

抗生物質バチライシン合成酵素群の結晶構造解析

Crystal structure analysis of enzymes for antibiotic bacilysin synthesis

津田岳夫*, 浅見真奈、小口孔明、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

Takeo Tsuda, Mana Asami, Yoshiaki Koguchi, and Shuichi Kojima

Dept. LifeSci., Fac. Sci., Gakushuin Univ., 1-5-1 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo, 171-8588, Japan

1 はじめに

枯草菌が生産する抗生物質バチライシンは、L-Ala と非蛋白質性の L アミノ酸であるアンチカプシンが連結して出来たジペプチドである。バチライシンは、*ywf* 遺伝子クラスター上に存在する 7 つの蛋白質が順次反応することで合成されると考えられている。本課題では、バチライシン合成酵素群の X 線結晶構造を決定し、それら反応機構の解明を目指している。

その中の一つである YwfE は、L アミノ酸同士を ATP 依存的に連結する L アミノ酸リガーゼである。バチライシンに加えて、YwfE は L-Ala-L-Phe などの蛋白質性のジペプチドも生産でき、酵素を用いた有用ペプチド生産の道具としての利用が期待されている。今回は、PF の放射光を利用して行った YwfE の構造解析から得られた知見を報告する。

2 実験

YwfE は GST 融合体として大腸菌で発現し、affinity chromatography、GST 除去後にゲルろ過を行い精製された。結晶化スクリーニングはハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。初期条件の検討は QIAGEN 社のキットを用いた 386 条件で行い、それを基にして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。位相決定は Se-Met 置換体結晶を用いた SAD 法で行った。

3 結果および考察

我々は YwfE が ADP-Mg-Pi そして ADP-Mg-Ala を結合した状態の結晶構造を、それぞれ 1.9 Å として 2.0 Å 分解能で決定した[1]。YwfE は大きく 3 つのドメインから構成され、ADP と Mg²⁺ はドメイン間に存在する保存されたアミノ酸によって認識されていた。ADP の β 磷酸基の向こう側で Pi または L-Ala が異なる場所に存在し、保存された Glu311 や Arg328 を含むアミノ酸によって認識されていた。これら 2 つの構造を重ね合わせてみると、Pi そして L-Ala のそれぞれ一つの酸素原子がほとんど同じ位置に存在した(図3)。これは、基質 L-Ala がリン酸化された反応中間体を模しているように見える。Ala や Pi 酸素原子による負電荷を打ち消すために、His309 と Arg328 は存在しているように見える。それら残

基の Ala 変異体は、L アミノ酸に依存した ATPase 活性が消失した。つまり、保存された His309 と Arg328 は反応中間体を安定化させるオキソアニオンホールとして重要な働きをされると考えられる。

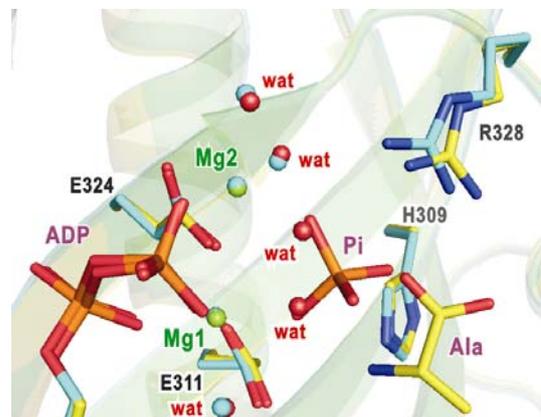


図 1: YwfE の L-Ala (黄色) そして Pi (シアン) 結合状態を重ね合わせたモデル。両者のモデルは ADP と 2 つの Mg イオンを含めてよく一致するが、結合した Ala と Pi の位置が異なる。

4 まとめ

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 2 つの状態の結晶構造を決定した。それらを基にして変異体を作成し機能解析を行った結果、保存された His309 と Arg328 の触媒反応における役割を推測できた。

謝辞

実験を行うに当たり、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] Tsuda T., Asami M. Koguchi Y., and Kojima S. "Single mutation alters substrate specificity of L-amino-acid ligase." *Biochemistry* 2014 Apr 4: 53: 2650-2660

* takeo.tsuda@gakushuin.ac.jp