

# *Microbacterium* sp. 由来 IclR ファミリータンパク質の立体構造解析 Structural study on an IclR family protein from *Microbacterium* sp.

秋山友了, 佐々木康幸, 伊藤晋作, 矢嶋俊介\*  
東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科  
〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Tomonori Akiyama, Yasuyuki SASAKI, Shinsaku Ito and Shunsuke YAJIMA\*

<sup>1</sup>Department of Bioscience, Faculty of Life Sciences,  
Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

## 1 はじめに

*Microbacterium hydrocarbonoxydans* は、ヒドラジド化合物である 4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) を唯一の炭素源として生育可能な細菌として単離された。これはこの菌が有する Hydrazidase が HBPH を 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA) と acetophenone hydrazone に分解することで、4-HBA が菌体内で代謝され達成されることが示されている。全ゲノム解析により、hydrazidase 遺伝子は IclR ファミリー転写因子と ABC トランスポーター遺伝子を前後に位置するオペロン中に存在することが示された。IclR はグリオキシル酸オペロンの転写因子として同定され、その後、多くの細菌由来ホモログが報告されている。その特徴は、1 分子センサーとして、低分子性化合物が転写因子に結合することにより、DNA への結合状態が変わり、転写制御を行う作用を有している。また、アミノ酸 250~270 残基からなるサブユニットがホモダイマーを形成すること、モノマーはヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフをもつ DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインからなる共通の構造を有することが示されている。すなわち、当該菌では、ABC トランスポーターにより取り込まれた HBPH が Hydrazidase により分解され、生じた 4-HBA が IclR ホモログに結合することにより、遺伝子発現を制御する役割が想定された。

現在までに *Thermotoga maritima* などの IclR ホモログの全体構造 (リガンドフリー) は報告されているが、リガンドが結合した立体構造は大腸菌由来 IclR のリガンド結合ドメインを用いた構造のみである。よって、リガンド結合の有無によりなぜ遺伝子発現が制御されるのかについては未解明であった。

著者らは以前にリガンドフリーの *M. hydrocarbonoxydans* 由来 IclR ホモログの立体構造を報告している (PDB ID: 5H1A [1])。そこで本研究では、当該菌の IclR ホモログのリガンドと考えられる 4-HBA との複合体構造解析を行い、リガンド有無による IclR ホモログの転写制御メカニズムの解明を目指した。

## 2 実験

*M. hydrocarbonoxydans* 由来 IclR ホモログ遺伝子を pET28b にクローニングし大腸菌にて大量発現させ、His x 6 タグを利用して蛋白質精製を行った。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、20°C にて静置した。このとき 1 mM の 4-HBA を蛋白質溶液に加え、共結晶化を行った。回折データの取得は Photon Factory BL-5A にて行い、データ処理は XDS package と HKL2000 をもちい、初期構造は MoRDa による分子置換法により得た。サーチモデルにはリガンドフリー構造 (PDB ID: 5H1A [1]) を用いた。構造の精密化は Refmac5 による計算と Coot を用いた手動モデリングを繰り返した。

## 3 結果および考察

4-HBA を結合した IclR ホモログ結晶は 2 種類得られた。空間群と格子定数は  $P4_12_1$  ( $a = b = 83.1, c = 203.9 \text{ \AA}$ ) と  $P2_12_12_1$  ( $a = 91.5, b = 157.5, c = 83.0 \text{ \AA}$ ) であり、それぞれ分解能 2.0 Å (PDB ID: 7CUO) と 2.1 Å (PDB ID: 7DQB) で構造をえた。解析の結果はどちらも同じ構造であったことから、分解能がより高い  $P4_12_1$  を用いて構造の確認を行った ( $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.202/0.218$ )。

4-HBA を結合した IclR ホモログは非対称単位に 2 分子存在し、ホモ 2 量体を形成していた。以前に取得したリガンド非結合型 IclR ホモログの立体構造 (PDB ID: 5H1A) は、非対称単位中に 2 つの 2 量体が存在し、それらがホモ 4 量体構造を形成していた。

全体構造はリガンド結合有無で、図 1 に示すように大きく異なっているように思われたが、リガンド結合ドメイン、DNA 結合ドメインの各ドメイン毎の構造は、リガンド結合の有無で大きな差は見られなかった。唯一、リガンド結合部位の入り口にあたる部分で、リガンドフリー構造ではループ構造であったものが、 $\beta$ -鎖構造を一部構成し、結合部位を閉じるような構造となっていた。

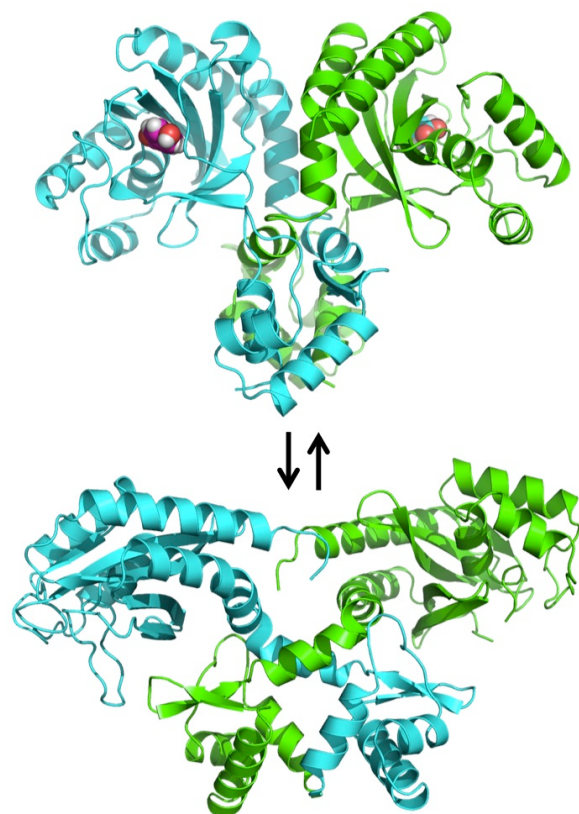


図1： *M. hydrocarbonoxydans* 由来 IclR ホモログの立体構造とコンフォメーション変化。リガンド結合型（上）とリガンド非結合型（下）

全体のコンフォメーションは、ドメインを結ぶ $\alpha$ -helix リンカー部分が動くことにより、リガンド結合有無の構造で、ドメインの配向が異なっていることが明らかとなった。このような量体形成の差異は結晶中での蛋白質同士の接触の影響を受けている結果とも考えられたことから、2量体と4量体の構造変化が水溶液中でも見られるかどうかをゲル濾過クロマトグラフィーにより確認をした。その結果、4-HBAの有無により2量体と4量体のクロマトピークが観察された[2]。

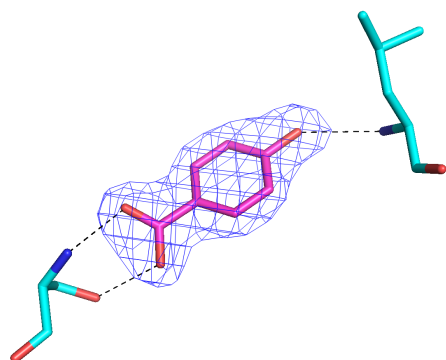


図2：4-HBAの結合様式

4-HBAの結合様式は図2のように、4位のヒドロキシ基とカルボキシル基の酸素原子が蛋白質のアミノ酸と水素結合を形成していた。このことからこのIclRホモログは、4-HBAが本来のリガンドである可能性が高いと考えられた。

#### 4 まとめ

今回の構造は、IclRファミリー転写因子において、初めてリガンド結合有無の全体構造を比較することを可能にした結果である。*M. hydrocarbonoxydans*の培養に際し、HBPHを培地に添加することによりオペロン中の遺伝子発現が上昇することは明らかとなっているが、このIclRホモログが4-HBAの結合によりどのように遺伝子発現を制御するのかは不明である。しかしながら、今回明らかにしたコンフォメーション変化は、DNA結合への影響、またポリメラーゼに対する相互作用に影響を及ぼすことで、転写を制御することが示唆される結果である。

#### 謝辞

PFスタッフの支援により成果を得ることができました。ここに感謝致します。

#### 参考文献

- [1] T. Akiyama *et al.*, *Acta Cryst.* F73 (2017).
- [2] T. Akiyama *et al.*, *BBA* **1869**, 140644 (2021).

\* yshun@nodai.ac.jp