

乳酸菌由来 FMN-bp ホモログの結晶構造解析

高木 利佳子, 前田 琢久磨, 中西 猛, 北村 昌也*

大阪市立大学大学院 工学研究科 化学生物系専攻 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

1 はじめに

硫酸還元菌由来 FMN 結合タンパク質 (FMN-bp) は *in vivo* 機能未知の小さなフラビンタンパク質である。二量体を形成しており、FMN はその界面に挟み込むように存在している。これまで我々は、FMN-bp の構造と FMN 結合能の相関を調べることにより、アポタンパク質と FMN における結合反応機構の解明を行ってきた。本研究において、我々は新たに FMN-bp のホモログと比較することにより詳細な解析を行うことを目標として、硫酸還元菌由来 FMN-bp のアミノ酸配列と 39%一致している乳酸菌 (*Lactococcus lactis* IL1403) 由来 FMN-bp ホモログに着目した。しかし、大腸菌発現系を用いて組換え体を調製したところ、乳酸菌由来 FMN-bp ホモログは FMN を結合しておらず、*in vitro* においてもホロタンパク質として再構成されることがわかった。そこで、この FMN-bp ホモログが FMN 結合能を持たない構造的要因を明らかにするために、X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

まず、大腸菌発現系を用いて N 末端に His-tag を付加した組換え FMN-bp ホモログを作製し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。次に、得られた FMN-bp ホモログを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に対して透析した後、Amicon Ultra (Millipore) を用いて終濃度 29 mg/mL になるまで濃縮した。また、SDS-PAGE により、得られた FMN-bp ホモログの純度を確認した。

FMN-bp ホモログの結晶化には、シッティング・ドロップ蒸気拡散法を用いた。X 線回折実験に用いた結晶は、200 mM 硫酸リチウム、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、22.5 % (w/v) PEG 4000 溶液を沈殿剤とし、100 mM 塩化ストロンチウムを添加剤として加えることによって得た。

FMN-bp ホモログの X 線回折実験は Photon Factory (PF) のビームライン 17A にて行った。得られた回折データを、まず HKL2000 および SCALA (CCP4 program suite) を用いて処理した。次に MOLREP を用いて分子置換法により構造を決定した。また、得られた初期モデルについて、CNS を用いた Rigid Body Refinement および Simulated Annealing を行った。さらに、COOT および Refmac5 (CCP4 program suite) を用いて最終的な精密化を行った。

3 結果および考察

X 線回折実験の結果、分解能 2.0 Å、 $R_{\text{merge}} = 0.063$ 、Completeness = 98.7%、Multiplicity = 6.8、 $I/\sigma(I) = 19.3$ のデータが得られた。また、FMN-bp ホモログ結晶の空間群は C_2 であり、 $a = 94.9 \text{ \AA}$ 、 $b = 41.3 \text{ \AA}$ 、 $c = 72.6 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 102.7^\circ$ であった。

乳酸菌由来 FMN-bp ホモログ結晶において、非対称単位中に 2 つの単量体が存在し、ホモ二量体を形成していた。FMN-bp ホモログの全体構造を硫酸還元菌由来 FMN-bp と $C\alpha$ で重ね合わせて図 1 に示した。全体の RMSD は 0.98 Å であり、FMN-bp ホモログの全体構造は FMN-bp とよく類似していることがわかった。しかし、A 鎖、および B 鎖をそれぞれ重ね合わせた時の RMSD に差が見られたことから、単量体同士の相対的位置が FMN-bp とは異なることが示唆された。

また、硫酸還元菌由来 FMN-bp の FMN 結合領域[1, 2]とそれに対応する領域を $C\alpha$ で重ね合わせたところ、主鎖の構造は極めてよく類似していることがわかった。しかし、FMN との結合に重要な Trp106 が Phe109 に、FMN のリン酸基と水素結合を形成していた Thr54 が Leu55 にそれぞれ置換されていた。このようなアミノ酸残基の置換は FMN-bp ホモログが FMN 結合能を持たない主な原因となり得ると考えた。

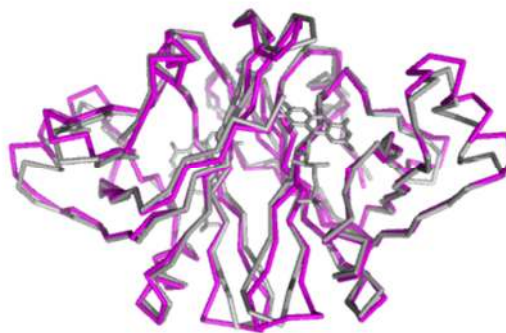


図 1 : 乳酸菌由来 FMN-bp ホモログおよび硫酸還元菌由来 FMN-bp の全体構造
FMN-bp ホモログをマゼンタ、FMN-bp (PDB ID : 1FLM) を灰色のリボンモデルで示した。また、FMN-bp 由来の FMN をスティックモデルで示した。

参考文献

- [1] K. Suto *et al.*, *Acta Crystallogr.* **D56**, (2000) 368.
[2] M. Kitamura *et al.*, *J. Biochem.* **141**, (2007) 459.

* kitamura@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp