

藍染めの藍建て発酵に関与するインジゴ還元酵素の結晶構造解析 Crystal structure analysis of indigo reductase involved in the Aizome fermentation of Japanese Aizome (indigo dyeing)

米田一成^{1,*}, 櫻庭春彦², 大島敏久³

¹東海大学農学部バイオサイエンス学科, 〒862-8652 熊本県熊本市東区鹿渡 9-1-1

²香川大学農学部応用生物科学科, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

³大阪工業大学工学部生命工学科, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1

Kazunari Yoneda^{1,*}, Haruhiko Sakuraba², Toshihisa Ohshima³

¹Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

²Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa761-0795, Japan

³Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

1 はじめに

藍染めは日本の伝統的な染色技法であり、藍の葉を堆肥状にした「すくも」を発酵還元（藍建て発酵）することにより繊維を染色する方法である。「すくも」に含まれるインジゴ（藍色の色素）は水に不溶であるためそのまま繊維を染めることはできない。そこで、藍建て発酵の工程では常温性の好アルカリ性菌由来のインジゴ還元酵素によってインジゴが還元されることにより、水溶性のロイコインジゴ（黄色）に変化する。この酵素反応により「すくも」のインジゴは水に溶解、繊維を染色することが可能となる。繊維を染色液に漬け込み、ロイコインジゴを吸着させた後に引き上げて、空気（O₂）にさらし酸化させることでロイコインジゴはインジゴに酸化され、繊維中で美しい青色に発色する。本研究では藍染めのインジゴ還元反応に関与する好アルカリ性細菌由来のインジゴ還元酵素の機能・構造解析を目的に酵素の結晶化及びX線結晶構造解析を行った。

2 実験

発現用ベクターにクローニングしたインジゴ還元酵素遺伝子をタンパク質発現用の大腸菌に形質転換し、組み換え酵素を大量調製した。その後、親和性クロマトグラフィーにより酵素の精製を行った。結晶化スクリーニングには市販のスクリーニングキットを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。クライオプロテクトANT（抗凍結剤）にはパラトン N を選択し実験に用いた。X線の波長は 1.00 Å, 振動角度は 1 イメージにつき 1°, X線の照射時間は 1 イメージ当たり 1 秒、結晶から検出器までの距離は 260.98 mm に設定にした。データの処理には HKL200 を用いた。

3 結果および考察

精製酵素を濃縮し、結晶化を行ったところポリエチレングリコール(PEG)や硫酸を沈殿剤とした結晶

化条件で解析には適さない細い針状結晶（図 1）が析出したが、沈殿剤である PEG の種類を変えることにより、結晶構造解析に適した結晶を得ることができた（図 2）。条件最適化後の結晶を用いて AR-NE3A でデータ測定を行った結果、最高分解能 1.97 Å のデータ測定に成功し、空間群は P2₁であった（図 2）。今後、データの解析および構造解析を行っていく予定である。

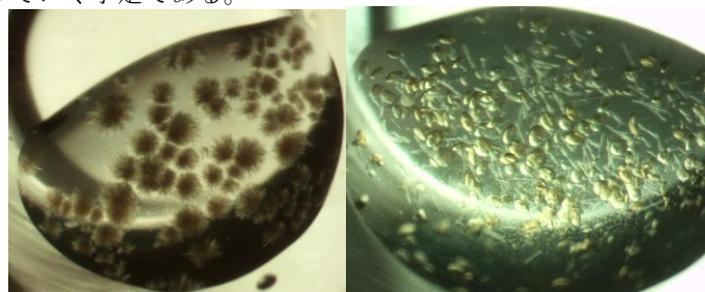


図 1：インジゴ還元酵素の針状結晶（最適化前）

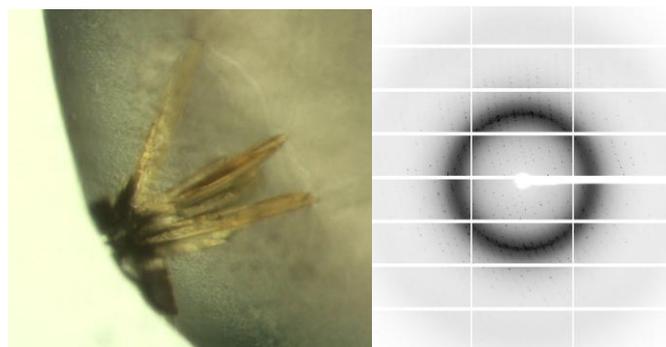


図 2：最適化後の結晶および X 線回折パターン

謝辞

X線回折実験を行うにあたり、Photon Factory のビームラインスタッフの皆様には大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。本研究は、公益財団法人発酵研究所(IFO)の支援を受けて行われました。

* kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp