

## *Pseudomonas putida* の核様体タンパク質 TurB の結晶構造解析 Structural analysis of a nucleoid-associated protein TurB in *Pseudomonas putida*

水口 千穂<sup>1</sup>, 川妻 孝平<sup>1</sup>, 松澤 淳<sup>1</sup>, 藤本 瑞<sup>2</sup>, 野尻 秀昭<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 東京大学生物生産工学研究センター, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>2</sup> 農業・食品産業技術総合研究機構, 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

Chiho Suzuki-Minakuchi<sup>1</sup>, Kohei Kawazuma<sup>1</sup>, Jun Matsuzawa<sup>1</sup>, Zui Fujimoto<sup>2</sup> and Hideaki Nojiri<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

<sup>2</sup>National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, 305-8602, Japan

### 1 はじめに

細菌の可動性遺伝因子であるプラスミドは宿主の新規遺伝子の獲得を補助し、環境適応に重要な役割を果たす。プラスミドの中には、細菌の「ヒストン様因子」とも言われる核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) をコードするものも存在する。このようなプラスミドを宿主細菌が保持すると、既に宿主細菌内で形成されていた NAPs の転写制御ネットワークに新たな NAPs が加わることで、転写制御ネットワークの再構築が起こると考えられる。

当研究室では、含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミドである pCAR1 と、その宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデルとして、プラスミド・宿主染色体由来の NAPs による転写制御機構の解明を目的に研究を進めている。過去の研究では pCAR1 由来の NAPs である Pmr に着目し、Pmr が宿主染色体由来のホモログである TurA, TurB (Pmr とアミノ酸配列が 50-60%一致する) と協調的に機能すること [1]、Pmr の DNA 結合能やホモ多量体形成能が転写制御に重要であること [2] を明らかにした。その後の実験から Pmr のホモ多量体形成に重要な残基を同定し [3]、結晶構造解析を試みたものの、構造決定に至る良好な結晶は得られなかった。そこで本研究では、対象を TurB に変更して結晶構造解析を行った。

### 2 実験

TurB の二量体/多量体化ドメイン TurB<sub>nt61</sub> に対し、Pmr でホモ多量体形成に重要な役割を果たすと同定された残基 [3] と同位置にアラニン置換を導入することで、二量体で安定する置換体 TurB<sub>nt61</sub>-R8A を取得した。TurB<sub>nt61</sub>-R8A の発現ベクターには pET-26b(+) を、宿主には大腸菌 BL21(DE3) 株または B834(DE3) 株を使用し、C 末端側の His-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィー、及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。結晶化には酢酸アンモニウムを含む BIS-TRIS propane 緩衝液を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶が生成した。セレノメチオニン置換体を用いて位相を決定し、非置換体で分子置換を行うことにより、分解能 2.3 Å で構造を決定した。

### 3 結果および考察

TurB<sub>nt61</sub>-R8A は単量体あたり 2 本の  $\alpha$  ヘリックスから成り、ホモ二量体を形成していた (図 1)。結晶構造中の二量体形成部位 (central dimerization site) は複数の水素結合と疎水コアによって安定していたが、これらを形成する残基は Pmr, TurA, TurB 間で非常によく保存されていた。タンパク質間クロスリンク法による解析から、TurB はもう一つの二量体化部位 (terminal dimerization site) を持つことが明らかとなっている。この領域を構成する残基は Pmr, TurA, TurB 間での保存性が低かった。過去の研究から Pmr-Pmr, TurA-Pmr 間と TurB-Pmr 間ではヘテロ多量体の結合比が異なることが示されているが [3]、これは各タンパク質が持つ terminal dimerization site の親和性の違いに起因する可能性が示唆された。

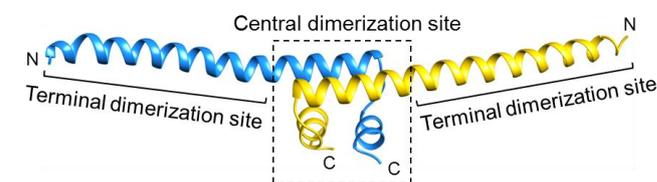


図 1: TurB<sub>nt61</sub>-R8A の結晶構造。図中にタンパク質の N, C 末端と、二箇所の二量体化部位を示した。

### 4 まとめ

アラニン置換体を用いて TurB の二量体/多量体化ドメインの結晶構造を解くことに成功した。これにより、プラスミドと宿主染色体由来の NAPs が協調的に転写制御を行うメカニズムについて、立体構造の面から議論することが可能になった。

### 謝辞

実験をサポートしてくださった PF スタッフの方々に心よりお礼申し上げます。

### 参考文献

- [1] C.-S. Yun *et al.*, *J. Bacteriol.* **192**, 4720 (2010).
- [2] C. Suzuki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 711 (2011).
- [3] C. Suzuki *et al.*, *PLOS ONE* **9**, e105656 (2014).

\* anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp