

論文

ペプチド転移酵素 Sortase A が
触媒する transpeptidation 反応に対する
Ca²⁺濃度、反応温度、E105点変異、
外因性金属イオンの効果に関する研究

¹羽 森 真 美 ²清 水 恭 子 ³佐 藤 綾 花
⁴芝 田 信 人 ⁵杉 浦 幸 雄 ⁶根 木 滋

¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助教（有期）

²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・2021年度卒業

³同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・2018年度卒業

⁴同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授

⁵同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・元教授

⁶同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・准教授

Effects of Ca²⁺ concentration, reaction temperature,
E105 point mutation, and exogenous metal ion
on the transpeptidation reaction of transpeptidase Sortase A

¹HAMORI Mami ²SHIMIZU Kyoko ³SATO Ayaka
⁴SHIBATA Nobuhito ⁵SUGIURA Yukio ⁶NEGI Shigeru

¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Assistant professor (contract)

²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2021

³Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2018

⁴Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

⁵Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Former professor

⁶Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College of Liberal Arts, Associate professor

Abstract

Sortase A is a transpeptidase from *Staphylococcus aureus* that recognizes five specific amino acid sequences, LPETG, and binds them to polyglycine on the cell wall surface, immobilizing

the target protein on the cell wall surface. Sortase A contains one Ca^{2+} as a co-factor in its structure, and Ca^{2+} plays an important role in the enzymatic reaction. First, the time course of the enzymatic reaction, the optimal Ca^{2+} concentration, and the optimal reaction temperature were investigated using wild-type Sortase A. Next, we focused on E105, an amino acid residue that has been reported to play an important role in Ca^{2+} binding. We prepared point mutants in which E105 was replaced with non-coordinating Ala residues and coordinating amino acid residues (Asp, Cys, His) with Lewis base moieties on the side chains and examined the enzymatic reaction in the presence of Ca^{2+} and its cognate elements, Mg^{2+} and Sr^{2+} .

The result was the clarification of the optimal Ca^{2+} concentration and the optimal reaction temperature range for the enzymatic reaction. In the case of Ca^{2+} in the wild-type and E105 mutants, the reactivity was $\text{WT} \approx \text{E105D} < \text{E105C} < \text{E105A} < \text{E105H}$, indicating that the enzymatic reaction is affected by the Lewis basicity of the ligand and the steric structure of the side chain. For Sr^{2+} , the same trend of reactivity as Ca^{2+} was observed, but the overall reactivity decreased. However, for Mg^{2+} , reactivity was significantly decreased in all cases, indicating the significant effect of ionic radius on the enzymatic reaction.

【緒言】

タンパク質の特異的な修飾法の開発は、天然のタンパク質の構造、機能解析やタンパク質工学の研究分野において有用なツールとなることが期待されており、近年盛んに研究がなされている¹⁾。その中でも、*Staphylococcus aureus* 由来のペプチド転移酵素 (transpeptidase) である Sortase A を利用したタンパク質修飾に関する研究が精力的に行われており、様々な合成化学や創薬への利用が試みられている²⁾³⁾。

Sortase A は、タンパク質の N 末端および C 末端にラベルを付加することで、翻訳後修飾を行う *in vitro* ツールとして広く用いられている。これらのラベルには、ビオチン、蛍光色素、架橋剤、多機能プローブなどがある。この酵素反応では、片方の端に LPXTG モチーフ、もう片方の端に (Gly)*n* モチーフを含むように設計された分子が必要となる。Sortase A は、LPXTG モチーフの特定のアミノ酸配列を認識し、配列中の Cys184 残基のスルフヒドリル基を利用して、LPXTG モチーフの Thr と Gly 骨格の間を切断する (Fig. 1)。LPXTG モチーフが切断されると、Sortase A は設計された分子との間にチオエステル中間体を形成する⁴⁾ (Fig. 1)。この中間体は、(Gly)*n* を含む分子

の求核攻撃により分解され、新たに 2 分子間にペプチド結合が形成される。その結果、LPXT (Gly)*n* 配列を介して 2 つの分子の融合体が形成される (Fig. 1)。Clubb らは、これまでに NMR を用いて Sortase A の構造解析を行っている⁵⁾ (PDB : 1IJA) (Fig. 2 A)。Sortase A は、2 つの短いヘリックスといくつかのループ

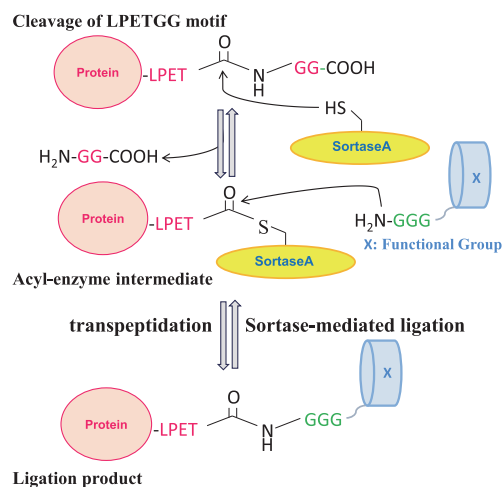


Figure 1. Functional group attachment to target protein through Sortase A-catalyzed site specific transpeptidation reaction.

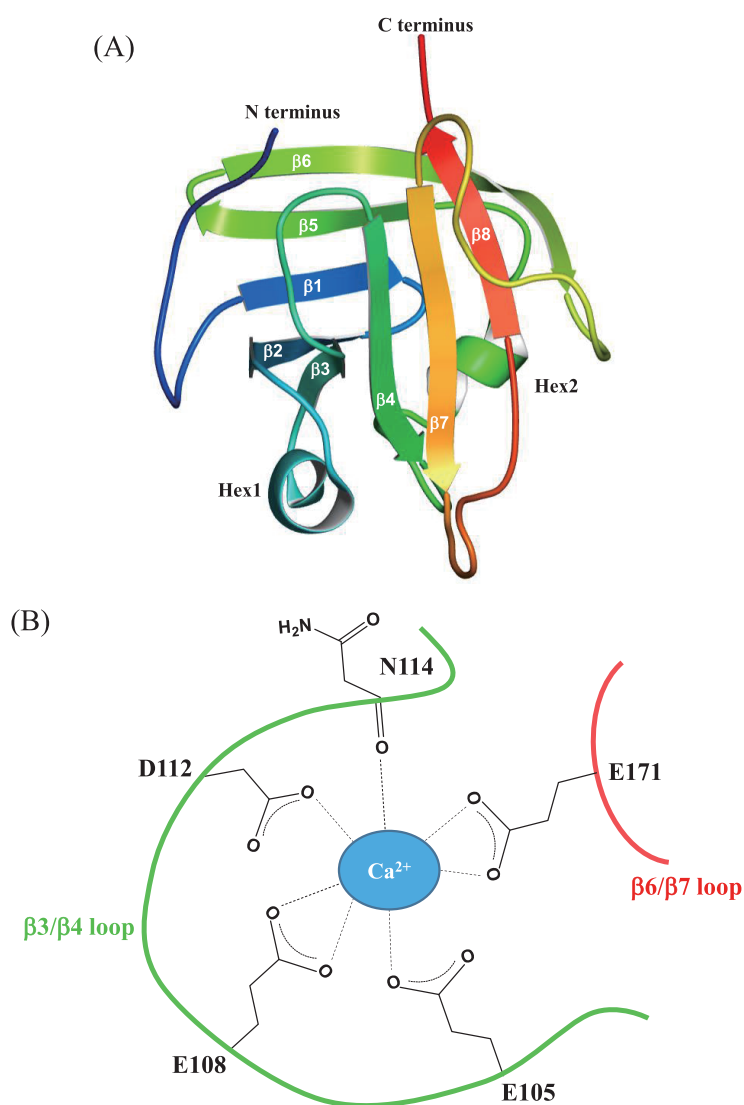


Figure 2. Ribbon drawing of the structure of Sortase A (PDB: 1IJA) (A), and schematic showing of Ca^{2+} ion coordination by Sortase A and amino acid (B).

を含む、8本鎖の β -バレル構造を有している。また Sortase A の酵素活性には、コファクターとしての Ca^{2+} を必要とし、 Ca^{2+} が Sortase A の活性部位のループ構造とループの動的な制御をすることでアロステリックに触媒作用を活性化すると考えられている^{6) 7)} (Fig. 2 B)。

NMR の構造解析で直接的に Sortase A の Ca^{2+} の結合サイトを決定することはできない。しかし Clubb らは、 Ca^{2+} の結合により配位部位近傍のアミノ酸の NMR スペクトルに大きな変化が生じると考え、 Ca^{2+} 存在下と非存在下の Sortase A の NMR スペクトルを比較し

て Ca^{2+} の結合に関与するアミノ酸残基を解析した⁵⁾。その結果、 $\beta 3/\beta 4$ ループに存在する E105、E108、D112、N114 が Ca^{2+} の結合への関与が考えられ、さらに $\beta 6/\beta 7$ ループに存在する E171 の関与も予想されている。Nagamune らは Sortase A の配位性アミノ酸に注目して種々の変異体を作成して酵素反応について検討を行い、E105A/E108A 変異体が Ca^{2+} 非依存的に transpeptidation 反応を触媒することを見出している⁶⁾。このことから、 Ca^{2+} の結合に関与しているアミノ酸残基の重要性が認識され、配位部位をリデザインすることにより新たな機能を有する Sortase A を創製できる可能性があると考えられる。

本研究では、Sortase A の transpeptidation 反応の経時変化、さらに反応の至適 Ca^{2+} 濃度および至適反応温度について検討した。さらに、 Ca^{2+} の結合に関与しているアミノ酸残基に対する基礎的な知見を得る目的で、 Ca^{2+} 配位に関与するアミノ酸の一つである E105 に注目し、Sortase A における transpeptidation 反応についての検討を行った。E105 を非配位性の Ala 残基および配位性アミノ酸である Asp、Cys、His に点変異させて、それぞれの transpeptidation 反応を検討した。さらに野生型および点変異体に対して Ca^{2+} 、またそれ以外に Ca^{2+} の同族元素である Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 存在下における transpeptidation 反応も合わせて検討した。

【実験方法】

1. モデルペプチド LPETG、G3pep の合成

反応基質としての LPTEG および G3pep は Fmoc 固相合成法により島津 PSSM-8 合成機を

用いて合成した。樹脂として TGS-RAM (島津製作所、京都、日本) を用い、樹脂に担持されている反応点に対して 10 当量の Fmoc アミノ酸を用い、HBTU/HOBT を縮合剤としてペプチド固相合成を行った。反応後の樹脂をデシケーターで乾燥させ、そこに脱保護カクテル溶液 (トリフルオロ酢酸/1, 2-エタンジチオ/チオアニソール/トリエチルシラン/水 = 86/5/5/1.5/2.5%) を加えて 6 時間反応させて、樹脂からペプチドの切り出し、および側鎖を脱保護した。次に、脱保護されたカクテル溶液を、窒素ガスを用いて蒸発させ、これに氷浴中で大過剰のジエチルエーテルを加えて白色の沈殿物を得た。得られた白色沈殿物を遠心分離し、減圧下で乾燥させた後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (日本分光株式会社、東京、日本) で以下の条件で分取した。HPLC 条件: カラム、COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (ナカライテスク株式会社、京都、日本); 検出 UV、240 nm; 流速、2.0 mL/min; 溶離条件、H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA) : 90/10、HPLC 精製後、Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (ブルカー、ビレリカ、アメリカ合衆国) により目的ペプチドの同定を行なった。Table 1 にモデルペプチドの配列、ペプチドの理論分子量および MALDI-TOF MASS スペクトルから得られた実測値の分子量をそれぞれ示す。

2. Sortase A 点変異体の大腸菌タンパク発現系ベクターの作製

当研究室でこれまでに作成した野生型 Sortase A の遺伝子をコードした pET-30b(+) を鋳型 DNA として用い、点変異の導入には、

Table 1. Amino acid sequences and MS analysis of synthetic peptide.

Peptide	Sequence	Calculated	Measured
LPETG	R-E-L-P-E-T-G-K-R-Y-NH ₂	1247.42	1248.447
G3pep	G-G-G-R-R-N-R-R-T-S-K-L-M-L-R-T-NH ₂	1920.28	1920.548

KOD-Plus Mutagenesis Kit (東洋紡、大阪、日本) を用いて行った。プライマーはとして、Forward : 5'-CGGGGTACCCAAGCTAAA CCTCAAATTCGG-3' (T_m : 67.9°C)、Reverse : 5'-GCGAGCTCTTATTTGACTTCTGTA GCTACAAAGATTTTACG-3' (T_m : 67.0°C) を用いた。インバース PCR 反応の反応条件を Table 2 に示す。インバース PCR 反応後、PCR 産物に Dpn I (2 μL) (東洋紡、大阪、日本) を加え、37°C で 1 時間、酵素処理を行なった。次に、Dpn I 処理済みの PCR 産物 (2 μL) に KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡、大阪、日本) の Ligation high (5 μL)、T4 Polynucleotide Kinase (5 μL) を加え、1 時間、16°C で Self-Ligation 反応を行った。反応後、形質転換は、反応液 1 μL を大腸菌 ECOS Competent E. coli DH5 α (株式会社ニッポンジーン、東京、日本) に加え、氷上で 5 分間インキュベートした後、42°C で 45 秒間インキュベートし、さらに氷上で 2 分間インキュベートすることで行った。その後、90 μL の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間インキュベートし、SOC 培地をカナマイシン (Kan) を含む LB 寒天培地にまいた。得られた単一コロニーに対して DNA シークエンスチェックを行い、野生型 Sortase A への点変異の導入を確認した。

Table 2. Solution composition of Inverse PCR reaction for Sortase A.

Fw primer (10 μM)	1.5 μL
Rev primer (10 μM)	1.5 μL
Plasmid DNA (50 ng/ μL)	1 μL
x10 Buffer for iPCR ^a	5 μL
2 mM dNTPs ^a	5 μL
KOD-Plus- ^a	1 μL
Milli-Q	35 μL
Total	50 μL

^a KOD-Plus-Mutagenesis Kit, purchased from TOYOBO.

3. Sortase A のタンパク質発現および精製

作成したタンパク質発現ベクターをタンパク質発現用大腸菌株 RosettaTM 2 (DE3) pLysS Competent Cells (メルク株式会社、ダルムシュタット、ドイツ) に形質転換し、Sortase A のタンパク質発現を行った。プラスミド溶液 (50 ng/mL) を大腸菌コンピテントセルに 1 μL 加えて、上述の方法と同様に形質転換を行い、Kan を含む LB プレートに撒き一晚培養を行った。得られたコロニーすべてを、Kan を含む LB 培地 500 mL に移して 37°C、130 rpm で O.D. が 0.5~0.6 付近になるまで震とう培養した後、氷上で冷却した後、1 M イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) 50 μL を加えた。その後さらに 23°C、回転数 90 rpm の振とう条件で一晩培養した。培養終了後、250 mL 遠沈管を用いて培養液を遠心分離 (7000 rpm) することにより菌体ペレットを得た。そこに 30 mL のソニケーション液 (20 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 0.1% NP-40) を加えて菌体を分散させ、氷浴中で超音波粉碎することで可溶画分として目的タンパク質を溶出させた。得られた可溶化区分に対して、アフィニティークロマトグラフィー精製 (His-tag 精製; cOmplete His-Tag Purification Resin) (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、東京、日本) を行った。Ni(II)-NTA カラムを 40 mL の平衡化液 (20 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) にて平衡化した後、可溶画分を 2 回 Ni(II)-NTA カラムに加えてタンパク質を樹脂に吸着させた。さらに 60 mL の洗浄液 (20 mM HEPES (pH 7.5), 20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) にて洗浄した後、20 mL の精製液 (20 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 400 mM imidazole, 0.5 mM TCEP) を用いて精製し目的タンパク質を溶出させた。得られたフラクションに対し、12% SDS-PAGE を用い、目的タンパク質の発現を確認した。その後、イミダゾールを除去し高純粋のタンパク質

を得るために Superdex™ 75 10/300 GL (GEヘルスケア、シカゴ、アメリカ合衆国) を用いてゲルろ過精製を行った。

4. Sortase Aを用いた transpeptidation 反応の検討

基本的な transpeptidation 反応の条件としては、150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 50 μL 中に、Sortase A, LPETG および G3pep をそれぞれ20 μM , 100 μM および100 μM になるように調製し、37°Cで1時間反応させた。transpeptidation 反応を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (ナカライテスク株式会社、京都、日本)) で追跡し、HPLC チャートの各ピーク面積比から反応の進行度を算出した。野生型 Sortase A に Ca^{2+} を配位させたときの反応をもとに反応進行度を正規化して、変異体との反応性の違いを調べた。transpeptidation 反応の経時的変化 (5、10、20、40、60、120、180 および240 min)、transpeptidation 反応における Ca^{2+} の至適濃度 (0、2.5、5、10、15、20 および25 mM) および至適反応温度 (17、27、37、47 および57°C) の検討をそれぞれ行った。

