

## *Bacillus smithii* 由来イサチン加水分解酵素の構造解析 Structural analysis of isatin hydrolase from *Bacillus smithii*

米田一成<sup>1,\*</sup>, 櫻庭春彦<sup>2</sup>, 大島敏久<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 香川大学農学部, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

<sup>3</sup> 大阪工業大学工学部, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1

Kazunari Yoneda\*<sup>1</sup>, Haruhiko Sakuraba<sup>2</sup>, Toshihisa Ohshima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Life Sciences, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa761-0795, Japan

<sup>3</sup>Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

### 1 はじめに

ジーンズや伝統的な着物の染色に用いられる藍染めは、色素であるインジゴの酸化、還元反応に伴って行われる。現在、インジゴの還元反応は、微生物の発酵を巧みに利用して還元する「藍建て発酵」という伝統的手法とヒドロサルファイトのような人工的な還元剤を用いて還元する「化学建て」のいずれかの方法で行われている。化学建ては安価であるが、廃液処理や染色の美しさに課題が残されている。一方、発酵建てでは環境に優しく、風合いも美しい染色手法であるが、時間と労力がかかるために高価になるという課題を抱えている。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[1-2]。本研究では、インジルピン（藍の葉の紫色の色素）の生成に関わると予測される酵素の生化学的解析を行うと共に酵素の結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。

### 2 実験

*B. smithii* 由来イサチン加水分解酵素の大量発現には大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL を用い、精製には Talon アフィニティークロマトグラフィーを用いた。結晶化スクリーニングには市販のスクリーニングキット(Cryo1,2)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。その結果、表 1 の条件で結晶が得られたため、BL-17A において全自動測定による X 線回折実験を行った。クライオプロテクタント（抗凍結剤）には 40% v/v の 2-ethoxyethanol を選択し実験に用いた。X 線の波長は 0.9800 Å、振動角度は 1 イメージにつき 0.25°、X 線の照射時間は 1 イメージ当たり 0.1 秒、トータルフレームは 720 枚、結晶から検出器までの距離は 253.0 mm、最高分解能 1.80 Å に設定にした。X 線回折データの処理には XDS を用いた。

### 3 結果および考察

*B. smithii* 由来イサチン加水分解酵素を純粋に精製した後、20 mg/ml 以上の濃度に濃縮を行った。その結果、濃縮後の酵素は紫色を呈していたため、コバルトなどの金属が結合していることが推察された（図 1）。イサチン加水分解酵素は金属依存性加水分解酵素であることがすでに知られており、マンガンや亜鉛を含有することが報告されている。精製酵素を用いて結晶化を行った結果、2-ethoxyethanol を沈殿剤とした条件でクラスターを形成した紫色の結晶が得られた（図 2）。クラスター結晶の一部を折り X 線回折実験に使用することで、データ測定を行った。その結果、分解能 2.53 Å のデータ収集に成功した（図 3）。本実験で得られたデータを用いて現在構造解析を行っており、精密化後に構造の登録を Protein Data Bank (PDB) に行う予定である。

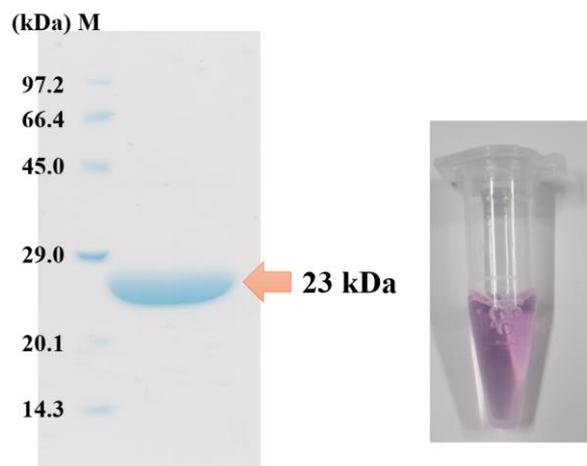


図 1: *B. smithii* 由来イサチン加水分解酵素の SDS-PAGE (左) および、精製・濃縮後の酵素 (右)、M; マーカー

表 1：イサチン加水分解酵素の結晶化条件

酵素濃度	22.8 mg/ml
沈殿剤濃度	35% 2-ethoxyethanol
塩	0.2 M NaCl
バッファー	0.1 M Na/K phosphate buffer pH6.2
結晶化温度	20°C

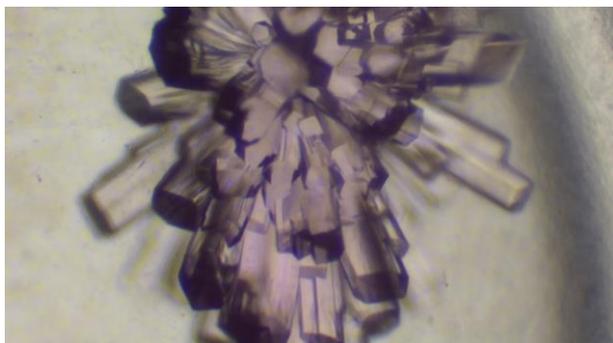


図 2：イサチン加水分解酵素のクラスター結晶  
(空間群  $P121$ )

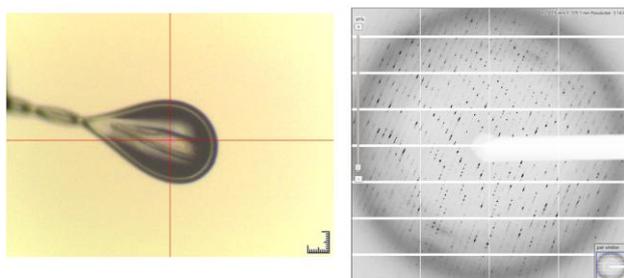


図 3：イサチン加水分解酵素の結晶（左）と  
X線回折データ（右）

#### 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・2022年度 酵素研究助成および、東海大学先進生命科学研究所の支援を受けて行われました。

#### 参考文献

- [1] [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.
- [2] [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.