

好熱性バシラス属細菌由来インジゴ還元酵素の結晶化およびX線回折実験 Crystallization and preliminary X-ray analysis of indigo reductase from thermophilic *Bacillus*

米田一成^{1,*}, 吉岡観沙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}, Misa Yoshioka¹, 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

日本の伝統産業である藍染めは藍と呼ばれる蓼(タデ)科植物の葉を発酵させたスクモを原料に用いて、常温高アルカリ条件下で発酵還元により作られる。微生物によるスクモ還元は古来より行われていたが、その実態はほとんど不明であり、職人らの経験と勘に基づいて作業が続けられてきた。そのため同一原料・同一操作に因りながら還元力の異なる染色液ができ、その品質管理が困難な事が報告されている。これまでに藍染め染色液よりインジゴ還元酵素を生産する常温性の好アルカリ性菌の単離や部分精製酵素の機能解析例はあるものの、酵素の不安定性の問題からインジゴ還元酵素の詳細な機能は未だに不明である。そこで、本研究ではインジゴ還元活性を有する好熱性*Bacillus*属細菌に着目し、日本の伝統産業である藍建てにおけるインジゴの還元過程を生化学的視点から解明することを目的に酵素の結晶化及びX線回折実験を行った。

2 実験

遺伝子組換え大腸菌でインジゴ還元酵素を大量発現させることで結晶化用酵素を調製した。精製には His-tag アフィニティークロマトグラフィーを用いた。精製酵素を約 40 mg/ml に濃縮後、結晶化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。析出した剣状の黄色結晶を 1 本切り取り回折実験に供した。X線回折実験のクライオ条件は様々なクライオプロテクトANTを試した結果、100%パラトン-N で良好な回折像が得られることが分かった。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、100 K で測定を行った。1 データあたり 270 フレームの測定を行った後、HKL2000 を用いてデータの処理を行った。

3 結果および考察

酵素の精製を行った結果、約 23 kDa に単一のバンドが得られた(図 1)。また精製した酵素溶液は黄色であり、スペクトル解析の結果からフラビンに特徴的なスペクトルが確認された。そこで、TLC により本酵素の補酵素を同定した結果、FMN (flavin mononucleotide) が検出された(図 2)。このことから、インジゴ還元酵素は FMN 結合型酵素であることが明らかになった。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を沈殿剤とした条件で良好な結晶が約 1 週間で析出した(図 3)。本結晶を用いて AR-NE3A で X線回折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 $P2_1$ であった(図 4)。また非対称単位中に 4 分子のインジゴ還元酵素が存在していた。現在、分子置換法を用いて構造解析を行っている段階であり今後、本酵素が触媒するインジゴ還元の分子メカニズムを解明していく予定である。

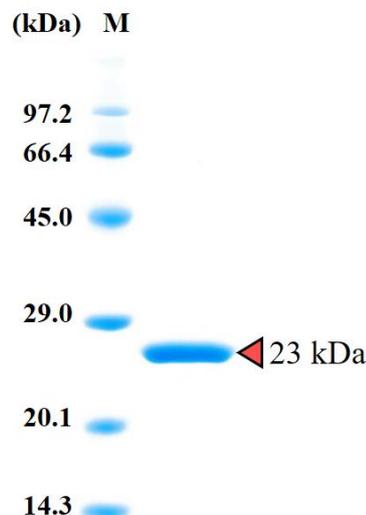


図 1 : インジゴ還元酵素の SDS-PAGE 結果

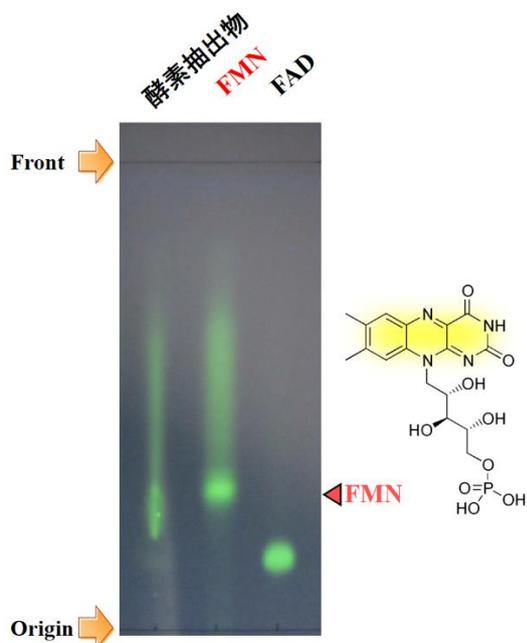


図 2 : インジゴ還元酵素抽出物の TLC 結果



図 3 : インジゴ還元酵素の結晶

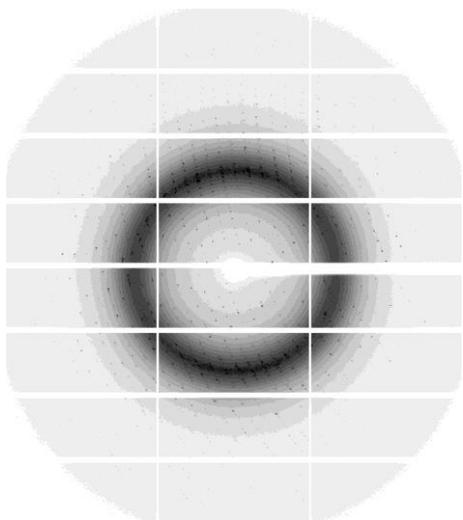


図 4 : インジゴ還元酵素結晶の X 線回折像

成果

1. 松前重義学術奨励賞：ユニークなアミノ酸配列を有す新規な NAD 依存性脱水素酵素の構造生物工学的研究

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

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、Photon Factory のチーム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。