

16S リボソーム RNA A1408 メチル基転移酵素 NpmB1 の X 線結晶構造解析

河合聡人^{*a}, 土井洋平^{*b}

藤田医科大学 医学部 微生物学講座

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98

Akito KAWAI and Yohei DOI

Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine

1-98 Dengakugakubo Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi, 470-1192, Japan

1 はじめに

アミノグリコシド系抗菌薬はグラム陰性菌や結核菌をはじめとした抗酸菌の治療に用いられる。グラム陰性菌のアミノグリコシド系抗菌薬に対する耐性機構に 16S リボソーム RNA のメチル化機構が知られている。グラム陰性菌の染色体中には元来このようなメチル化酵素は存在しないため、この耐性機構は他の細菌から遺伝子を獲得した結果であると考えられている。中でも NpmA1 は、16S リボソーム RNA の 1408 番目アデニンをメチル化し、グラム陰性菌にアミノグリコシド系抗菌薬耐性を付与することが知られている。最近、我々はイギリスで解析された大腸菌ゲノム中に、この NpmA1 と 40% の相同性を持つ ORF 配列が存在していることに気づいた。これを *npmB1* 遺伝子として、人工的に遺伝子全合成を行ったのち、pUC19 プラスミドベクターへクローニング、大腸菌 JM109(DE3) 株を形質転換したところ、この大腸菌は各種アミノグリコシド系抗菌薬に対して耐性化した [1]。加えて、プライマー伸長法により、*npmB1* 遺伝子を導入した大腸菌の 16S リボソーム RNA の A1408 部位がメチル化されていることを確認した [1]。これらの結果から NpmB1 も NpmA1 と同様な機構でアミノグリコシド系抗菌薬への耐性を付加することが示された。そこで、NpmB1 の構造学的な特徴を明らかにするため、X 線結晶構造解析法を用いた立体構造の解明を試みた。

2 実験

NpmB1 の単結晶は、PEG3350 を主とした結晶化条件で析出させた。PF BL-17A の実験ステーションを利用し、波長 0.98 Å の X 線を用いて回折データを収集した。得られた回折データは XDS プログラムを用いて処理した。構造解析は Molrep プログラムを用いた分子置換法で行い、Coot プログラムを用いたモデル構築、phenix.refine プログラムを用いて構造精密化を行い、最終構造を決定した。

3 結果および考察

NpmB1 の立体構造を 1.50 Å 分解能で決定した。今回得られたデータでは、N182 から P192 の間の電子密度が不明瞭であるため、この 10 アミノ酸残基の構造を決定することはできなかった。NpmB1 の立体構

造を相同性が 40% 前後ある酵素 (NpmA1; PDB 3P2E、Kmr; PDB 4RWZ、KamB; PDB 3MQ2、CacKam; PDB 4X1O) の立体構造に重ねて比較したところ、特に N 末端側の構造はよく重なり、類似していることが示された。一方で、C 末端側の β5/6 リンカーや β6/7 リンカー部分の構造は重ならず、この部位に各酵素の構造上の特徴があることが示唆された。

次にメチル基供与体である S-アデノシルメチオニンの結合部位に注目すると、ここに存在するアミノ酸残基はその側鎖の位置まで似通っていて、NpmB1 の S-アデノシルメチオニンの結合様式は他の酵素と類似していることが推察された。

最後に NpmB1 の立体構造を NpmA1 と 30S リボソーム複合体の構造 (PDB ID 4OX9) に重ね合わせたところ (図 1 a)、活性に重要な 2 つのトリプトファン残基のうち、β6/7 リンカー上にある 197 番目のトリプトファン残基の位置が大きく異なっていた (図 1 b)。そこで、NpmB1 の 197 番目のトリプトファンをアラニンに置換した *npmB1_W197A* 変異体遺伝子を調製し、pUC19 プラスミドベクターへクローニングした後、JM109(DE3) 株を形質転換し、アミノグリコシド系抗菌薬の 1 つであるトブラマイシンに対する薬剤感受性を調べた。結果、*npmB1_W197A* 遺伝子を導入した大腸菌はトブラマイシンに耐性化しなかった。この結果は、NpmB1 においても 197 番目のトリプトファン残基は活性に必須であることを示し、30S リボソームと結合する際に β6/7 リンカーの構造変化が必要であることを示唆している。

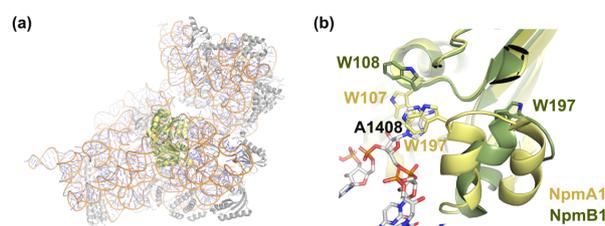


図 1 NpmB1 の立体構造

(a) NpmB1 (緑) と NpmA1-30S リボソーム複合体 (黄、PDB ID 4OX9) の重ね合わせ図

(b) 活性部位の拡大図

4 まとめ

グラム陰性菌にアミノグリコシド系抗菌薬への耐性を付与する NpmB1 の立体構造は、これまでに報告のある同類の 16S リボソーム RNA A1408 メチル基転移酵素の立体構造に類似していて、補酵素 S-アデノシルメチオニンの結合様式も酷似していた。一方で NpmB1 は、30S リボソームへの結合の際に $\beta 6/7$ リンカーの構造変化を必要とする構造的な特徴を有していることが示唆された。

謝辞

放射光実験でお世話になりました PF スタッフの皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

[1] A. Kawai *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65**, e0100921-21 (2021)

*^a kawai-a@fujita-hu.ac.jp

*^b yoheidoi@fujita-hu.ac.jp