【結果・考察】

1. Sortase Aを用いた transpeptidation 反応

はじめに、野生型 Sortase A の transpeptidation 反応のタイムコース、transpeptidation 反応に対する Ca^{2+} 濃度および反応温度の効果について検討を行った。野生型 Sortase A のペプチド transpeptidation 反応のタイムコースを測定した結果を Fig. 3 に示す。その結果、反応は初期段階から速やかに進行したが、反応時間が60分付近で反応が平衡に達し、それ以降は進行しなかった。これまでの報告から、Sortase A による transpeptidation 反応は平衡反応であることが分かっているので、今回得られた結果もこれまでの報告結果に準じていると考えられる⁸⁾ (Fig. 1)。また、この条件にお

ける生成物の収率は約35%であった。

続いて、Fig. 4 に transpeptidation 反応における Ca^{2+} の濃度変化の結果を示す。その結果、 Ca^{2+} 濃度が2.5 mM のときに反応収率は約30%で、 Ca^{2+} 濃度が5~10 mM の領域で収率が最も高くなり、約40%であった。その後、

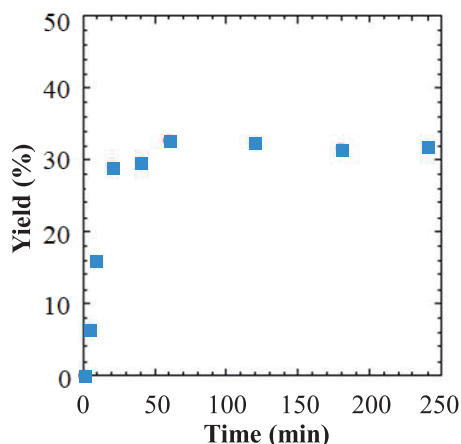


Figure 3. Transpeptidation reaction of LPETG with G3pep by Sortase A by 37°C (0, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 min).

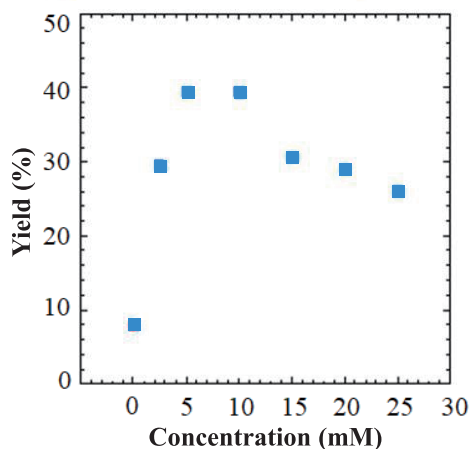


Figure 4. Transpeptidation reaction of LPETG with G3pep by Sortase A comparison of concentration change (0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 mM).

Ca^{2+} 濃度の上昇とともに反応性は緩やかに低下した。結果より、2.5~25 mM の広い範囲の Ca^{2+} 濃度で、transpeptidation 反応の活性が維持されていることがわかった。実際、細胞外の Ca^{2+} 濃度は1~2 mM 程度であることから、これらの結果は、生体内において *Staphylococcus aureus* 由来の Sortase A が細胞膜表面で効率的に transpeptidation 反応を行うことができることを裏付けている。また、 Ca^{2+} 濃度が 0 mM の条件でも反応はわずかに進行することがわかった。

次に transpeptidation 反応における温度効果の結果を Fig. 5 に示す。その結果、今回行った17~57℃の温度範囲では transpeptidation 反応が失活することなく、30~40℃付近で反応収率が最大値を示し、その収率の値は、約40%であった。この結果も、 Ca^{2+} の濃度の変化の実験と同様に、生体内の温度領域で Sortase A が最も高い反応性を示すことが明らかとなった。さらに興味深いことに、一般的にはタンパク質の変性が生じ始める50℃以上においても、Sortase A は酵素活性を保持していることが明らかとなった。

以上の結果により、野生型 Sortase A の

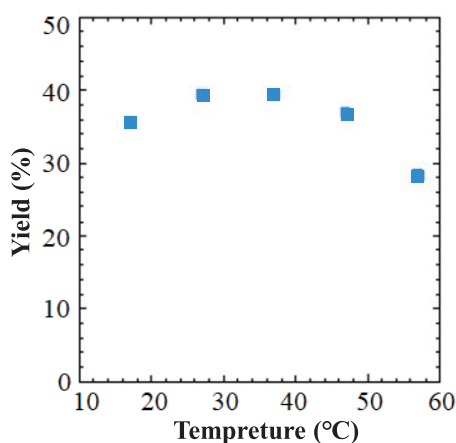


Figure 5. Transpeptidation reaction of LPETG with G3pep by Sortase A by temperature change (17, 27, 37, 47, 57°C).

