



アミノ配糖体耐性を付与する 16S rRNA methyltransferase の解析

和知野 純一

名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

1. 背景と研究目的

近年、多種多様な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性細菌が増加しており、それらによる細菌感染治療に難渋するケースが少なくない。本研究では、細菌のアミノ配糖体耐性機構の1つである 16S rRNA methyltransferase NpmA の3次元構造をあきらかにすることを目的としている。取得した構造情報を元に 16S rRNA methyltransferase NpmA の阻害剤を開発し、細菌感染症治療法開発の一助とすることが本研究の最終目標である。

2. 実験内容

C 末にヒスチジンを付加したリコンビナント NpmA を大腸菌に産生させ、各種カラムにて精製を行った。ヒスチジンは切断せずに、そのまま結晶化条件の検討に進んだ。精製した NpmA (15 mg/mL) と各種結晶化スクリーニングキット (INDEX HT, Crystal Screen 1&2, Grid Screen など) を用い、結晶化の初期条件を検討した。インキュベーションの温度は 20°C とした。作製した結晶を BL2S1 ビームラインに持ち込み、回折測定を行った。

3. 結果および考察

異なる 10 リザーバー条件で出現した結晶について回折測定を行った。その結果、下記 4 条件のリザーバー溶液を用いて作製した結晶のデータ回収に成功した。いずれも分解能は 2.0 Å 程度であった。

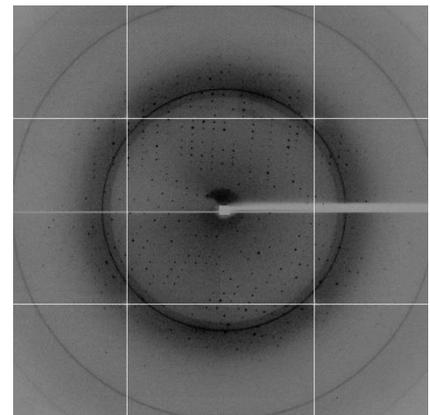
条件 1) 100 mM tri-sodium citrate (pH 6.5), 10 % 2-propanol, 10 % PEG4000

条件 2) 100 mM tri-sodium citrate, 5 % 2-propanol, 20 % PEG4000

条件 3) 100 mM citric acid (pH5.0), 20 % PEG6000

条件 4) 100 mM citric acid (pH5.0), 24 % PEG3350

結晶化の基本条件として、リザーバー溶液にクエン酸、PEG が含まれることがあきらかとなった。今後、これらの条件を基準に、結晶化条件の最適化を行い、さらに分解能の良い結晶を供する条件を探索するとともに、結晶化の再現性についても検討を行う予定である。また、阻害剤との複合体構造をあきらかにする予定であるため、阻害剤の溶媒となる DMSO がリザーバー溶液に含まれていた場合に測定可能であるかどうかについても検討したい。



回折像 (条件 3)

4. 参考文献

1. **Wachino J**, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides *Antimicrob Agents Chemother.* 51(12):4401-9. 2007.