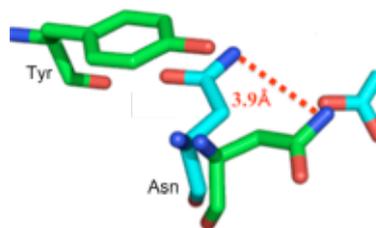


図 1：変異体構造における側鎖の向き Tyr を Ala に変換したところ、Asn 側鎖の向きに変化が見られた。（緑：野生型、青：変異体）

4 まとめ

変異体の導入により、結合に重要であると考えられる残基の同定に成功した。今後は変異体機能について詳細に解析を行い、反応機構の解明をめざす。

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