transpeptidation 反応活性は比較的広い Ca^{2+} 濃度および温度範囲で保持されていることが明らかとなった。また今回の実験においては、transpeptidation 反応の至適濃度は5 mM、至適温度は37℃であることが分かり、これ以降の実験においては、この条件を用いて検討を行った。

2. E105残基の点変異 Sortase A の transpeptidation 活性および Ca^{2+} 同族イオンの添加効果

Sortase A の transpeptidation 反応の活性化には、コファクターである Ca^{2+} の結合が重要である。上述したように、 Ca^{2+} の結合には $\beta 3/\beta 4$ ループに存在する E105、E108、D112、N114および $\beta 6/\beta 7$ ループに存在する E171のアミノ酸残基が関与していると考えられている⁵⁾。今回は、その中の E105に着目し、それを非配位性の Ala 残基および Glu 残基以外の配位性側鎖を有するアミノ酸残基 (Asp, Cys, His) (Fig. 6) に置換した点変異体を作成し、transpeptidation 反応を行い、反応性の違いについて比較検討した。さらに、 Ca^{2+} の同族である Mg^{2+} および Sr^{2+} がそれぞれ存在している場合の反応性も合わせて検討を行った。Fig. 7 にその結果を示す。

まず、 Ca^{2+} 存在下における野生型と E105変異体との反応性の違いについて比較検討した。その結果、野生型および E105D の反応性はほぼ同程度であった。Asp は Glu に比べて側鎖の長さがメチレン基1つ分短い、側鎖末端の Ca^{2+} 結合に関与する Lewis 塩基部位である COOH 基は同じである。したがって、この結果から、側鎖の鎖長の違いが反応性にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。次に E105C の場合、野生型より、やや反応性が低くなった。Cys の場合、Glu に比べて側鎖の長さがメチレン基1つ分短く、さらに側鎖末端の Ca^{2+} 結合に関与する官能基が SH 基に置き換わっている。この結果から、側鎖アルキル鎖長の効果は Asp の場合と同じだと考えると、

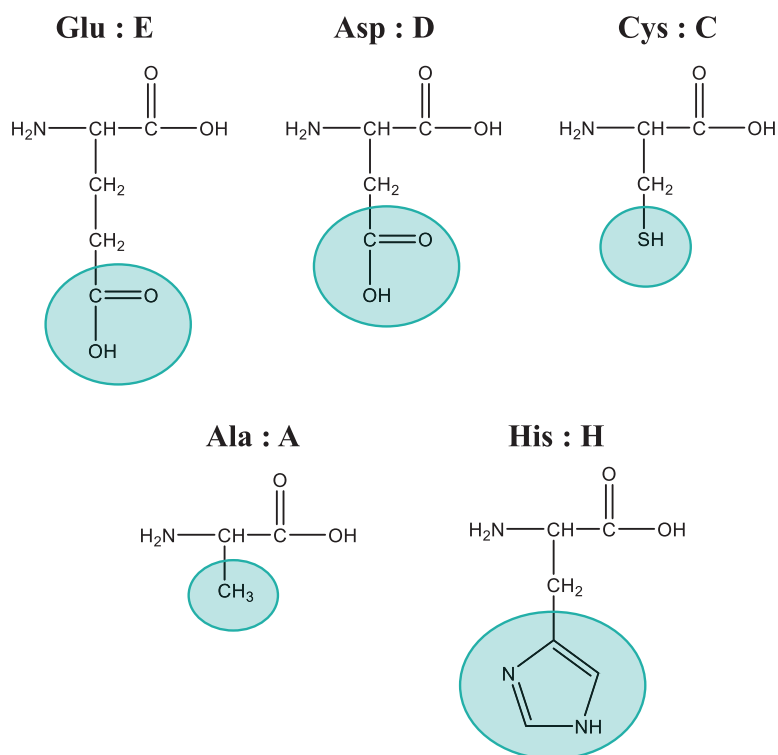


Figure 6. Structure of the amino acids used for the point mutation of E105 in Sortase A.

