最近の研究から

ビオチンプロテインリガーゼの結晶構造から見た ビオチンの活性化

理化学研究所播磨研究所 国島直樹

Naoki KUNISHIMA: Visualization of Biotin Activation Through a Comparison of Crystal Structures of Biotin Protein Ligase

Biotin protein ligase (BPL) catalyses the synthesis of an activated form of biotin, biotinyl-5'-AMP, from substrates biotin and ATP followed by biotinylation of the biotin carboxyl carrier protein subunit of acetyl-CoA carboxylase. In order to visualize the structural feature of the BPL reaction, crystal structures of BPL from *Pyrococcus horikoshii* OT3 have been determined in an unliganded form and three liganded forms with biotin, ADP and the reaction intermediate biotinyl-5'-AMP. The exact locations of the ligands and the active site residues allow us to propose a general scheme for the first step of the reaction carried out by BPL.

1. ビオチンプロテインリガーゼとは

ビオチンは、ビオチンカルボキシラーゼタンパク質ファミリーに属する一群のオリゴマー酵素に対する補欠分子族であり、多くの動植物の生育に必須なビタミンHとしても知られる。¹⁾ ビオチンカルボキシラーゼは、脂肪酸合成・糖新生・プロピオン酸代謝などにおいて炭酸固定反応を触媒する。例えば脂肪酸合成に関与するビオチンカルボキシラーゼであるアセチル CoA カルボキシラーゼは4種類のサブユニットをもつ分子量45万のオリゴマー酵素で、クエン酸による調節を受けさらに巨大な繊維状ポリマーになることで活性化するというユニークな性質をもつ。²⁾ この炭酸固定反応の中心を担うビオチンは、その吉草酸側鎖カルボキシル基がビオチンカルボキシラーゼのサブユニットである biotin carboxyl carrier protein (BCCP) の特定リジン残基のεアミノ基とアミド結合することで初めて機能する。このBCCP リジン残基とビオチンとの共有結合形成を触媒する酵素がビオチンプロテインリガーゼ (BPL) であり、すべての生物はこのBPLを有している。³⁾

BPLによるタンパク質のビオチン化は次のような2段階の反応で進む(図1)。1段階目はATPによるビオチンのアデニル酸化であり、Mg²⁺が必要であると考えられている。このビオチン活性化反応によりビオチニル 5'AMPと呼ばれる中間体が生じる。この不安定な混合酸無水物であるビオチニル 5'AMPは、不思議なことにBPLと結合した状態では安定である。続く2段階目でビオチニル 5'AMPのビオチニル基がBCCP リジン残基のεアミノ基に転移し、ビオチン化が完了する。反応機構の詳細な議論のため

には、原子レベルの分解能の立体構造をさまざまな条件で決定し、それらを比較検討する必要がある。しかし、これまでのところBPLの立体構造は大腸菌由来のBirAと呼

図1 ビオチンプロテインリガーゼによるBCCPのビオチン化。(Biotinylation of BCCP by biotin protein ligase.)

ばれる酵素 (*EcBirA*) でしか報告されていない。約 320 アミノ酸残基からなる *EcBirA* の X 線結晶構造解析^{4),5)} によると、この BPL は N 末端の DNA 結合ドメイン (約 60 残基)・中央の触媒ドメイン (約 210 残基)・BCCP と相互作用する C 末端ドメイン (約 50 残基) の 3 つのドメインをもつ。触媒ドメインにはグリシンに富む逆平行 β シートを底面とする大きな溝があり、ここにリガンドが結合するとみられる。ビオチンとの複合体の結晶構造から、この触媒溝へのビオチンの結合様式については解明されたが、ATP やビオチニル 5'AMP の結合様式は謎のままである。また、*EcBirA* はその DNA 結合ドメインを使うことで脂肪酸合成のリプレッサーとしても機能することが知られており、これは高等生物を含めたさまざまな生物由来の BPL に広くみられる性質である。³⁾ ところが古細菌の多くと一部の真正細菌由来の BPL にはこの DNA 結合ドメインを欠く一群が存在し、これらは純粋に酵素として働くと考えられている。⁶⁾ DNA 結合ドメインありなしの 2 タイプの BPL を両方とも生物も存在し、両者の使い分けに興味もたれる。

われわれは、DNA 結合ドメインを欠く BPL として初めて、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 BPL (*PhBPL*) の結晶構造を決定した。⁷⁾ 幸運なことに、この *PhBPL* はさまざまなリガンドとの複合体結晶を容易に調製することができたため、BPL の反応機構についての理解がより深まった。本稿では最新の知見も交え、*PhBPL* の結晶構造から見たビオチンの活性化について概説する。

2. ビオチンプロテインリガーゼの結晶構造

2.1 構造決定

235 アミノ酸残基からなる全長 *PhBPL* の遺伝子は、理研ゲノム科学総合研究センターにおいて超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 ゲノムからクローニングした。大腸菌の発現系を用いた大量発現および精製は、理研放射光科学総合研究センターストラクチュローム研究グループにおけるタンパク質ルーチン調製システムを利用して行った。セレノメチオニン置換タンパク質も同システムを利用して調製した。

結晶化条件の初期スクリーニングは、理研放射光科学総合研究センター先端タンパク質結晶学研究グループにおける自動結晶化ロボット TERA システム⁸⁾ を利用し、オイルマイクロバッチ法により行った。最終的な結晶化条件は以下のとおりである。すなわち、1 μ l のタンパク質溶液 (9.9 mg/ml *PhBPL*, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) と 1 μ l の結晶化剤溶液 (10.5 % PEG2000, 100 mM acetate-NaOH pH 5.5) を結晶化プレート (Nunc HLA plate) のウェルに入れて混合後、パラフィン-シリコン混合オイルを重層して 18 $^{\circ}$ C で静置した。セットアップ後 2 週間ほどで、単斜晶系の結晶が解析に適した大きさ (約 0.4 $\times$ 0.15 $\times$ 0.1 mm) にまで成長した。各種リガンド結合型結晶は、リガンド濃度 5 mM での共結晶法により調製した。ビオチニル 5'AMP 結合型は、ATP およびビオチンとの共結晶化で得た。

X 線回折データ測定は、理研構造ゲノムビームライン BL26B1 においてクライオプロテクション法 (抗凍結剤: 10.5 % PEG2000, 20 % (v/v) glycerol, 100 mM acetate-NaOH pH 5.5) を用い 100 K で行った。プログラム HKL2000 を用いて回折データを処理した結果、リガンド非結合型および各種リガンド結合型結晶はどれも空間群 $P2_1$ に属するほぼ同型の結晶で、分解能は 1.45 $\text{\AA}$ ないし 1.6 $\text{\AA}$ であった。興味深いことにビオチニル 5'AMP 結合型が最も高分解能の結晶を与えた。非結合型結晶は 1.6 $\text{\AA}$ 分解能で、その格子定数は $a = 38.60 \text{ \AA}$, $b = 78.26 \text{ \AA}$, $c = 70.15 \text{ \AA}$, $\beta = 101.5^{\circ}$ であった。

構造決定は、まず多波長異常分散 (MAD) 法によりセレノメチオニン置換型結晶について行った。プログラム SOLVE/RESOLVE を適用した結果、6 つのセレノ原子のうち 4 つが同定され、centric および acentric 反射についての平均の FOM はそれぞれ 0.63 および 0.68 であった。その他の型の結晶構造は、セレノメチオニン置換型結晶構造を初期モデルとしてそれぞれの型の構造因子振幅データを組み合わせ、プログラム CNS1.1 を用いて精密化することで決定した。最終の R 値は 0.192 ないし 0.216, R_{free} 値は 0.213 ないし 0.242 であった。最終モデルの立体化学的妥当性は、プログラム PROCHECK を用いて確認した。これ

図2 *PhBPL* のプロトマー構造. (Protomer structure of *PhBPL*.)

らの結晶構造はPDBに登録済みであり、公開されている(非結合型 1wq7 ; ビオチン結合型 1wpy ; ADP 結合型 1wnl ; ビオチニル 5'AMP 結合型 1wqw).

2.2 全体構造

われわれは *PhBPL* の結晶構造をリガンド非結合型・ビ

図3 *PhBPL* の二量体構造. (Dimer structure of *PhBPL*.)

オチン結合型・ADP 結合型・ビオチニル 5'AMP 結合型の4種類の型で決定した. これらのほぼ同型の結晶は、共通して非対称単位に *PhBPL* プロトマーを2個含んでいる. これら非対称単位内の2つのプロトマーは会合して二量体を形成しているように見える. 一次構造から予想されるように、*PhBPL* プロトマーのドメイン構成は *EcBirA* のそれからDNA結合ドメインを除いた形になっている(図2). すなわち、触媒ドメイン(1-187残基)とC末端ドメイン(188-235残基)の2つのドメインから成り立っており、基本的な折り畳みは *EcBirA* のものと同じである. *PhBPL* 二量体中の2つのプロトマーは非結晶学的2回対称軸で関係付けられ、互いの β_1 ストランド同士が会合してプロトマー間 β シートを形成している(図3). この二量体会合面はプロトマー当たり 1050 Å²の広い接触面積をもつ. *PhBPL* の水溶液中での会合状態を動的光散乱法で調べた

図4 *PhBPL* の活性部位 (a)非結合型 (b) ビオチン結合型 (c) ADP 結合型 (d) ビオチニル 5'AMP 結合型. (*PhBPL* active sites in (a) the unliganded form, and in the liganded forms with (b) biotin, (c) ADP and (d) biotinyl-5'-AMP.)

ところ、やはり二量体で存在していることが示された。これらの事実から、*PhBPL* は結晶構造でみられるような二量体を形成して機能すると考えられる。*EcBirA* もまた二量体として結晶構造が決定されており、その二量体が DNA 結合を通じたりプレッシャー機能に関係していると考えられているが、その会合様式は *PhBPL* 二量体のそれとはまったく異なっている。*BPL* の基質タンパク質である アセチル CoA カルボキシラーゼ BCCP サブユニットとの相対配置とこの会合様式の違いがどのように関係しているかが興味深いところである。

2.3 活性部位

PhBPL 触媒ドメインの触媒溝周辺の立体構造は、*EcBirA* のそれと類似している。さまざまな生物種で広く保存されているアミノ酸残基の立体構造は、触媒機能に関与するせいか特によく似ている。*EcBirA* ではリガンド非結合型とビオチン結合型の結晶構造が報告されているが、われわれは幸運にもそれらに加えて ADP およびビオチニル 5'AMP 結合型の構造を決定できたため、活性部位周辺残基の役割をよりはっきりさせることができた (図 4)。

非結合型と各種リガンド結合型を比較してまず目につくのは、Gly47 から Glu54 にかけてのループ構造の変化である。非結合型ではこのループ部の電子密度は観測されず、おそらく一定の立体構造をとっていないと考えられる (図 4a)。ところが、リガンドが結合することによってこのループ部の電子密度ははっきりと観測されるようになる。この現象はリガンド結合に伴う一種の誘導適合である。リガンド結合による構造変化を定量的に調べるため、非結合型構造を各種結合型構造と対応する C α 原子で重ね合わせたときの r.m.s.d. を計算してみたところ、二量体として比較すると 1.8 Å 程度、プロトマーとして比較すると 1.0 Å 程度となった。プロトマー内の局所構造およびプロトマー間の相対配置の両方ともリガンド結合に伴って有意に変化すると言える。一方、3 種類のリガンド結合型を互いに比較すると r.m.s.d. が 0.5 Å 以下となり、リガンド結合に伴う *PhBPL* の構造変化様式はリガンドの種類にあまり依存しないようである。

リガンド結合型の構造解析として、われわれはまずビオチン結合型の結晶構造を 1.6 Å 分解能で決定した (図 4b)。ビオチン結合型における *PhBPL* のビオチン認識様式は、*EcBirA* のビオチン結合型結晶構造でみられるものとほとんど一致している。したがって、*BPL* のビオチン認識様式は由来生物種の違いや DNA 結合ドメインの有無にかかわらずよく保存されていると言える。次に、これまで報告されていなかったヌクレオチドの結合様式を明らかにするため、ATP を含むさまざまなヌクレオチドとの共結晶化を試した結果、ADP 結合型の結晶構造を 1.6 Å 分解能で決定することに成功した (図 4c)。ADP はビオチン結合部位のすぐ隣のポケットに結合しており、詳細な相互作用様式

が明らかになった。また、ATP 結合型の結晶構造決定にわれわれは最近になって成功し、そのリガンドタンパク質相互作用様式が ADP 結合型でみられるものと基本的に同じであることを確認している。さて、われわれは最後に ATP とビオチンの両方の存在下で *PhBPL* との共結晶化を試み、その結果、幸運にもビオチニル 5'AMP 結合型の結晶構造を 1.45 Å 分解能で決定することに成功した (図 4d)。共結晶化の過程でビオチン活性化反応が起こり、生成したビオチニル 5'AMP が結合した状態で結晶化したものとみられる。ビオチン活性化反応には Mg²⁺ が必要であると考えられているが、注目すべきことにこの結晶化条件には 2 価の金属イオンが含まれていない。そこで、10 mM EDTA 存在下で同じ共結晶化を試みたところ、やはりビオチニル 5'AMP 結合型結晶が得られた。したがって、*PhBPL* の Mg²⁺ に対する親和性が EDTA では完全に止められないほど強い、もしくは *PhBPL* によるビオチン活性化反応に Mg²⁺ が必ずしも必要ではないと考えられる。*PhBPL* の酵素学的解析が報告されていないので、残念ながらどちらが正しいかまだ結論できない。ビオチニル 5'AMP の結合様式は、そのビオチニル基がビオチン結合型におけるビオチンと、アデニル基が ADP 結合型における ADP とそれぞれよく似ており、これは分子全体での C α 原子重ね合わせによる構造比較の結果と合致している。反応過程での活性部位およびリガンドの構造変化を最小限に止めることは、ビオチン活性化反応における重要因子の 1 つなのかもしれない。例えば、ビオチニル 5'AMP が *BPL* の触媒溝に特異的なコンフォメーションを保ったまま深く埋め込まれていることは、この不安定な混合酸無水物の *BPL* による安定化と関係している可能性が高い。

2.4 反応機構

さまざまな条件で決定した *PhBPL* の結晶構造を比較検討することにより、*BPL* によるタンパク質のビオチン化の 1 段階目であるビオチン活性化反応が見えてきた。*PhBPL* に結合した状態での 3 種類のリガンドの位置情報から、ATP とビオチンが同時に *PhBPL* へ結合した場合、おそらく反応すべき ATP の α 位リン酸基とビオチンの吉草酸側鎖カルボキシル基は相互作用可能な程度接近すると考えられる。さらにその近傍のアミノ酸残基を見ると、Arg48・Arg51・Lys111 (触媒ドメイン)・Arg233 (C 末端ドメイン) といった塩基性残基が集中しており、それらの側鎖がリガンドのリン酸基と極性相互作用している。これらの塩基性残基はさまざまな生物種由来の *BPL* で広く保存されているので、少なくとも反応において何らかの役割を担っていると考えられる。これらの事実を総合してビオチン活性化反応機構を考えてみた (図 5)。すなわち、活性部位近傍の塩基性残基および Mg²⁺ の作用で α リン酸基リン原子の求電子性およびビオチンカルボキシル基酸素原子の求核性が高まった結果、ビオチンカルボキシル基の

