

主論文の内容の要旨

学位申請者 氏名	石田 航基	ローマ字 氏名	Kohki Ishida
-------------	-------	------------	--------------

論文題名

環状型ペプチド性抗生物質の大環状化に関与するメタロプロテアーゼの構造的
研究

内容の要旨

【序論】

Subtilisin A(サブチロシン A: 図)は *Bacillus subtilis* 168 株によって産生される
サクチペプチドと呼ばれるグループに分類されるバクテリオシンの一種である。サ
ブチロシンはグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す。サブチロシンはサクチペプ
チドの特徴であるシステイン残基と対応するアミノ酸残基の α 炭素間にチオエー
テル架橋が形成されており、これに加えて他のサクチペプチドでは見られない、N
末端と C 末端の間でのペプチド結合によって全体として大環状化しているという
特徴を有する。この大環状化にはサブチロシン遺伝子クラスターに含まれるプロ
テアーゼである AlbE および AlbF が関与していることが考えられているが、その
プロテアーゼに関する構造的情報あるいは環状化機構については不明である。

本研究においては、*B. subtilis* 168 株のサブチロシン生合成遺伝子クラスターの

アミノ酸配列に基づく BLAST 検索によって、Bacillus 属の種だけでなく、Staphylococcus 属の細菌やその他の種においてもサブチロシン生合成遺伝子クラスターが保存されていることを見出した。また、サクチペプチドの中でも珍しいサブチロシンにおける N 末端と C 末端の間でのペプチド結合による大環状化機構を明らかにするために、サブチロシン生合成遺伝子クラスターに含まれ、大環状化に関与すると考えられているプロテアーゼの野生型と活性部位変異体の結晶構造解析を目指した。

【方法】

組み換えタンパク質を得るために人工遺伝子を設計し、N 末端にヘキサヒスチジンタグを融合した形で発現するようなプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。1 L の TB 培地を用いて 37°C で発現誘導無しに 24 時間の培養を行うことで目的タンパク質を発現させた後、Ni-NTA Superflow 樹脂を用いたアフィニティー精製とゲルろ過によって高純度に精製されたタンパク質を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。

得られた結晶を用いて、放射光施設 Photon Factory のビームラインにおいて 100 K の窒素気流下で X 線回折測定を行い、白金原子を含む重原子誘導体から得られた回折データを用いた単一波長異常分散法によって初期位相を決定し、構造精密化を行った。

【結果・考察】

BLAST 検索の結果、見出されたサブチロシン前駆体、ラジカル SAM 酵素、ABC トランスポーターは、高いアミノ酸配列同一性を示すことが明らかになった。またいくつかの種においては自己免疫膜タンパク質を欠いており、ABC トランスポーターなどが自己免疫膜タンパク質の役割を代替していることが示唆された。

タンパク質の発現検討では、発現誘導無しで 24 時間の培養を行った時に最も多くの可溶性タンパク質を得ることができることがわかった。ゲルろ過による分析の結果、AlbE ホモログおよび AlbF ホモログはヘテロ二量体を形成していることが示唆された。野生型と変異体の結晶構造はそれぞれ 1.98 Å ならびに 2.10 Å 分解能で決定した。結晶構造は M16B 亜鉛プロテアーゼファミリーにおけるオープン型構造と相同的であった。活性部位に結合した金属イオンは X 線異常散乱の測定から亜鉛原子ではなく、ニッケル原子であることが示唆された。活性部位変異体ではヒスチジン残基がアラニン残基に置換されることで金属イオンは結合できなくなり、それにともなって活性部位周辺の二次構造が変化することが分かった。

構造に基づく相同性検索の結果から、AlbEF ホモログ複合体は他の M16B 亜鉛プロテアーゼと相同性を示すことが明らかになった。他の M16B 亜鉛プロテアーゼとの比較から、AlbE ホモログについては全体的な三次構造は類似しているが二次構造のトポロジーが異なること、AlbF ホモログについては β ストランドが一部欠失していることなどが明らかになった。加えて、基質結合ポケットは他のプロテアーゼと異なり、広く浅いポケットを形成し、AlbE 側は正に AlbF 側は負に帯電し

ていることが判明した。これはサブチロシン前駆体における表面電荷の偏りと考え合わせ、静電的相互作用が酵素と基質との相互作用に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

今回、サブチロシン生合成に関与するプロテアーゼとして初めて AlbEF ホモログ複合体の結晶構造を決定し、その構造情報から生体環境におけるプロテアーゼによるペプチド結合形成反応に対する新たな知見を得ることができた。

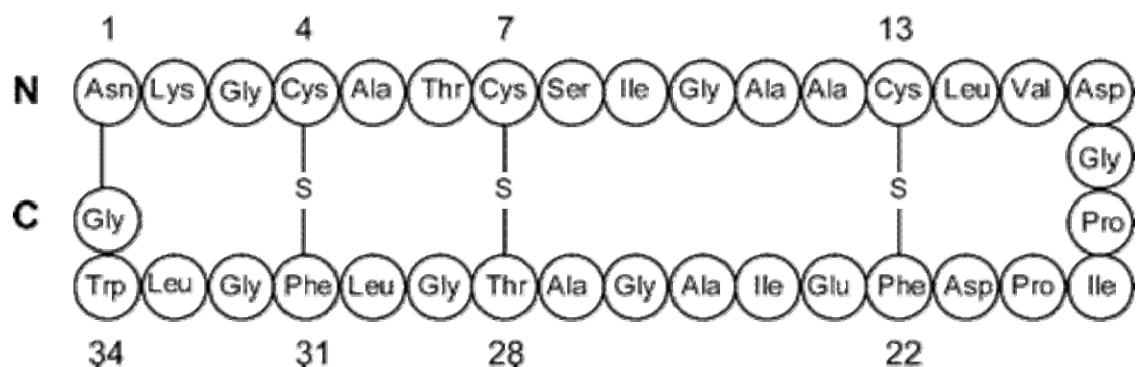


図. *Bacillus subtilis* 168 株由来のサブチロシン A の一次構造。