

Desulfovibrio vulgaris (Miyazaki F)由来フラボドキシンの X 線結晶構造解析 X-ray structure analysis of flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)

高木利佳子, 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

Rikako Takagi, Takeshi Nakanishi and Masaya Kitamura

Department of Applied Chemistry and Bioengineering, Graduate School of Engineering,
Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka, 558-8585, Japan

1 はじめに

我々は、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)由来の FMN を補因子とする 3つのフラビンタンパク質(FMN 結合タンパク質、フラボドキシシン、フラボレドキシシン)について物理化学的解析を行うと同時に、それらと三次元構造との相関を明らかにすることでアポタンパク質 - FMN 相互作用の分子機構を調べている。本研究では、X 線結晶構造解析によって *D. vulgaris* (Miyazaki F) 由来フラボドキシシン (*DvMF-Fld*)の三次元構造を決定し、FMN との親和性や酸化還元電位との相関について考察した。

2 実験

大腸菌発現系を用いて組換え *DvMF-Fld* を作製し、陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した [1]。また、SDS-PAGE および Native-PAGE により、サンプルの純度を確認した。次に、*DvMF-Fld* 溶液を 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 30 mg/mL になるまで濃縮した後、終濃度 1 mM になるようジチオスレイトールを加え、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20 °C で結晶化した。X 線回折測定に用いた結晶は、1.96 M 硫酸アンモニウム、3 % (v/v) イソプロパノール溶液を沈殿剤とし、マイクロシーディング法を用いて作製した。得られた X 線回折データを SCALEPACK および SCALA 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。その後、CNS ver. 1.2、COOT および Refmac5 を用いて精密化を行った。

3 結果および考察

まず、薄い板状の結晶(図 1-a)が得られたが、その X 線回折データから構造を決定することはできなかった。Native-PAGE を行ったところ、非還元条件の *Fld* 溶液中には S-S 結合を介した二量体が存在していることが明らかになった。そこで、*DvMF-Fld* 溶液に DTT を添加した後、結晶を作製した。さらに、マイクロシーディングを行ったところ、直方体状の単結晶(図 1-b)が得られ、その X 線回折データから 1.2 Å の分解能で構造を決定することができた。

DvMF-Fld の分子表面近傍に Cys47 が存在していたが、残りのどの Cys 残基とも S-S 結合を形成できる距離ではなかったことから、この Cys47 がタンパク質分子間で S-S 結合を形成することで二量体を形成していたと考えた。しかし、Cys47 は FMN 結合ループに含まれていないため、二量体の存在はアポタンパク質と FMN の相互作用には影響しないと考えた。*DvMF-Fld* は、FMN の *si* 面近傍の Tyr98 および *re* 面近傍の Trp60 とイソアロキサジン環との π - π スタッキング、Thr15 ループのよく保存された極性アミノ酸残基および Trp60 (NE1) とリン酸基との水素結合、Thr59 (O) および Asn14 (N) とリビチル基との水素結合などにより、 $K_d = 0.38$ nM [1] の強い FMN 親和性を獲得していると考えた。

DvMF-Fld は高電位 *Fld* に分類されている ($E_{ox/sq} = -151$ mV) [1]。高電位 *Fld* は、完全酸化状態(ox)からセミキノン状態(sq)へと還元される際、FMN (N5) と Trp60 ループ主鎖の酸素原子との間に水素結合が形成されることによって *Fld_{sq}* が安定化されている [2]。結晶構造から、*Fld_{ox}* において、FMN (N5) と Thr58 (O) は水素結合を形成していないものの、3.46 Å と近い距離にあるため、*Fld_{sq}* においてはこれらの原子間に水素結合が形成されている可能性が高いと考えた。以上の事から、Trp60 ループは FMN との結合だけでなく酸化還元電位の決定にも大きく寄与しているのではないかと考えた。

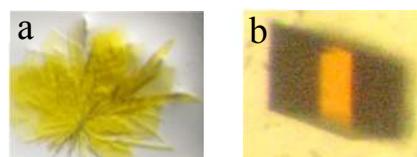


図 1 *DvMF-Fld* の結晶

- (a) DTT を添加しなかった時に得られた黄色い薄板状多結晶
(b) DTT を添加し、マイクロシーディングを行うことで得られた濃橙色の直方体状結晶

参考文献

- [1] M. Kitamura *et al.*, J. Biochem. **123**, 891 (1998).
[2] K. Fukuyama, *et al.*, J. Mol. Biol. **225**, 775 (1992).

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