

Bacillus cohnii 由来 FMN-NADPH 依存性インジゴ還元酵素ホモログの 結晶構造解析

Structural determination of FMN-dependent NADPH-indigo reductase homolog from *Bacillus cohnii*

米田一成^{1,*}, 櫻庭春彦², 大島敏久³

¹東海大学農学部食生命科学科, 〒861-2205 熊本県上益城郡益城町杉堂 871-12

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 Food and Life Sciences, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

²Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393

Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, 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細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け、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。

これまでに我々は藍染めに関わるインジゴ還元酵素の研究を行い、インジゴの還元機構などを明らかにしてきた[1-3]。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ホモログの機能・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 FMN-NADPH 依存性インジゴ還元酵素ホモログ遺伝子をタンパク質発現用の大腸菌に形質転換し、組換え酵素を大量調製した。その後、コバルトアフィニティー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 Cryo 1,2 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% グリセロールを選択し実験に用いた。X線の波長は 1.0000 Å, 振動角度は 1 イメージにつき 1.0°, X線の照射時間は 1 イメージ当たり 3 秒、

結晶から検出器までの距離は 229.00 mm に設定にし、720 枚のデータ測定を行った。データの処理には FastXDS を用いた。

3 結果および考察

酵素の結晶化を行ったところ 35% (v/v) 2-propanol、100 mM Tris/HCl pH 8.5 (Cryo 1-19)の結晶化条件で解析に適した黄色の結晶を得ることができた（図 1）。本結晶を用いて BL-5A でデータ測定を行った。その結果、最高分解能 1.57 Å のデータの取得を行うことができた。また、空間群は $P2_12_12$ であることを明らかにした。62.5%同一性のある構造(PDB ID: 3GFR)をサーチモデルとして分子置換を行ったところ、構造解析に成功すると共に（図 2）、結合している FMN のイソアロキサジン環が約 11° も異常に湾曲していることを明らかにした（図 3）。

この湾曲した FMN の構造は、データ測定時にインジゴ還元酵素ホモログ結晶へ X 線を照射したことにより、1 電子還元が起こることによって生じた FMNH• セミキノン(FMNsq)であることを初めて明らかにした[4]。

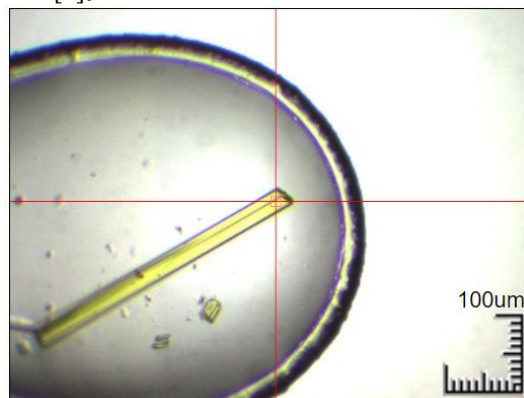


図 1: インジゴ還元酵素ホモログの結晶
(空間群 $P2_12_12$, 分解能 1.57 Å)

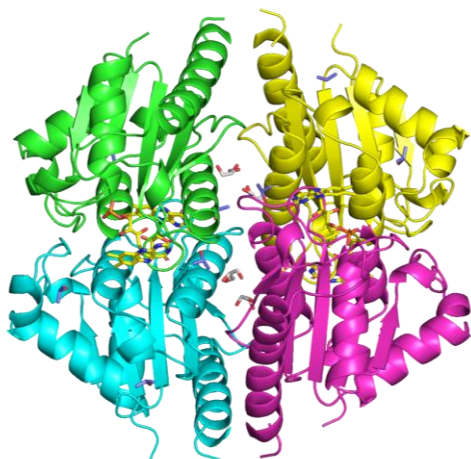


図 2 : インジゴ還元酵素ホモログの 4 量体構造
(PDB ID: 7F76)

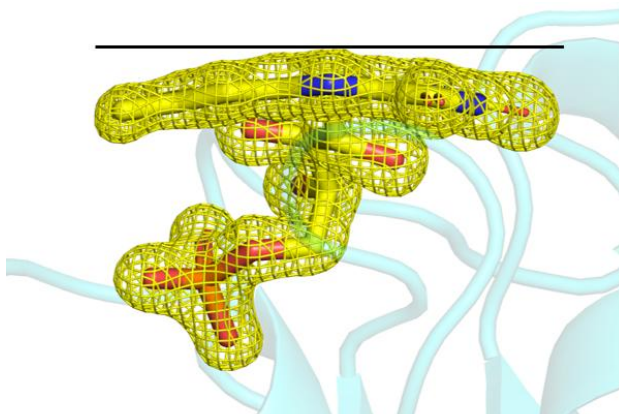


図 2 : 異常に湾曲した補酵素 FMN の構造
(FMNH• セミキノン ; FMNsq)

[3] Yoneda K, Yoshioka M, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. Structural and biochemical characterization of an extremely thermostable FMN dependent NADH-indigo reductase from *Bacillus smithii*. *Int J Biol Macromol*. 2020; 164:3259-3267. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.197.

[4] K Yoneda, H Sakuraba, J Hayashi, Y Naruse, T Araki, T Ohshima. Structural and functional characteristics of FMN-dependent NADPH-indigo reductase homolog from *Bacillus cohnii*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2025; 71:180-183.

* kyoneda@tokai.ac.jp

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 日本応用酵素協会 (Japan Foundation for Applied Enzymology) の支援を受けて行われました。

参考文献

[1] 米田 一成, 櫻庭 春彦, 大島 敏久. ジャパン・ブルーとインジゴ還元酵素. *化学と生物*. 2023; 61:9-11. doi: <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.61.9>

[2] Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. Stereospecificity of hydride transfer and molecular docking in FMN-dependent NADH-indigo reductase of *Bacillus smithii*. *FEBS Open Bio*. 2021; 11:1981-1986. doi: 10.1002/2211-5463.13200.