

# 全長の転写調節因子 LTTR-DNA 複合体の X 線結晶構造解析

## Crystal structure analysis of the full-length 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

細菌の代謝経路の機能調節は多くの場合オペロン単位で行われ、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ことが知られている。細菌の転写調節因子は構造上の特徴からいくつかのグループに分類され、最大のグループの一つである LysR タイプ転写因子 (LTTR) は、アミノ酸生成・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など、様々な重要遺伝子群の発現制御を担っている。LTTR は、N 末端側の DNA 結合ドメインと C 末端側の誘導物質結合ドメインから構成され、一般に四量体として存在し、およそ 60 塩基対を覆うようにして DNA に結合する。他の転写調節因子と比較して広い範囲をカバーするために認識配列の多様性を生み出しやすく、それゆえに多数のファミリーが、様々な遺伝子群の発現制御を担うようになったと考えられる。

これまで、我々のグループでは、細菌による芳香族塩素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 を研究ターゲットとして LTTR の研究を行い、全長での LTTR としては世界で初めて結晶構造を決定した [1]。さらに、CbnR の DNA 結合ドメイン (CbnR\_DBD) と認識配列 DNA (RBS) との共結晶構造を決定した [2]。これらの結果から、LTTR が特徴的な四量体を形成すること、4 つの DNA 結合部位 (DBD) が V 字型に配置することが示され、その V 字型構造により DNA を大きく折り曲げるであろうことが示唆された。しかし、全長 LTTR と DNA との共結晶構造解析の成功例がないために、DNA 結合様式の詳細を立体構造に基づいて考察することはできていない。ここでは、全長 CbnR-DNA 複合体の X 線結晶構造解析について報告する。

### 2 実験、結果および考察

#### 【結晶化】

全長 CbnR-DNA 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・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 を含む結晶化条件で約 0.3mm の長さの針状結晶を得ることができた (図 1)。

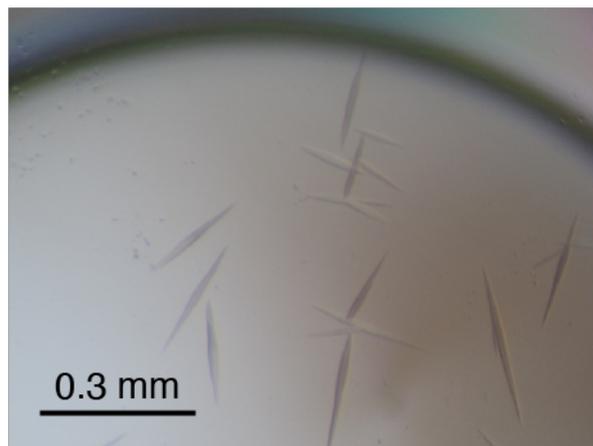


図 1: Crystals of the full-length CbnR-DNA complex

#### 【X 線回折データの収集】

PF のビームライン BL-1A を用いた X 線回折実験の結果、クライオプロテクトなしでは最大 7.5 Å 分解能程度の回折点しか確認できなかった。そのため、分解能向上のためにクライオ条件の検討を行った結果、エリスリトールを用いた場合に 3.6 Å の回折を生じる結晶を得ることができた (図 2)。

XDS と XSCALE で処理を行った結果を表 1 に示す。CbnR 四量体の結晶構造 (PDB ID=1I21) の誘導物質結合ドメインをモデルとした分子置換法で初期位相を決定し、そこに CbnR 四量体と CbnR\_DBD-RBS 複合体の構造を重ね合わせることで初期モデルを得た。分解能が 3.85 Å と低いため、モデル構築には工夫が必要であった。低エネルギー ( $\lambda=1.9$  Å) で測定したデータを用いて Anomalous Difference Fourier map を計算し、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一部を確認できるピークをモデル構築のための目印とすることは有効であった。

### 3 まとめ

PF の構造生物学ビームライン BL-1A で全長 CbnR-DNA 複合体結晶からの回折データを収集し、3.85 Å 分解能で結晶構造を決定した。

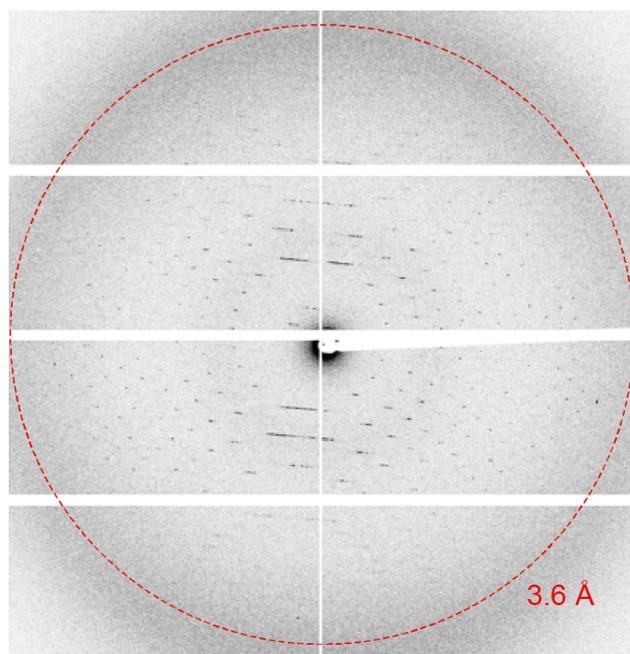


図 2: X-ray Diffraction pattern of the full-length CbnR-DNA crystal

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-1A
Wavelength (Å)	1.9000
Temperature (K)	95
Space group	<i>P6(1)22</i>
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=b=105.8, c=602.4$
Resolution (Å)	91.64–3.85 (4.06–3.85)
Observations	311,289 (47,331)
Unique reflections	35,492 (5,224)
Completeness (%)	99.2 (98.5)
Redundancy	8.7 (9.0)
Average $I/\sigma(I)$	12.4 (2.9)
Rmerge (%)	0.154 (0.909)
Mosaicity (°)	0.1
B-factor (Å <sup>2</sup> )	92.4

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