

放線菌由来新規酵素の立体構造解析 Crystal structure analysis of novel enzyme derived from *Streptomyces*.

松井崇¹, 大城拓未¹, 伊藤卓也², 田中良和³, 小寺義男¹

¹北里大学 理学部, 〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

²大阪大谷大学 薬学部, 〒584-8540 大阪府富田林市錦織北 3-11-1

³東北大学大学院 生命科学研究科, 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

Takashi MATSUI^{1,*} Takumi OSHIRO¹ Takuya ITO² Yoshikazu TANAKA³ and Yoshio KODERA¹

¹Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

²Osaka Ohtani University, 3-11-1 Nishikiori-kita, Tondabayashi, Osaka, 584-8540, Japan

³Tohoku University, 2-2-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577, Japan

1 はじめに

ストレプトマイシンをはじめとして、放線菌からは数多くの人類の健康に重要な化合物が得られている。これらの化合物は、放線菌の持つ生合成酵素群によって合成される。したがって、放線菌をはじめとした有用微生物等の生合成研究は、新たな医薬品・機能性化合物の創出に重要である。

本研究では、抗水カビ活性を有する天然有機化合物 [1] の合成に関与すると予想された放線菌由来新規酵素の構造-機能相関と、さらなる機能改変を目指し、X線結晶構造解析を実施した。

2 実験

放線菌からクローニングした新規酵素遺伝子は pET26b に組み込み、Rosetta2 (DE3) で大量発現させた。得られた His タグ融合タンパク質は、HisTrap HP 1 mL で粗精製したのち、HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 で最終精製した。得られた最終精製試料は、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて 4°C または 18°C で結晶化した。得られた結晶は、0.2 mm ナイロンプルで拾って直ちに抗凍結剤に浸漬し、Unipuck に詰めた。凍結結晶は、PF BL-1A で X 線回折実験を行い、回折像を取得した。

3 結果および考察

HisTrap HP でイミダゾール濃度を段階的に変えた stepwise で His タグ融合タンパク質として粗精製したところ、30 mM, 50 mM および 100 mM イミダゾール濃度で融合タンパク質が溶出した。そこで、これらの溶出画分はそれぞれ別に HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 で精製したところ、どの画分も同じ溶出時間で溶出された。これらの試料は、混合せずにそれぞれ別の試料として 10–15 mg/mL まで Amicon Ultra を用いて限外ろ過濃縮し、各試料に対して 4 種類のスクリーニングキット (計 388 条件) の結晶化を試みた。その結果、30 mM イミダゾールで HisTrap HP カラム

から溶出させた試料でのみ、18°C の結晶化条件で初期結晶を得ることができた。

得られた結晶は、PF BL-1A でスナップショットを得たところ、分解能 8 Å 程度の回折像を得ることができた。そこで、この初期結晶の結晶化条件をもとに、結晶化条件を最適化したところ、分解能 2.2 Å の回折データの取得に成功した。しかし、アミノ酸配列相同性の高い PDB 構造を鋳型構造として分子置換法による構造解析を試みたが、結晶構造が決定できなかった。さらに、AlphaFold2 を用いてアミノ酸配列から本酵素の予想構造を作成し、その予想構造をもとに再び分子置換したが、立体構造を得ることができなかった。そこで、Se-SAD による立体構造解析を行うために、SeMet 標識試料を調製し、Native 結晶と同様な精製・結晶化法によって SeMet 標識結晶を得ることに成功した。

4 まとめ

今後、Se-SAD データを取得して本酵素の立体構造を決定し、本酵素と基質との複合体や、結合部位周辺の点アミノ酸変異体の立体構造解析により、基質認識機構の解明を目指す。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、SBRC のビームラインスタッフのサポートに感謝申し上げます。

参考文献

1. Takada K., *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 73,698-701 (2010).

成果

2. 大城拓未, 田中良和, 伊藤卓也, 小寺義男, 松井崇. 海洋法戦記由来新規酵素の構造解析, 2021 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 22/03/7.

* matsui@kitasato-u.ac.jp