

2011B1481

BL38B1

## γ-レゾルシン酸分解経路遺伝子群由来 GraE タンパク質の結晶構造解析

### Crystal Structure Analysis of GraE Protein from the Gene Cluster of γ-Resorcyate Catabolic System

山内 貴恵<sup>a</sup>, 藤井 知実<sup>a</sup>, 老川 典夫<sup>b</sup>, 畑 安雄<sup>a</sup>Takae Yamauchi<sup>a</sup>, Tomomi Fujii<sup>a</sup>, Tadao Oikawa<sup>b</sup>, Yasuo Hata<sup>a</sup><sup>a</sup>京都大学化学研究所, <sup>b</sup>関西大学化学生命工学部生命・生物工学科<sup>a</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, <sup>b</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

γ-レゾルシン酸代謝に係る遺伝子群由来で機能不明な GraE タンパク質の立体構造-機能解析を行うため、Native 結晶の 4 Å 分解能の回折強度データおよびセレノメチオニン置換体結晶に対し 3 波長で 6 Å 分解能の回折強度データを収集し、両結晶の空間群を  $P2_12_12$  と決定した。分子置換法および多波長異常分散法による構造解析を試みたが、結晶の回折能が低く放射線損傷が大きいため、データ分解能が不十分で未だ妥当な解が得られず、解析続行中である。

キーワード： X 線結晶構造解析、γ-レゾルシン酸代謝、根粒菌、GraE タンパク質

#### 背景と研究目的：

γ-レゾルシン酸は医薬品や樹脂の原料として重要な化合物であるが、化学合成による製造では混在する副生成物の分離が問題となっている。そこで、微生物や由来酵素を利用した効率的な γ-レゾルシン酸生産系の確立を目的に有効な菌のスクリーニングが行われ、γ-レゾルシン酸を炭素源として生育する根粒菌 *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 が単離された。遺伝子解析と酵素科学解析により、γ-レゾルシン酸の代謝系は遺伝子クラスター *graDAFCBEK* の遺伝子産物の関与により構成されており、γ-レゾルシン酸が 3-オキソアジピン酸まで分解され、TCA サイクルへ導入されていくことが判明した<sup>[1,2]</sup>。γ-レゾルシン酸を始めとする芳香族化合物の微生物による代謝に関する詳細な構造生物学的知見を得るため、当研究室では γ-レゾルシン酸代謝系酵素群の立体構造-機能解析を行っており、*graA*, *graC*, *graD* の遺伝子産物についても X 線結晶構造解析が進行中である。

*graE* 遺伝子産物である GraE タンパク質 (アミノ酸残基数：112) については、同じ遺伝子群の他のタンパク質と異なりその機能は不明である。GraE タンパク質とのアミノ酸配列の同一性が 20%弱である *Haemophilus influenzae* 菌由来 YciI タンパク質の立体構造が構造ゲノム科学プロジェクトにおいて報

告されているが、これについても機能は明らかとはなっていない<sup>[3]</sup>。

本研究では GraE タンパク質の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を基にして  $\gamma$ -レゾルシン酸代謝系関連化合物との係りを標的に絞った機能解析を行うことによって GraE タンパク質の代謝系中での役割と機能の解明を行うことを目的としている。

**実験：**

His タグ付加 GraE タンパク質の Native 結晶およびセレノメチオニン (Se-Met) 誘導体結晶は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  を沈殿剤とするシッティングドロップ蒸気拡散法により得られた (図 1)。ADSC 社製 CCD 検出器 Quantum210 を搭載した SPring-8 構造生物学ビームライン BL38B1 において X 線回折実験を行った。クライオプロテクタントとして Paratone-N を用い、結晶を温度 100 K の液体窒素気流中で瞬間冷却後に同低温下でのデータ収集を行った。最大で  $0.25 \times 0.1 \times 0.01$  mm 程度の大きさの結晶を実験に使用した。1 フレームあたりの振動角を  $1^\circ$ 、露光時間を 20 秒とし、振動範囲  $180^\circ$  で 180 枚の回折像を測定した。波長  $1.000 \text{ \AA}$  で Native 結晶の X 線回折実験を行い、 $4 \text{ \AA}$  分解能の回折強度データを収集することができた。プログラム iMosflm を使用して回折強度データの処理を行い、空間群を  $P2_12_12$ 、格子定数  $a = 87.05 \text{ \AA}$ ,  $b = 164.39 \text{ \AA}$ ,  $c = 37.71 \text{ \AA}$  と決定した。

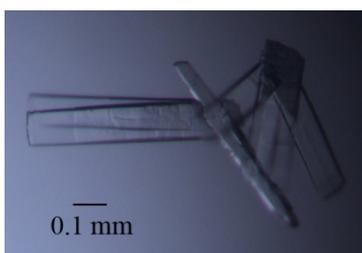


図 1. GraE タンパク質の Native 結晶

表 1. X 線データ収集の統計値 (括弧内は最外殻値)