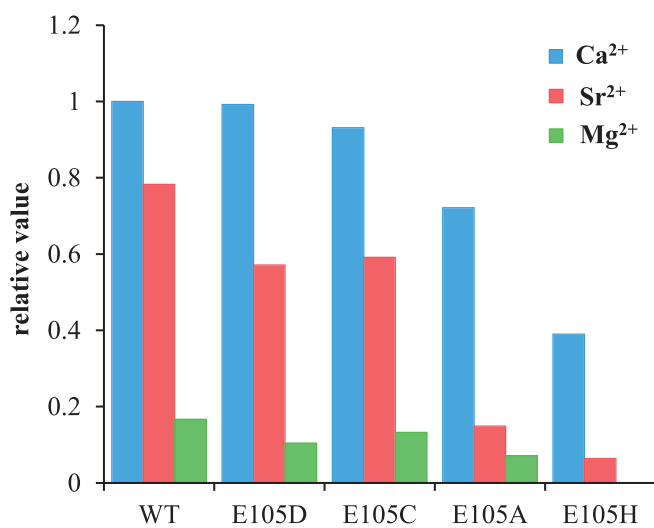


Figure 7. Comparison of transpeptidation reactions of wild-type and E105 substitution mutants of Sortase A in the presence of Ca^{2+} , Sr^{2+} , and Mg^{2+} .

この反応性の違いは、側鎖の COOH 基と SH 基との Lewis 塩基性の違いにより生じている可能性が示唆された。一方、E105A の場合、Ala の側鎖が非配位性であることから、Sortase A の反応性が著しく低下することが予想されたが、実際には野生型に比べて約30%程度しか反応性は低下しておらず、酵素活性がある程度保持されていることがわかった。これまでの報告で、 Ca^{2+} 結合に関与する E108を Ala に置換した場合に Sortase A の反応性が著しく低下することが報告されている⁶⁾。このことから、E105は Ca^{2+} 結合には関与しているものの、酵素反応の活性化にはあまり重要ではなく、 Ca^{2+} 結合を維持するには E105以外の残りの4つのアミノ酸残基で十分であることが推察された。また、 Ca^{2+} 結合に関与するアミノ酸残基の非等価性も示唆された。さらに、E105H では、金属配位能を持つイミダゾール基を側鎖に持つにもかかわらず、反応性は野生型の約40%程度となり、非配位性の側鎖を持つ E105A よりも反応性が低くなった。Fig. 6 の His の構造を見ると、イミダゾール基が存在するため、他のアミノ酸残基の側鎖よりも立体的にかさ高いことがわかる。したがって、E105H の場合、 Ca^{2+} 結合は、側鎖の Lewis 塩基性や電子的効果よりもむしろ立体的効果によって反応が阻害されていると考えられた。次に、 Ca^{2+} と同族元素である、 Mg^{2+} または Sr^{2+} 存在下における transpeptidation 反応について検討を行った。野生型である E105に Sr^{2+} を存在させた場合、約20%程度の反応性の低下がみられた。 Ca^{2+} の場合は、野生型と E105D および E105C の間で反応性がわずかに低下するだけであったが、 Sr^{2+} の場合では E105D および E105C とともに Ca^{2+} に配位した野生型 (WT/ Ca^{2+}) を基準にすると、反応性が約40%も低下した。さらに、E105A および E105H では、 Ca^{2+} が配位した場合に比べて反応性が60%以上も低下していたことから、 Sr^{2+} では、 Ca^{2+} の場合よりも全体的に反応性が低下しており、さらに点変異の反応性への影響がより顕著であることがわかった。次

に Mg^{2+} の場合では、野生型およびすべての変異体において反応性が20%未満と著しく低下し、特に E105H では全く反応が進行しなかった。以前の研究において、Sortase A の transpeptidation 反応において、 Ca^{2+} の代わりに Mn^{2+} や Mg^{2+} を用いても、酵素活性がある程度維持されることが報告されている⁵⁾。しかし、今回の結果では、野生型、点変異体ともに反応性が著しく低下しており、 Mg^{2+} が酵素活性を阻害している可能性が示唆された。この金属置換による Sortase A の酵素反応性の違いは、同族元素の配位パターンが基本的に類似していると仮定すれば、おそらくイオン半径の違いに大きく関係していると考えられる。ここで、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} および Mg^{2+} の各イオン半径は、それぞれ1.14Å、1.32Å および0.86Å である。 Sr^{2+} の場合、E105A および E105H で金属置換の効果がより顕著に認められた。 Sr^{2+} のイオン半径は Ca^{2+} のイオン半径よりも約0.2Å 大きい。イオン半径が大きくなると、E105A では Ca^{2+} の場合とは異なり、残りの4つの配位アミノ酸が十分に安定した配位構造を形成できなくなり、また E105H では側鎖のイミダゾール基の立体障害が顕著になり、両者の反応性は Ca^{2+} よりもさらに低下したと示唆される。一方、 Mg^{2+} のイオン半径は Ca^{2+} よりも約0.3Å 小さく、配位子と Mg^{2+} との空間的な距離関係が適切でなくなり、その結果配位結合が形成されにくくなり、反応性が著しく低下したと考えられる。以上の結果から、Sortase A の transpeptidation 反応には、配位子の Lewis 塩基性や構造、さらにコファクターである金属イオンのイオン半径が大きく関与し、それらの違いが酵素反応に大きな影響を与えることが明らかとなった。

