

耐熱化した大腸菌由来 Hygromycin B phosphotransferase の結晶構造解析

**Crystal structure of thermostable hygromycin B phosphotransferase
from *Escherichia coli***

飯野大輔¹、高倉康彰²、佐々木康幸¹、星野貴行²、大澤貫寿¹、中村颯²、矢嶋俊介¹
Daisuke Iino¹, Yasuaki Takakutra², Yasuyuki Sasaki¹, Takayuki Hoshino², Kanju Ohsawa¹,
Akira Nakamura², Shunsuke Yajima¹

(¹東京農大・応生・バイオ, ²筑波大・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)

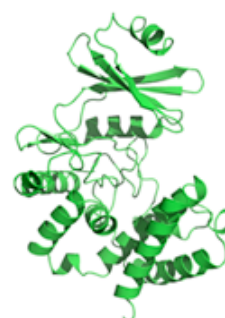
e-mail: yshun@nodai.ac.jp

アミノグリコシド系抗生物質はアミノ糖を含む配糖体抗生物質の総称で、ストレプトマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ハイグロマイシン、スペクチノマイシン、ゲンタマイシン等が含まれる。一般的な作用機序として、これらは原核生物や真核生物のリボソームに作用し、蛋白質合成阻害を誘発して細胞の生育を阻害する。一方、これらの抗生物質に対する耐性の発現は細菌が作り出すリン酸化酵素やアセチル化酵素による修飾によって引き起こされる。

ハイグロマイシン Bはアミノグリコシド系抗生物質の1つであり、原核細胞及び真核細胞のリボソームに作用してトランスロケーションを阻害し、mRNA の誤読を引き起こすとされている。このハイグロマイシン Bを不活化する酵素として Hygromycin B phosphotransferase (Hph) (EC 2.7.1.119)が知られており、ATP 存在下でこの抗生物質をリン酸化することにより不活化する。Hph は、分子生物学の分野で様々な種類の細胞における組換えクローンの選択マーカーとして多くの宿主ベクター系で使用されているが、同遺伝子は常温菌である大腸菌由来であったため、好熱菌での使用は不可能であった。この問題を解決するため directed evolution による Hph の耐熱化を試み、現在までに我々は *Thermus thermophilus* で使用可能な耐熱性 Hph (Hph5) の取得に成功している。Hph5 には5つのアミノ酸置換(D20G, A118V, S225P, Q226L, T246A)が含まれており、耐熱性が野生型酵素に比べ約 16 °C上昇した(1)。そこで本研究では、反応機構、耐熱化機構の解明を目指し Hph5 の立体構造解析を試みている。

Hph5 の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行い 20 °Cで静置させ、再現性良く結晶を得ることができた。PF-BL5A を用いて X 線回折実験を行い 2.1 Å 分解能回折データを収集した。位相はセレノメチオニンを用いた MAD 法により決定した。リガンドとの複合体構造の解析を行なうために、ハイグロマイシン B、ATP 非加水分解アナログ AMP-PNP 又は ADP との共結晶化を試みて結晶を得ることに成功した。それぞれ PF-BL6A で回折実験を行い、ハイグロマイシン B/AMP-PNP 複合体は最大分解能 1.8 Å、ハイグロマイシン B/ADP 複合体は 1.5 Å の回折データを得た。

構造解析の結果から、触媒残基候補のアスパラギン酸がハイグロマイシン B と ATP の間に存在していた。また各複合体の構造比較から、Hph5 は真核生物由来キナーゼに見られるような基質の結合による構造変化は起こらないと考えられた。



Hph5の立体構造

Reference

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