

耐熱化したアミノグリコシド系抗生物質リン酸化酵素の構造解析

Structural study of a thermostable aminoglycoside kinase

矢嶋俊介¹, 飯野大輔¹, 中村顕²

Shunsuke Yajima¹, Daisuke Iino¹, Akira Nakamura²

(¹ 東京農大・応生, ² 筑波大学・院・生命環境)

(¹Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, ²Div. of Integrative Life Sci., Grad.

School of Life and Environ. Sci., University of Tsukuba)

e-mail: yshun@nodai.ac.jp

フレミングによるペニシリンの発見により、人類は細菌感染症に対し優れた対抗手段を手にすることができた。以来様々な抗生物質が発見されてきたが、これは一方で、抗生物質の使用が耐性菌の出現を誘起し、それに対する新たな抗生物質を必要としてきたことも意味している。医学的にはこのような耐性菌の出現は悪夢のようなものであるが、これを逆に利用することで分子生物学の研究は大きく進歩を遂げてきたと言えるであろう。βラクタム系抗生物質であるアンピシリンはグラム陰性菌のペプチドグリカン合成阻害活性を持ち、その分解酵素βラクタマーゼ遺伝子との組み合わせで、大腸菌を主として遺伝子組換えに広く利用されている。また、リボソームを標的とする抗生物質群のひとつに、アミノグリコシド系抗生物質がある。ストレプトマイシンをはじめとして、カナマイシン、ゲンタミシン、ネオマイシン、ハイグロマイシンなどその構造にアミノ糖を含む特徴をもつが、これら抗生物質の修飾酵素遺伝子は微生物だけでなく動植物細胞を利用した遺伝子組換えマーカーとして広く利用されている。このように抗生物質を不活化する酵素遺伝子の有用性は非常に高いが、酵素の特性からその利用は常温にほぼ限られている。たとえば、耐熱性酵素は工業的な利用価値が高い一方、酵素の中にはその活性発現に高温処理を必要とするものもある。このことから、もし好熱菌由来の酵素を好熱菌で大量に発現させることができれば、非常に効率よく耐熱性酵素を得ることが可能になると期待される。

そこで我々は、大腸菌由来ハイグロマイシンリン酸化酵素に **directed evolution** により耐熱性を付与し、*Thermus thermophilus* のマーカー遺伝子としての利用を可能にした。この耐熱化酵素は5カ所の変異を持ち、常温型よりも耐熱性が 16 °C 上昇していた[1]。さらに、その耐熱化メカニズムと酵素反応機構の解明を目指し結晶構造解析にも成功した。当初、我々は常温型酵素での構造解析を目指していたが、結晶を得ることが非常に困難であり未だ構造解析に至っていない。それに対し、耐熱型酵素では結晶を再現性良く得ることができ、基質複合体では分解能も 1.5 Å に達している。

アミノグリコシド系抗生物質リン酸化酵素の立体構造としては、カナマイシンリン酸化酵素がすでに明らかとなっている。アミノ酸配列の相同性は両酵素の間で 30%に満たないが、今回初めて明らかにした耐熱型ハイグロマイシンリン酸化酵素の立体構造は、良く似た構造を取っていた。また、アミノ酸配列の相同性はさらに低いにもかかわらず、その構造は真核生物のプロテインキナーゼと同じフォールディングをとっていた。

アポ酵素と基質結合型の立体構造比較からは、プロテインキナーゼに見られるような構造変化は無いと考えられるが、結晶構造解析における温度因子などからは、基質結合により構造がより安定になっていると考えられた。

Reference

[1] Nakamura, A. et al. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, **100**,158-63.