

Three-Dimensional Structure and Reaction Mechanism of Biotin-Dependent Enzymes

ビオチン依存酵素の立体構造・作用機構の解明

Shinji Sueda¹, Md. Nurul Islam¹, Jin Yong-Biao¹, Hiroki Kondo^{1,2}

末田慎二¹, モハマド ヌルル イスラム¹, 金勇彪¹, 近藤寛樹^{1,2}

(¹Kyushu Inst. Tech., ²RIKEN Harima Inst.)

(¹九工大, ²理研播磨)

e-mail:sueda@bio.kyutech.ac.jp

ビオチン依存酵素はビオチンを補酵素として利用して、炭酸の固定化や、脱炭酸反応、炭酸の転移反応を触媒する酵素である。炭酸の固定化を行う酵素としては、固定化する基質に応じてアセチル-CoA カルボキシラーゼ (ACC) やピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) 等が知られている。これらのビオチン依存カルボキシラーゼの反応は、2段階の部分反応から成り立っており、1段階目の反応は溶液中の炭酸をビオチンに固定化する反応で、ビオチンカルボキシラーゼ (BC) ドメインが触媒し、2段階目の反応はビオチンに固定化された炭酸を基質に転移する反応で、カルボキシルトランスフェラーゼ (CT) ドメインが触媒する。ビオチン依存酵素の立体構造に関する研究は、ここ数年で大きな進歩があり、徐々にこれらの酵素の全貌が明らかになりつつある。しかし依然として酵素の詳細な反応機構、とりわけ CT の反応に関しては不明な点が多い。中でも PC については立体構造がまだ解明されていないこともあり、多くの検討課題が残っている。例えば、PC の反応は、アセチル-CoA によってアロステリック的に制御されているが、その制御メカニズムは不明である。また、後半の CT の反応に関しては活性残基の特定もまだなされていない。そこで本研究では、PC の立体構造及び反応機構の解明を目指した。

Bacillus thermodenitrificans 由来の PC 及び *Aquifex aeolicus* 由来の PC に着目して検討を行った。*B. thermodenitrificans* 由来の PC はアセチル-CoA 非存在下では事実上活性を有していないが、*A. aeolicus* 由来の PC はアセチル-CoA に対する感受性を有していない。各酵素の大腸菌での発現系を構築し、タンパクを精製し、結晶化を試みた。その結果、*A. aeolicus* PC の BC サブユニット、及び *B. thermodenitrificans* PC の BC ドメインのみを人工的に発現させたタンパクについて結晶化に成功した¹⁾。両者の構造を比較すると、後者の構造には、前者には無いループ構造 (矢印) が存在しており、この部位がアセチル-CoA の感受性に関わっている可能性があるのではないかと考えている (図1)。

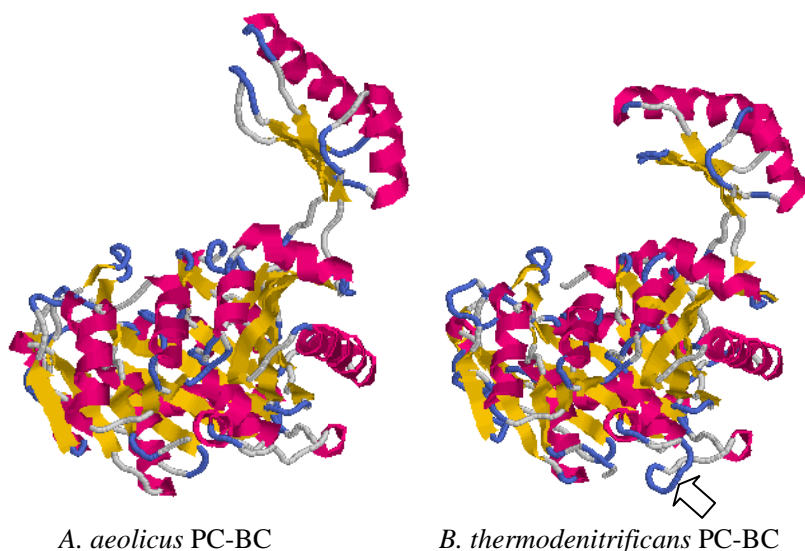


図1 *A. aeolicus* PC 及び
B. thermodenitrificans PC
の BC の構造

また、*B. thermodenitrificans*由来のPCに関しては、そのCTドメインに関して部位特異的変異導入法による活性残基の同定を試みた。触媒残基として機能し得るような保存されたアミノ酸残基に焦点を絞り、これらのアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し評価を行った。その結果、Asp-543の変異体と、Lys-712の変異体に関して顕著な活性の低下が見られ、これらが触媒残基の候補として考えられた。その他の実験データと併せてPCのCTの反応メカニズムを推測した²⁾。同様にタンパク質工学的手法により、*B. thermodenitrificans* PCに関して、ドメイン間で分割したタンパク質を作成し機能評価を行った。その結果、アセチル-CoAの作用メカニズムに関する知見や、タンパク質の会合状態に関する知見を得ることができた³⁾。

一方で、古細菌にもビオチン酵素が存在しているが、これらの代謝上での役割は真性細菌や真核生物におけるそれと異なっていることが指摘されている。古細菌の *Metallsphaera sedula* や *Acidianus brierleyi* には1種類のビオチン酵素が存在しており、この酵素は、ACC とプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (PCC) の2つの酵素活性を有することが報告されている。このような観点からこのビオチン酵素は古細菌において 3-hydroxypropionate cycle の炭酸固定化酵素として機能しているのではないかと推測されている。古細菌の *Sulfolobus tokodaii* にもビオチン酵素が1種類存在しており、この酵素は *M. sedula* や *A. brierleyi* の酵素と高い相同性を有しており、同様の機能を有しているものと推測される。本研究では、この2つの機能を有する酵素を詳細に検討することを目的として、*S. tokodaii* の酵素に関して大腸菌での発現系を構築し、その構造解析を試みた。このビオチン酵素は BC、CT、BCCP(ビオチン担持タンパク)の3つのサブユニットから構成されているが(図 2)、そのうち、CT サブユニットの結晶化に成功した。このCTサブユニットは、すでに立体構造が報告されているトランスカルボキシラーゼの CT サブユニットと約 50%の相同性を有しており、分子置換法によりその構造を解くことができた。現在得られた構造の精密化を行いつつ、基質であるプロピオニル-CoA を共存させて結晶化を行い、基質との複合体の構造解析を進めている。



図2 *S. tokodaii* のビオチン酵素のドメイン配置

References

- [1] S. Kondo, Y. Nakajima, S. Sugio, Y-B. Jin, S. Sueda, H. Kondo, *Acta Cryst. D*, **60**, 486-492 (2004)
- [2] Y-B. Jin, Md. N. Islam, S. Sueda, H. Kondo, *Biochemistry*, **43**, 5912-5920 (2004)
- [3] S. Sueda, Md. N. Islam, H. Kondo, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1391-1400 (2004)