

# LTTR-DNA 複合体の結晶構造に基づいた転写活性化機構の解明

## Crystal structure analysis of the LTTR-DNA complex

千田美紀<sup>1</sup>, 安達成彦<sup>1</sup>, 千田俊哉<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>高エネ機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

Miki Senda<sup>1</sup>, Naruhiko Adachi<sup>1</sup> and Toshiya Senda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Photon Factory, KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan

### 1 はじめに

細菌の代謝経路の発現調節は転写レベルで行われることが多く、転写調節因子によって代謝経路の一連の酵素の発現が制御される。細菌の転写調節因子は構造上の特徴から幾つかのグループに分けられるが、LysR タイプ転写因子（以下、LTTR）は、アミノ酸生合成、芳香族化合物分解、病原性関連因子産生、酸化ストレスへの応答、窒素固定、二酸化炭素固定など、多くの重要な遺伝子群の発現調節を担っており、細菌の転写調節因子としては最大のグループを構成する。近年、様々な細菌のゲノムが明らかになり、1つの細菌が数十から百種類以上の LTTR 遺伝子を持つことが示された。一般に LTTR は四量体として存在し、被制御遺伝子群のプロモーター領域に存在する特徴的な逆向き繰り返し配列に結合することで DNA を折り曲げると考えられており、さらに誘導物質（代謝経路での基質または中間産物）の結合により折れ曲り角度が変化することで転写を活性化すると推測されている。しかしながら、LTTR の会合状態や DNA との結合様式、転写活性化につながる構造変化の詳細には未解明な点が多い。

我々は、細菌による芳香族化合物分解に必須なクロロカテコール分解酵素遺伝子群の転写調節因子である CbnR を研究対象として LTTR の研究を続けており、全長での LTTR としては世界で初めて CbnR の結晶構造を決定した (Muraoka *et al.*, 2003)。この結果から、LTTR が特徴的な四量体を形成することや、DNA 結合部位の V 字型構造により DNA を大きく折り曲げることができるようであることが示唆された。しかしながら、全長 LTTR-DNA 複合体及び全長 LTTR-DNA-誘導物質複合体の構造が未解明であるために、全長 LTTR に対する DNA の結合様式や誘導物質の結合によって引き起こされる制御ドメインの構造変化については不明なままである。我々の最終目標は、LTTR の一員である CbnR をモデルケースとして LTTR による転写活性化の部内機構を解明することである。しかしながら、CbnR 四量体-DNA 複合体の調製が非常に難しいことに加え、CbnR 四量体-DNA 複合体結晶の性質が悪いことが想定されたため、まずはその部分構造として CbnR の DNA 結合ドメイン (CbnR\_DBD) と *cbna* プロモーターの 25 塩基対の認識結合サイト RBS

(以降、CbnR\_DBD-RBS 複合体) の結晶構造解析を行った。

### 2 実験、結果および考察

#### 【結晶化】

CbnR\_DBD-RBS 複合体の結晶化スクリーニングは、高エネルギー加速器研究機構の構造生物学研究センターの結晶化ロボット PXS を用いて行った。その結果、沈殿剤として PEG4000 を含むいくつかの結晶化条件で結晶を得ることができた。結晶化条件の最適化を行い、32.5% PEG4000, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.2 M sodium acetate をリザーバーとして用いたシッティングドロップ蒸気拡散平衡法により 0.4 mm 程度の大きさの結晶を再現性良く得ることができた。

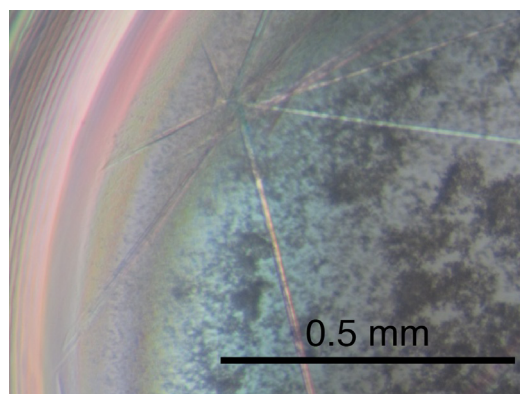


図 1: Crystals of CbnR\_DBD-RBS complex

#### 【X線回折データの収集】

PF のビームライン BL-1A, BL-17A を用いた X 線回折実験の結果、クライオプロテクタントなしで最大 3 Å 分解能程度の回折点を確認した。本測定を行った中の 1 つを Table 1 に示す。その後のクライオプロテクタントの条件検討により、最大で 2.55 Å 分解能のデータが収集できた (Koentjoro *et al.*, 2018)。低エネルギー ( $\lambda=1.9$  Å) でのデータ測定を行った結果、タンパク質分子に含まれるメチオニンやシステインの硫黄原子のほか DNA に含まれるリン原子の異常分散効果が測定でき、モデル構築の際の目印とすることができた。

### 3 まとめ

PF の構造生物学ビームライン BL-17A で CbnR の DNA 結合ドメインと認識結合サイト RBS との複合体結晶のデータを収集し、2.55 Å 分解能で結晶構造を決定した (Koentjoro *et al.*, 2018)。

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-17A
Wavelength (Å)	1.9000
Temperature (K)	95
Space group	C2
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=187.6, b=28.8, c=73.7, \beta=110.5$
Resolution (Å)	87.88–3.05 (3.21–3.05)
Observations	45,554 (6,594)
Unique reflections	13,559 (1,914)
Completeness (%)	98.20 (96.40)
Redundancy	3.3 (3.4)
Average $I/\sigma(I)$	6.6 (3.2)
Rmerge (%)	0.145 (0.253)
Mosaicity (°)	0.2
B-factor (Å <sup>2</sup> )	36.1

括弧内は最外殻分解能の値を示す

### 参考文献

- [1] S. Muraoka, R. Okumura, N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita and T. Senda: *J Mol Biol* **328**, 555 (2003)
- [2] M. P. Koentjoro, N. Adachi, M. Senda, N. Ogawa and T. Senda: *The FEBS Journal* 285, 977 (2018).

\* toshiya.senda@kek.jp