図5 *PhBPL*によるビオチン活性化反応機構 (a) ビオチン結合型とADP結合型から推定した酵素：ビオチン：ATP三者複合体 (b) 提案される5配位遷移状態 (c) ビオチニル5'AMP結合型で観測された構造。(Biotin activation mechanism for *PhBPL* (a) Estimated BPL : biotin : ATP ternary complex based on biotin liganded and ADP liganded forms (b) Proposed pentacoordinate transition state (c) Observed structure in biotinyl-5'-AMP liganded form.) 点線は極性相互作用を表す。

α リン酸基に対する求核攻撃が起き(図5a)、 α リン酸基の5配位遷移状態(図5b)を経て $\alpha\beta$ 間の結合が切れ、反応が完了する(図5c)。ただし、 Mg^{2+} の役割に関しては、2価金属イオンらしきものが活性部位近傍に見当たらないため今のところ明らかではない。今後、活性部位周辺の保存残基について変異体実験を行い、真の活性残基を特定する必要がある。

3. 今後の展開

本稿では*PhBPL*の結晶構造を基にBPLによるビオチン活性化機構について議論した。これまでBPLの結晶構造解析は*EcBirA*のみで行われていたが、この系ではリガンド結合型結晶の調製が困難だったため、思うように研究が進まなかったようである。本研究のように由来生物を変えて成功する例は、構造ゲノム科学の発展に伴ってこれからさらに増えるのではないかと予想される。今回はBPLによるBCCPビオチン化の1段階目であるビオチン活性化反応について議論したが、 Mg^{2+} の役割をはっきりさせられなかった。筆者らは最近2価金属イオンを含む複合体の結晶構造を得ることに成功したので、別の機会に詳しく議論したい。また、2段階目のビオチニル基転移反応機構を明らかにするため、現在BCCPとの複合体結晶の調製を進めている。筆者らはオリゴマー化とタンパク質機能の関わりに基本的な興味をもっており、将来的に本研究が巨大オリゴマー酵素であるビオチンカルボキシラーゼの構造生物学的理解につながることを期待している。

文 献

- 1) J. R. Knowles: *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 195 (1989).
- 2) N. B. Beaty and M. D. Lane: *J. Biol. Chem.* **258**, 13043 (1983).
- 3) A. Chapman-Smith and J. E. Cronan Jr: *Trends Biochem. Sci.* **24**, 359 (1999).
- 4) K. P. Wilson, L. M. Shewchuk, R. G. Brennan, A. J. Otsuka and B. W. Matthews: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9257 (1992).
- 5) L. H. Weaver, K. Kwon, D. Becket and B. W. Matthews: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 6045 (2001).
- 6) D. A. Rodionov, A. A. Mironov and M. S. Gelfand: *Genome Res.* **12**, 1507 (2002).
- 7) B. Bagautdinov, C. Kuroishi, M. Sugahara and N. Kunishima: *J. Mol. Biol.* **353**, 322 (2005).
- 8) M. Sugahara and M. Miyano: 蛋白質核酸酵素 **47**, 1026 (2002).

プロフィール

国島直樹 Naoki KUNISHIMA
独立行政法人理化学研究所 播磨研究所 放射光科学総合研究センター 先端タンパク質結晶学研究グループ
Advanced Protein Crystallography Research Group, RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: kunishima@spring8.or.jp
最終学歴：大阪大学大学院博士課程 博士(理学)
専門分野：蛋白質X線結晶構造解析
現在の研究テーマ：構造ゲノム科学のための蛋白質結晶構造解析の効率化。オリゴマー蛋白質の構造生物学
趣味：音楽鑑賞