

ペプチド転移酵素 Sortase A の Ca(II) 配位部位における金属および配位子置換が酵素反応性に及ぼす影響

(同志社女子大・薬¹) ○清水恭子¹・根木滋¹

Effect of metal and ligand substitutions on Ca(II) coordination site of Sortase A on enzymatic reactivity of transpeptidase reaction (¹Fac. Pharm. Sci. Doshisha women's college Liberal Arts) ○Kyoko Shimizu,¹ Shigeru Negi¹

Sortase A is a transpeptidase derived from *staphylococcus aureus* that contains one Ca(II) in its active site. Sortase A can be used to catalyze the in vitro ligation of fragments containing a C-terminal LPETG motif with fragments containing several N-terminal glycines. Here, We prepared several mutants in which Ca(II) was replaced with various metal ions, and five amino acids involved in Ca(II) coordination were mutated to Ala to investigate the effects of the mutation on the enzymatic reaction. We observed that the reactivity was significantly affected by metal substitution. In particular, the enzymatic reaction was completely abolished by substitution with Cu(II), which appears to be involved in the antibacterial activity of Cu(II). Furthermore, in the case of ligand-substituted mutants, namely, E108A and N114A, the reactivity was significantly reduced, suggesting that both amino acid residues play an important role in the stability of the Ca(II) coordination structure and enzymatic reactivity.

Keywords : Sortase A; transpeptidase; metal substitution; enzymatic reaction; ligand substitution

Sortase A は黄色ブドウ球菌の細胞膜に局在するペプチド転移酵素で、C 末端側の 5 つの特異的アミノ酸配列 LPETG を認識し、細胞壁の N 末端側のペプチドグリカンのポリグリシン部位と縮合することで細胞壁表面に固定されタンパク質が突出する。(Fig.1)この一連の反応に関わる Sortase A は、活性ドメインに 1 つの Ca(II)を含んでいる。今回我々は、Ca(II)を他の金属イオンに置換した変異体、さらに Ca(II)配位に関与している 5 つのアミノ酸をそれぞれ点変異させた変異体を作成し、それらの酵素反応に与える影響について検討した。その結果、置換される金属によって反応性が大きく異なり、特に Cu(II)置換体においては全く反応が進行せず、さらに Ca(II)と Cu(II)の競合実験においても、Cu(II)の存在により酵素反応が阻害された。また、β3/β4 ループ上にある配位子置換体である E108A および N114A は著しく反応性が低下したため、この配位に関与しているアミノ酸が特に触媒活性に重要な役割を果たしていると考えられ、触媒活性に対する配位子の非等価性が明らかとなった。

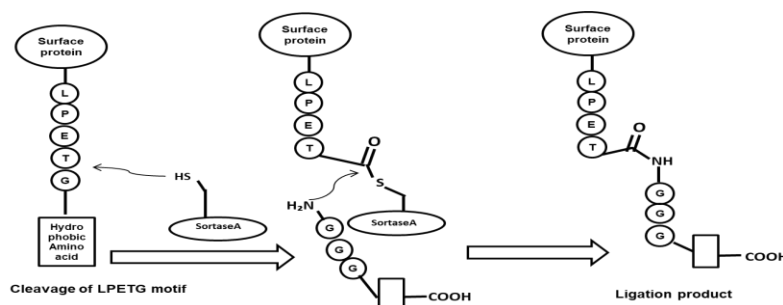


Fig.1 Specific transpeptidation recognized LPETG motif by Sortase A.