【結論】

本研究では Sortase A による transpeptidation 反応に関する基礎的な研究を実施した。 Ca^{2+} 濃度および反応温度の検討では、比較的広い Ca^{2+} 濃度および温度範囲で transpeptidation 反応の活性が保持されていることが明らかとなっ

た。Ca²⁺配位に関与する E105残基を点変異させた結果、E105は Ca²⁺結合に関与しているものの、酵素反応の活性化にはあまり重要ではなく、Ca²⁺結合を維持するにはE105以外のアミノ酸残基で十分であることが示唆された。さらに、Ca²⁺以外の金属イオンの添加効果を検討したところ、イオン半径が反応性に大きく関与しており、Mg²⁺では酵素反応を大きく阻害することがわかった。今後は、Ca²⁺結合に重要な E105以外のリガンドについても検討することで、より詳細な配位構造と反応性の研究が可能になると考えられる。また、今回は Ca²⁺の同族元素に限って金属置換の実験を行ったが、今後は、配位子置換と組み合わせて、遷移金属などの外因性金属イオンが反応性に与える影響を検討したい。さらに、配位部位をリデザインすることにより新たな機能性を有する Sortase A の創製につながるとの期待される。

【参考文献】

- 1) Yang, R.; Wong, Y. H.; Nguyen, G. K. T.; Tam, J. P.; Lescar, J.; Wu, B. Engineering a Catalytically Efficient Recombinant Protein Ligase. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (15), 5351-5358. DOI: 10.1021/jacs.6b12637.
- 2) Mao, H.; Hart, S. A.; Schink, A.; Pollok, B. A. Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (9), 2670-2671. DOI: 10.1021/ja039915e.
- 3) Tanaka, T.; Yamamoto, T.; Tsukiji, S.; Nagamune, T. Site-specific protein modification on living cells catalyzed by Sortase. *ChemBiochem* **2008**, *9* (5), 802-807. DOI: 10.1002/cbic.200700614.
- 4) Aulabaugh, A.; Ding, W.; Kapoor, B.; Tabei, K.; Alksne, L.; Dushin, R.; Zatz, T.; Ellestad, G.; Huang, X. Development of an HPLC assay for *Staphylococcus aureus* sortase: evidence for the formation of the kinetically competent acyl enzyme intermediate. *Anal Biochem* **2007**, *360* (1), 14-22. DOI: 10.1016/j.ab.2006.10.021.
- 5) Ilangoan, U.; Ton-That, H.; Iwahara, J.; Schneewind, O.; Clubb, R. T. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (11), 6056-6061. DOI: 10.1073/pnas.101064198.
- 6) Hirakawa, H.; Ishikawa, S.; Nagamune, T. Design of Ca²⁺-independent *Staphylococcus aureus* sortase A mutants. *Biotechnol Bioeng* **2012**, *109* (12), 2955-2961. DOI: 10.1002/bit.24585.
- 7) Naik, M. T.; Suree, N.; Ilangoan, U.; Liew, C. K.; Thieu, W.; Campbell, D. O.; Clemens, J. J.; Jung, M. E.; Clubb, R. T. *Staphylococcus aureus* Sortase A transpeptidase. Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J Biol Chem* **2006**, *281* (3), 1817-1826. DOI: 10.1074/jbc.M506123200.
- 8) Wang, X.; Chen, J. L.; Otting, G.; Su, X. C. Conversion of an amide to a high-energy thioester by *Staphylococcus aureus* sortase A is powered by variable binding affinity for calcium. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 16371. DOI: 10.1038/s41598-018-34752-6.