

細菌のヒドラジド代謝制御機構の解析 Structural study of hydrazide metabolic system in bacteria

秋山友了, 矢嶋俊介*

東京農業大学バイオサイエンス学科, 〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

Tomonori Akiyama and Shunsuke Yajima*

Department of Bioscience, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, 156-8502, Japan

1 はじめに

ヒドラジドは一般式 $R^1C(=O)NR^2NR^3R^4$ で表される化合物である。我々のグループでは、ヒドラジドを資化できる菌を単離し、その代謝メカニズムの解析を行っている。ヒドラジドは工業的に、染料、塗料をはじめ広く用いられている化合物であり、抗結核薬や抗うつ薬など医薬品としても使われている。また、*Agaricus* キノコがつくる *agaritine* のような天然物としても限られた報告がある。しかし、このような化合物の生物における代謝メカニズムについては詳細な研究例がない。

共同研究者が単離したヒドラジド資化菌 *Microbacterium* sp. HM58-2 株において、ヒドラジド分解を担う主要素は amidase ファミリーに属する酵素であった。また、この遺伝子の発現はカタボライト制御下にあることが明らかとなった[1]。ゲノム配列を解析したところ、この酵素は IclR (Isocitrate Lyase Regulator) ファミリーに属する転写因子とオペロンを形成していることが明らかとなった[2]。

IclR はヘリックス・ターン・ヘリックス(HTH)をモチーフとする DNA 結合ドメインと基質結合ドメインからなる転写因子である。1 分子センサー転写因子 (one component system) として、基質の結合により、2 量体と 4 量体のコンフォメーション変化を伴って、転写制御を行っていると考えられている。

そこで、我々は、HM58-2 株におけるヒドラジド代謝遺伝子の制御メカニズム解析の一環として、IclR の立体構造解析を試みた。

2 実験

Microbacterium sp. HM58-2 株のゲノム配列から IclR 遺伝子を pET28a(+) に組み込み、宿主として BL21(DE3)を用いて組換え体蛋白質の発現を行った。Ni カラムおよび陰イオン交換カラムにより精製を行い、目的蛋白質を得た。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。得られた結晶は薄い板状であった。そこで、カウンターディフュージョン法をもちいて結晶化を行い、直方体の結晶を得ることに成功した。

回折データは、native S-SAD 法による解析を試みるため、最初 BL-17A で波長 2 Å, その後 BL-1A で 2.7 Å で収集した。データセットの処理は XDS

package を用いた。最終的には、MoRDa による分子置換の後、CCP4 suite の CRANK2 による MR-SAD 法[3]を用いた。

3 結果および考察

データセット収集は振り角 0.1°, 照射時間 0.1 秒で、できるだけ多くのデータを収集した。また、各データは 1 つの結晶から取得した。17A で収集した (分解能 2.6 Å) 360° x 6 のデータセットを用い、MR-SAD 法により 250 残基からなる IclR について、非対称単位中ホモ 4 量体のモデルを自動で組み立てることができた。また、1A の (分解能 3 Å) の場合、360°分のデータセットを用いることで、同じ結果を得ることができた。Native S-SAD 解析では、1A で取得した 360° x 22 のデータセットを用い、Phenix AutoSol により、約 7 割の残基分のモデルが構築された。得られた立体構造は、既知の IclR とドメインの配向が異なっており、IclR 蛋白質としてコンフォメーション変化を起こす可能性が示唆された。また、非対称単位中の構造は、ホモダイマー同士で 4 量体を形成しており、溶液中でも同様の構造を取る可能性が示唆された。今後、基質との複合体構造の取得により、センサーとしての機能解析を行いたい。

4 まとめ

IclR の立体構造を明らかにすると共に、native-SAD 法の適用における、BL-17A あるいは 1A で得られるデータの違いについて知見を得ることができた。

謝辞

Native S-SAD 測定においては、構造生物学研究センターの山田悠介博士に大変お世話になりました。また、同センター千田美紀博士には MR-SAD 法についてご助言を頂きました。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] K. Oinuma *et al.*, *J Bacteriol* **197**, 115 (2015).
- [2] T. Akiyama *et al.*, *Genome Announc* **4** (3), e00554-16 (2016).
- [3] M. Senda *et al.*, *日本結晶学会要旨集*, 50 (2015).

* yshun@nodai.ac.jp