

講演番号 : 2C22p09

講演日時、会場 : 3月27日 15:38~ C校舎22会場

Thermus thermophilus 由来リジン生合成系酵素 LysK の結晶構造解析

Crystallographic analysis of LysK involved in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*

○藤田 理美、長谷部 文人、CHO Su-Hee、富田 武郎、葛山 智久、西山 真 (東大生物工学セ)

○Satomi FUJITA, Fumihito HASEBE, Su-Hee CHO, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, Ther Univ. of Tokyo)

バクテリアは一般に、ジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路でリジンを生合成することが知られているが、当研究室において、バクテリアである *Thermus thermophilus* が α -アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生合成することが明らかにされている。AAA以降の反応は、キャリアタンパク質 LysW が基質の α -アミノ基に結合することによって生合成中間体が保護された形で LysX、LysZ、LysY、LysJ、LysK による 5 段階の反応が進行する。LysW が負電荷を帯びているのに対し、結晶構造が明らかになっている生合成酵素群の触媒残基周辺が正に帯電していることから、LysW は各酵素と静電的な相互作用によって認識され、酵素間を受け渡されることで効率的に反応が進行すると推測される。これまで、*T. thermophilus* 由来の LysZ、LysY や、LysX のオルソログである *Sulfolobus* 由来 ArgX において、LysW との複合体の結晶構造解析が行われ、これらの酵素による LysW の認識様式は明らかにされつつあるが、リジン生合成経路の最終反応を担う LysK については酵素単体の結晶構造も未だ明らかにされていない。そこで私たちは、LysK の結晶構造を決定し、その効率的な触媒機構を明らかにすることを目指した。

大腸菌を用いて LysK と LysW の組換えタンパク質を発現させ、精製した。結晶化条件のスクリーニングの結果、リジンおよび LysW を添加した条件下で LysK の結晶を得た。2.4 Å 分解能の X 線回折データを取得し、LysK と 43%の相同性を有する *Sphaerobacter thermophilus* の Sthe_0214 をモデルとした分子置換法により、リジンを結合した LysK の結晶構造を決定することに成功した。

非対称単位には 2 分子の LysK が含まれ、そのうちの 1 分子が活性中心にリジンを結合していた。LysK の活性発現に必要な金属を結合する残基は、zinc-peptidase-like superfamily に属する他の酵素でも保存されていた。LysK において活性中心は分子表面から奥深くに存在し、LysK の表面から活性中心に結合したリジンまでは 11 Å 程度の細い通り道があった。この通り道に LysW の保存された C 末端アミノ酸配列 ⁵⁰EDWGE⁵⁴ を含む extension ドメインが伸びた構造で認識されて、その末端の Glu54 の γ -カルボキシル基に結合したリジンが LysW より切り離されると考えられる。LysK においても通り道の入り口周辺は分子表面が正に帯電していることが明らかになり、負に帯電する LysW の球状ドメインをこの領域が認識している可能性が示唆された。今回の成果は LysW が生合成酵素間でのように受け渡されるかを解明するための大きな一歩であり、相互作用機能の向上による効率的なリジン発酵系酵素の開発につながることを期待される。

lysine biosynthesis, *Thermus thermophilus*, crystal structure