	Native	Se-Met		
		Peak	Edge	Remote
Wavelength ( $\text{\AA}$ )	1.0000	0.9788	0.9794	0.9641
Resolution range ( $\text{\AA}$ )	54.80–4.00 (4.22–4.00)	58.60–6.00 (6.33–6.00)	58.40–6.00 (6.33–6.00)	58.88–6.00 (6.32–6.00)
No. of observed reflections	29,912 (4,521)	7,757 (1,224)	8,247 (1,256)	8,859 (1,340)
No. of unique reflections	5,000 (728)	1,494 (218)	1,485 (214)	1,523 (218)
Completeness (%)	99.7 (99.9)	99.7 (100.0)	99.7 (100.0)	99.9 (100.0)
$R_{\text{merge}}$ (%)	11.6 (46.0)	14.1 (56.4)	15.3 (61.9)	14.6 (66.3)
Multiplicity	6.0 (6.2)	5.2 (5.6)	5.6 (5.9)	5.8 (6.1)
Average $I/\sigma(I)$	11.4 (3.6)	7.8 (2.7)	7.4 (2.6)	7.5 (2.5)

また、Se-Met 誘導体結晶に対し XAFS 実験を行い、Se 原子に対応した吸収端スペクトルを測定した。Se 原子吸収端近傍の 3 波長 (0.9788 Å, 0.9794 Å, 0.9641 Å) で X 線回折実験を行い、それぞれ 6 Å 分解能の回折強度データを収集した。Se-Met 誘導体結晶は Native 結晶と同型で、ほぼ同じ格子定数であった。X 線データ収集に関する統計値を表 1 に示す。

#### 結果および考察：

本結晶の非対称単位中の分子数は、 $V_M$  値の一般的な範囲 (1.7~3.5 Å<sup>3</sup>/Da) を考慮すると、モノマー 3~5 分子 ( $V_M$  値 3.15~1.89 Å<sup>3</sup>/Da) と推測された。4 Å 分解能の Native データに対し、プログラム MolRep を使用し分子置換法による位相決定を試みた。計算には初期モデルとして YciI タンパク質のサブユニットおよび 2 量体の二種類を使用し、回転関数探索の積分半径を 19 Å とした。それぞれの場合において、サブユニット 2 個および 2 量体 3 分子に相当する解が得られたが、各モデルから一部の  $\alpha$  ヘリックスを除外して計算したオミットマップにおいて該当箇所での電子密度の消失が確認されたので、正しい解は得られていないと判断した。

次に、3 波長で測定した 6 Å 分解能のデータセットに対し多波長異常分散法による位相決定を試みた。His タグ付加 GraE タンパク質分子中のメチオニン残基数は、His タグ領域の 1 個を含め分子全体 (アミノ酸 132 残基) で 5 個であり、Se-Met 誘導体結晶の非対称単位中に Se 原子は 15~25 個存在することになる。プログラム SOLVE/RESOLVE を使用し、非対称単位中に 3, 4, 5 個の分子が存在する前提で計算したところ、それぞれ 5, 18, 13 個の Se 原子サイトが算出された。しかしながら、どの場合においても計算された電子密度図は解釈が困難であった。

Native 結晶の X 線回折像を観察すると、1 枚目では分解能が 4.0 Å までの反射が得られていたが、180 枚目では分解能が 4.6 Å に低下していた。また、Se-Met 誘導体結晶の多波長測定では、1 波長目の 1 枚目では分解能が 5.7 Å までの反射が得られていたが、3 波長目の 180 枚目では分解能が 6.6 Å に低下していた。結晶の回折能が低く、また、放射線損傷が大きく各データセットで測定の進行に伴って回折分解能が低下したため、構造解析可能な分解能までの回折強度データを収集できていないことが、構造決定が成功しなかった原因と考えられる。

#### 今後の課題：

今後は、他の結晶化条件の検索を行うとともにクライオプロテクタントの種類やアニーリング条件などの検討を行って、本結晶の回折分解能の改善を目指す。本結晶は細長い板状であるため、マイクロビームを使用し撮影フレームごとに少しずつ照射位置をずらして測定するヘリカルデータ収集が有効であると考えられる。また、データの完全性の割合をなるべく高く保ちつつ最少のフレーム数となるような振動範囲を設定することも試みる。

#### 参考文献：

[1] M. Yoshida, N. Fukuhara, T. Oikawa, *J. Bacteriol.* **186**, 6855–6863 (2004).

- [2] M. Yoshida, T. Oikawa, H. Obata, K. Abe, H. Mihara, N. Esaki, *J. Bacteriol.* **189**, 1573–1581 (2007).
- [3] M. A. Willis, F. Song, Z. Zhuang, W. Krajewski, V. R. Chalamasetty, P. Reddy, A. Howard, D. Dunaway-Mariano, O. Herzberg, *Proteins* **59**, 648–652 (2005).

©JASRI

---

(Received: January 18, 2015; Early edition: April 28, 2015; Accepted: June 29, 2015;  
Published: July 21, 2015)