

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来菌体表層グリセルアルデヒド-3-リン酸
脱水素酵素の結晶構造解析：水銀結合メカニズムの解明
Crystal Structure of Cell Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from
Lactobacillus plantarum: Insight into the Mercury Binding Mechanism

米田一成^{1,*}, 木下英樹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}, Hideki Kinoshita¹, 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

乳酸菌は様々な機能性を有する代表的な有用細菌であるが、その機能を担う因子の一つとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) が挙げられる。GAPDH は乳酸菌の菌体表層にも局在しており、ヒト大腸ムチン、血液型抗原、細胞外マトリックス成分、プラスミノゲンなどへの付着性を示すことが報告されている。また、乳酸菌には重金属である水銀の吸着能があり、その吸着には菌体表層タンパク質が関与することが明らかになっている。本研究は、GAPDH の水銀結合に関与する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2 実験

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* JCM 1149^T のゲノム DNA 情報をもとに GAPDH 遺伝子を PCR により増幅し pET-28b プラスミドベクターにクローニングを行った。pET-28b/GAPDH プラスミド DNA 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。クライオプロテクタント (抗凍結剤) には 30% v/v のエチレングリコール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 281.62 mm に設定にした。データの処理には HKL2000 を用い、位相決定には分子置換法を用いた (サーチモデル; 5J9G)。

3 結果および考察

精製酵素を濃縮した後、結晶化を行ったところポリエチレングリコール 1500 を沈殿剤とした条件で解

析に適した結晶が析出した (図 1)。本結晶に 0.5 mM HgCl₂ を 20°C、2 時間ソーキングすることで GAPDH-Hg²⁺ 複合体を作製し X 線結晶構造解析を行った。その結果、最高分解能 2.13 Å のデータ測定および、4 量体 GAPDH の立体構造解析に成功した (図 2)。

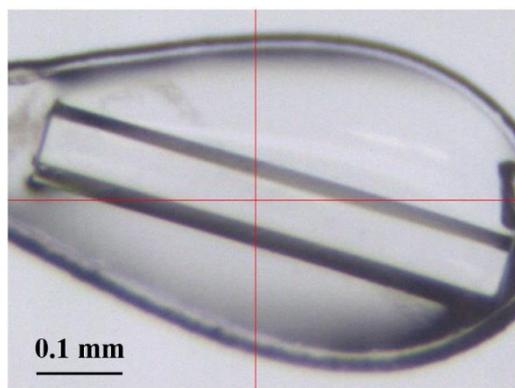


図 1 : GAPDH の結晶 (空間群 C222₁)

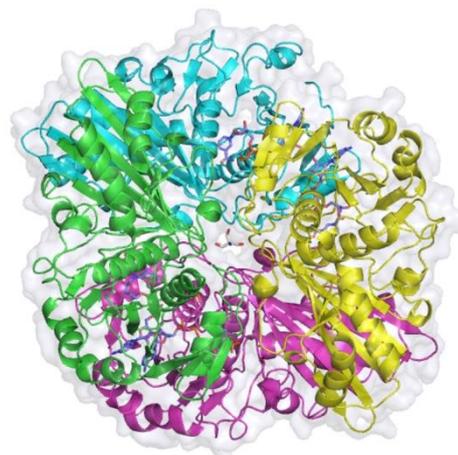


図 2 : GAPDH の 4 量体構造 (A-D サブユニット)

GAPDHの有する4つのCys残基（Cys101, Cys156, Cys160, Cys328）の中で、触媒に関わるCys156以外の3つのCys残基が Hg^{2+} の結合に関与することを明らかにした（図3）[1]。興味深いことに、GAPDH- Hg^{2+} 複合体では NAD^+ の電子密度が全く観察されなかった。これは、GAPDHの NAD^+ 結合部位に Hg^{2+} が結合することによって NAD^+ 結合部位が Hg^{2+} に占有され、 NAD^+ がGAPDHに結合できなくなることが原因であると考えられた。また、 Hg^{2+} の結合様式はGAPDHのサブユニット間で異なっており、特にCys101の Hg^{2+} 結合様式がA、Dサブユニット間で異なることを明らかにした[1]。

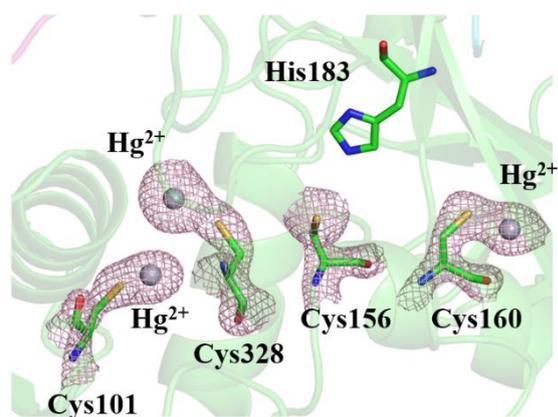


図3：GAPDHの Hg^{2+} 結合構造（銀色の球; Hg^{2+} ）

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、科学研究費助成事業・若手研究B（研究課題番号：15K21259）、バイオテクノロジー研究推進会の2018年度助成、東海大学総合研究機構の研究奨励補助、東海大学総合農学研究所プロジェクト研究の支援を受けて行われました。

参考文献

[1] K. Yoneda, M. Ogata, K. Nishiyama, K. Fukuda, S. Yasuda, K. Igoshi, and H. Kinoshita., Crystal Structure of Cell Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum*: Insight into the Mercury Binding Mechanism. *Milk science*. (2019) **68**, 3-11.

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