

ディフィシル菌由来スライディングクランプの結晶構造 Crystal structure of DNA sliding clamp derived from *Clostridioides difficile*

菱木麻美*, 岡崎堇, 橋本博
静岡県立大学薬学部

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1
Asami HISHIKI*, Sumire OKAZAKI, and Hiroshi HASHIMOTO
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

1 はじめに

Clostridioides difficile (ディフィシル菌) 感染症 (CDI) は、ディフィシル菌が腸管内で毒素を産生し、腸炎や下痢症を引き起こす消化管感染症であり、重篤になれば死に至る場合もある。現在使用されている CDI 治療薬は感受性の低下、再発の増加、アナフィラキシーなどの重大な副作用が報告されており、既存薬とは異なる機序に基づく CDI 治療戦略の開発が求められている。CDI は医療機関や高齢者施設などにおけるアウトブレイクが危惧されており、対策は地域の保健衛生において喫緊の課題である。本研究ではディフィシル菌の DNA 合成に着目し、DNA 合成の足場として機能するスライディングクランプ (DnaN) を対象に、その立体構造と DNA 合成酵素との相互作用メカニズムを X 線結晶構造解析によって明らかにすることを目的としている。DnaN はクランプ結合モチーフ (CBM) を持つ DNA 合成酵素や修復酵素と相互作用し、それらを DNA 上に繋ぎ止めて DNA 合成や修復を促進する。したがって、DnaN と CBM との相互作用を解明することは、既存薬とは異なる機序に基づく CDI 治療戦略の開発に繋がると考えられることから、ディフィシル菌由来 DnaN (CdDnaN) の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

大腸菌を用いて発現させた CdDnaN を複数のカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した CdDnaN を用いて結晶化スクリーニングを行い、得られた条件を基に結晶化条件を最適化した。沈澱剤に PEG3350 を用いた条件で、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化し、PF BL-5A にて X 線回折強度データを収集した。データのプロセッシングは PReMo の自動処理システムを用いた。構造解析は、ColabFold で生成した CdDnaN の構造をサーチモデルにプログラム *MOLREP* を用いた分子置換法で行った。構造精密化はプログラム *REFMAC5* を用いた。

3 結果および考察

CdDnaN 単体の結晶構造を 2.13 Å 分解能で決定した。構造解析の結果、CdDnaN は他の細菌の DnaN

と同様に、ドメイン I~III の 3 つのドメインで構成され、二量体の環状構造を形成し、全体構造はよく類似していた。

DnaN はドメイン II とドメイン III の間にある CBM 結合部位で DNA 合成酵素や修復酵素と相互作用する (図 1)。CdDnaN もドメイン II とドメイン III の間に CBM 結合部位と予想されるポケットを有していたが、他の DnaN とはポケットの大きさやポケット近傍のアミノ酸や構造に違いが見られた (図 2)。このことから、CdDnaN は他の CBM とは異なる相互作用様式で結合することが示唆された。今後は CdDnaN とディフィシル菌の DNA 複製酵素との複合体での X 線結晶構造解析を目指す。

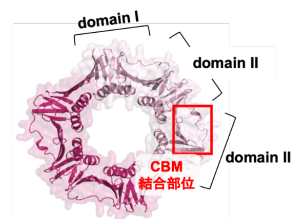


図 1 : CdDnaN の全体構造

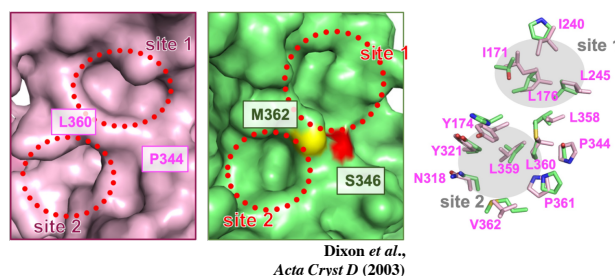


図 2 : CBM 結合部位近傍の構造
(左) CdDnaN, (中央) 大腸菌 DnaN, (右) CdDnaN (ピンク色) と大腸菌 DnaN (緑色) の重ね合わせ

謝辞

X 線回折強度データの収集にあたり、PF のビームラインスタッフの皆様にご多大のお世話になりました。心より厚く御礼申し上げます。

参考文献

[1] A. Hishiki *et al.*, *J. Biochem.* **173**, 13-20 (2023)

* ahishiki@u-shizuoka-ken.ac.jp