

高度好熱菌由来 Biotin Protein Ligase の結晶学的研究 Crystallographic study on Biotin Protein Ligase in *Thermus thurmoiphirus*

川口洋子

Yoko KAWAGUCHI

1. はじめに

脂肪酸の鎖長変化は酢酸単位で行なわれ、鎖長の縮小はβ酸化後の酢酸脱離として、鎖長の延長は脱炭酸を伴うマロン酸附加として行なわれる。このマロン酸の合成は酢酸の炭酸附加によって行なう。この炭酸附加酵素を acetyl CoA carboxylase という。

acetyl CoA carboxylase は、その核芯サブユニットとして biotin carboxyl carrier protein (BCCP)を持つ。この BCCP の Lys 残基が biotin の吉草酸側鎖とアミド結合し (Fig. 1(a)), biotin の 1-NH に炭酸が附加する (Fig. 1(b))。この炭酸が酢酸に炭酸附加してマロン酸とするのである。

この BCCP Lys 残基と biotin 吉草酸側鎖とのアミド結合を触媒する酵素が biotin protein ligase (BPL) である。その際、ATP と Mg^{2+} とが必要である。脂肪酸合成は細胞膜を持つ生物にとって必須なので、すべての生物はこの BPL を有している。

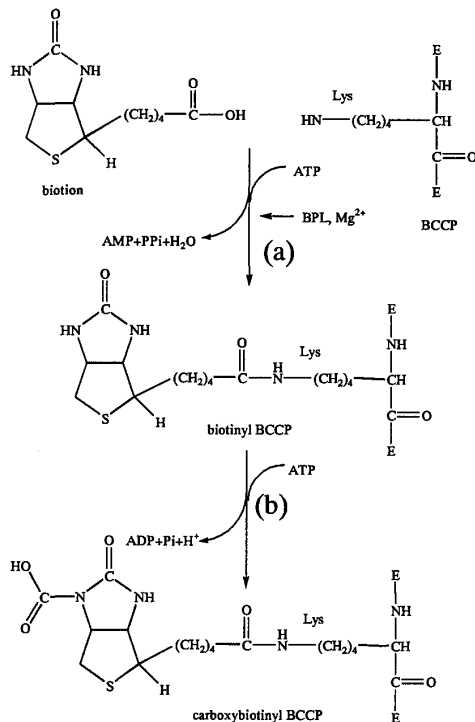


Fig. 1 Synthesis of carboxybiotinyl-BCCP.

原核生物の BPL を BirA (約 320 アミノ酸残基) といひ、N 末端 (約 60 アミノ酸残基)、中央 (約 210 アミノ酸残基)、C 末端 (約 50 アミノ酸残基) の 3 つの domain からなる。この中の中央 domain に Gly rich 逆平行βシートからなる触媒溝があり、その中に biotin 分子がはまりこむ。またそのループ部は GRGRXG モチーフを含み、ここが ATP 結合部位と予想されている。

真核生物の BPL は holocarboxylase synthetase といひ、BirA の N 末端 domain のさらに N 末端側に約 400 アミノ酸残基の附加部がある構造になっている。ただし、この附加部を除去しても biotin protein ligase 活性は失われない。

BirA の構造は、大腸菌由来 BirA (321 アミノ酸残基) において検討されているが、その 3 次構造の可動性のため未だ詳細はわかっていない。そこで本研究では、熱安定性を有する高度好熱菌由来 BirA (297 アミノ酸残基、大腸菌由来 BirA との残基相同性は約 30%) を用いて触媒部位の構造を調べ、その反応機構を検討することを試みた。

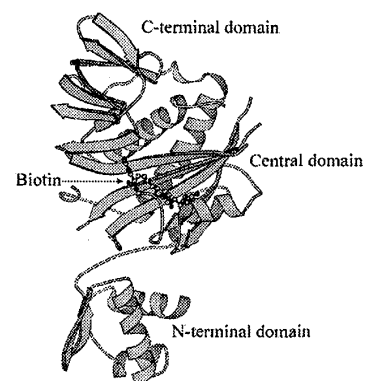


Fig. 2 Structure of *E. coli* BirA with biotin.

2. 実験

(1) 結晶化

高度好熱菌由来 BirA (biotin protein ligase) を、トリス緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH=7.0), 150 mM NaCl, 1 mM DTT) の溶液 (約 3

mg/mL)として理化学研究所より入手した。

この試料溶液 (2 μL) を 5%グリセロールの入ったリン酸緩衝液 (2 M リン酸塩 pH=6.5) で 2 倍に希釈して protein drop とした。この drop と reservoir リン酸緩衝原液 (500 μL) とを同室密閉して (20°C), drop 水分を reservoir に平衡移動させ、緩徐に drop 内試料濃度を上昇させた (懸垂滴蒸気拡散法 hanging drop vapor diffusion method)。しかしこの方法では微小な結晶しか得られなかった。

そこで、試行錯誤の末、reservoir 溶液ならびに希釈溶液として、リン酸緩衝液の替りに、沈澱剤として 0.5-1.4 M 酢酸ナトリウムが入った 0.1 M カコチル酸塩緩衝液 (pH=6.5) を用いた蒸気拡散法 (4-20°C) により、約 1 ヶ月の後、針状結晶 (10 \times 10 \times 80 μm^3) を得た。

(2) X線回折

得られた試料結晶を蒸気拡散箱のまま高輝度光科学研究センター (JASRI) 大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県佐用郡三日月町) に運び、測定直前に保存用緩衝液 (0.1M カコチル酸塩緩衝液+2.0M 酢酸アンモニウム混液) に不凍剤 (20%グリセロール) 加えた溶液に浸漬したのち、結晶をクライオループ (ナイロン輪, 金属柄) で掬い取り、ループ柄をゴニオメータヘッド磁石に貼付した (100 K)。この結晶にビームライン BL38B1 からのシンクロトロン放射光 (1 Å) を照射し、回折強度データを得た。

3. 結果と考察

3.0Å で独立な回折点 12389 個が得られた。これをプログラム HK2000 (HKL Research Inc.)を用いてデータ処理し、斜方晶系、空間群 P2₁2₁2₁, 格子定数 $a=36.51$ Å, $b=103.47$ Å, $c=182.92$ Å, 単位胞分子数 $Z=8$ (非対称単位当り 2 分子) を得た。

構造解析はプログラム CNS ver.1.1 を用いた分子置換法により行なった。

(3) 構造解析

2.3Å の分解能で解析された大腸菌由来 BirA (PDB accession number: 1BIA) をサーチモデルとした。まず廻轉函数を求めた。回折強度のフーリエ変換は原子間のベクトルの位置にその両端の原子の電子密度をかけた値がピークとして現れる。廻轉函数とは、回折強

度 I_o をフーリエ変換したベクトル図にモデルから計算した構造因子 F_c の 2 乗 I_c をフーリエ変換したベクトル図が合うようにモデルの配向を求めたものであり、回轉函数値の高い 10 個の配向を選んだ。次にそれぞれの配向のモデルを非対称単位の空間にわたって並進させ、それぞれの位置から求められた $|F_o|$ と観測値 $|F_c|$ とが最も一致する位置を並進関数で求めた。2 個の分子について求める必要があるので、10 個の座標をそれぞれ 1 番目の分子の座標とし、残りの 9 個の配向を 2 番目の分子の配向として 2 番目の分子の並進操作を行ったが、特に高い F_o と F_c の一致度を示す解は求められなかった。そこで各々の配向で得られた解にどのような問題があるかを調べるためグラフィックス上で O プログラムを用いて分子の配向と 10 個の配向の組み合わせを確認したところ、単位胞内分子の配置はしっくり来ず、残念ながら安定なパッキングは得られなかった。したがって、分子構造を BirA (大腸菌) の構造に固定したままで BirA (好熱菌) 単位胞内にパッキングすることは無理であることがわかった。

先に述べた様に BirA 分子は 3 つの domain, すなわち N 末端 domain と、中央 domain・C 末端 domain からなる。N 末端 domain と中央 domain をつなぐ hinge 部は可撓性が大きい。したがってこの両側の domain を独立に廻轉させることが BirA 構造解析に必須であることが示された。

【発表状況】

1. 「医薬品と結晶多形」生活工学研究 4 (2), pp310-317, (2002).
2. 「細胞のイオンチャンネル」生活工学研究 5 (2), pp274-275, (2003).
3. 「生体における炭素-炭素結合の生成とその意義」生活工学研究 5 (2), pp282-293, (2003).
4. 「静止電位と活動電位」生活工学研究 5(2), pp294-295, (2003).
5. 「大腸菌由来サイクロフィリン B は非常に歪んだトランスプロリン異性体と結合する」結晶学会, 2003.
6. *Escherichia coli* cyclophilin B binds a highly distorted form of *trans*-proline isomer, *J.Mol.Biol.*, 2004, (in preparation)