

緑膿菌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 *Pseudomonas aeruginosa*

高木利佳子, 荻野公実子, 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, Kumiko Ogino, 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

フラボドキシンは FMN を補因子とする電子伝達タンパク質である[1]。細菌などの微生物に広く見られるが、ヒトなどの高等生物には見られず、生体内の様々な反応経路に関与していることから、病原菌に対する新規の抗菌剤ターゲットとして注目されている。例えば、*Helicobacter pylori* 由来フラボドキシ (*HpFld*) は、この細菌のエネルギー獲得において極めて重要な解糖系とクエン酸回路を繋ぐ経路に含まれることがわかっており、既にこれをターゲットとした新規薬剤開発に向けた研究が進められている[2]。

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は通常、健康者には病原性を示さない弱毒細菌である。しかし、特に免疫力の低下したヒトにとっては大きな脅威であり、時に生死にかかわる重篤な症状を引き起こす。また、この菌は消毒薬や抗生物質に対する抵抗力が高く、後天的に薬剤耐性を獲得するものも存在するため、新たな抗菌剤の開発が期待されている。

そこで、本研究では緑膿菌由来フラボドキシ (*PaFld*) をターゲットとした抗菌剤開発における構造的基盤構築を目的とし、*PaFld* の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

大腸菌発現系を用いて組換え *PaFld* 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。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、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 20 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、20 % PEG 3,350、0.2 M 酢酸カルシウム溶液を沈殿剤とし、マイクロシーディング法により作製した。得られた X 線回折データを HKL2000 および SCALA を用いて処理した。次に、Phenix_mr_Rosetta を用いて分子置換法により構造を決定し、COOT および Refmac5 を用いて精密化を行った。

3 結果および考察

PaFld の結晶化を試みた結果、黄色い板状結晶が得られ、その X 線回折データから 2.0 Å の分解能で構造を決定することができた。

PaFld の FMN 近傍の構造を図 1-a, b に示した。ITC による FMN 結合解析の結果、一般的なフラボドキシよりも 10^3 倍程度大きな解離平衡定数が得られた ($K_d = 1.15$ mM)。また、Native-PAGE の結果、*PaFld* は Cys101 同士が S-S 結合して二量体を形成していることがわかった。*PaFld* の結晶構造によると、Cys101 は FMN との結合に重要な Tyr96 を含むループに存在し、主鎖の N が FMN の O2 と相互作用していた。以上より、酸化条件下では Cys101 同士が架橋されることで FMN 結合ループの形状が変化し、FMN と正しく相互作用できなくなっていると考えた。

図 1-c に示したように、*HpFld* では酸化還元中心であるイソアロキサジン環疎水末端近傍に Ala55 が存在しており、阻害剤の結合に適したキャビティが形成されている[2]。一方、*PaFld* では Thr57 および Tyr11 がそのキャビティを埋めていた (図 1-b)。また、5 β -5 α 間のループが FMN と反対側に開いており、FMN O4' の近傍にキャビティが存在していた。以上より、*PaFld* をターゲットとした抗菌剤開発を行うには、*HpFld* のものとは異なる阻害剤をスクリーニングする必要があると考えた。

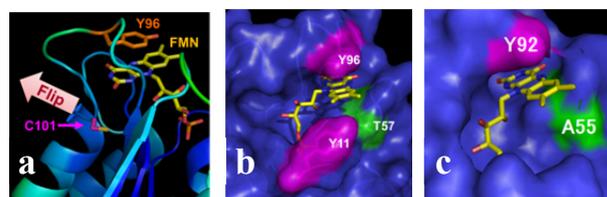


図 1 : FMN 近傍の構造

FMN (yellow) をスティックモデルで示した。(a) *PaFld* の FMN 近傍に存在する Cys101 (magenta) と Tyr96 (orange) を示した。(b) *PaFld* の FMN 近傍の構造をサーフェイスモデルで示した。(c) *HpFld* の FMN 近傍の構造をサーフェイスモデルで示した。

参考文献

- [1] J. Sancho, Cell. Mol. Life Sci. **63**, 855 (2006).
[2] N. Cremades *et al.*, ACS. Chem. Biol. **4**, 928 (2009).

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