

## レゾルシノール代謝に関わる酵素の構造解析と遺伝子産物の 構造ゲノム科学研究

### Structure Analysis of Enzymes and Structural Genomic Studies on Gene Product Which are Involved in Resorcynol Catabolism

畑安雄<sup>1,\*</sup>, 藤井知実<sup>1</sup>, 山内貴恵<sup>1</sup>, 吉田雅博<sup>2</sup>, 老川典夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都大学化学研究所, 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

<sup>2</sup>関西大学化学生命工学部, 〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35

Yasuo Hata<sup>1,\*</sup>, Tomomi Fujii<sup>1</sup>, Takae Yamauchi<sup>1</sup>, Masahiro Yoshida<sup>2</sup> and Tadao Oikawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto, 611-0011, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamatecho, Suita, Osaka 564-8680, Japan

#### 1 はじめに

スクリーニング実験により、 $\gamma$ -レゾルシノール水酸化酵素活性を示す *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 が単離された。*Rhizobium* 菌は小塊根を形成する根粒菌で、植物の根中に共生しながら空気中の窒素を固定している。この菌のユニークな共生制御タンパク質や生存にかかわる代謝系酵素は生物の生存形態の点から大変注目されている。こういった状況の下、*Rhizobium* 菌の遺伝子に関する研究から、*graA* ~ *graE* が遺伝子クラスターを形成し、このうち *graA* ~ *graD* の四つの遺伝子がコードするタンパク質 GraA, GraB, GraC, GraD がレゾルシノール代謝に関与するレゾルシノール水酸化酵素 (GraA と GraD)、ヒドロキシキノール 1,2-ジオキシゲナーゼ (GraB)、マレイル酢酸還元酵素 (GraC) に対応し、レゾルシノール代謝経路を構成していることが明らかになった。

レゾルシノール代謝経路は好気性微生物の持つ様々な芳香族化合物代謝経路の最終経路として大変重要な経路であり、我々は、この経路に関与する酵素群の機能や物性に関する分子構造面での詳細な情報を得るべく X 線結晶構造解析に取り組んでいる。今回、レゾルシノール水酸化酵素のリダクターゼ成分 GraD について、基質 FAD との二成分複合体および補酵素 NADH を加えた三成分複合体の結晶構造の解析に成功した。レゾルシノール代謝経路の最初に働くレゾルシノール水酸化酵素はフラビンを補酵素とするオキシゲナーゼ (GraA) とリダクターゼ (GraD) からなる二成分系酵素であり、GraD は NADH を用いてフラビンを還元し、GraA に供給する役割を担う酸化還元酵素である。

#### 2 実験

大腸菌を用いた大量発現系により調製した GraD について、基質である FAD との複合体 GraD-FAD の結晶を作成した。また、補酵素 NADH の結合様式を明らかにするために、GraD-FAD 結晶を NADH を含む溶液に浸漬することで、GraD-FAD-NADH 三成分複合体の結晶を調製した。

分複合体の結晶を調製した。GraD-FAD 複合体結晶については 1.79 Å まで、三成分複合体結晶の 1.77 Å までの X 線回折強度データをそれぞれ BL-5A を中心とした構造生物学ビームラインにて収集した。続いて、アミノ酸配列の相動性から類似構造を持つと予想されたタンパク質 PheA2 を初期モデルとした分子置換法により位相を決定した。その後 Refmac5 による構造精密化計算と Coot によるモデリングを繰り返して最終構造を得た。

#### 3 結果および考察

GraD-FAD 複合体について、分解能 1.79 Å で  $R = 16.7\%$  ( $R_{\text{free}} = 19.2\%$ )、三成分複合体結晶については分解能 1.77 Å で  $R = 17.1\%$  ( $R_{\text{free}} = 21.3\%$ )での構造解析に成功した。GraD 分子は A/B サブユニットからなる二量体で、各サブユニットは 11 本の  $\beta$ -ストランドと 3 本の  $\alpha$ -ヘリックスから構成されており、基質結合サイトにはそれぞれ 1 分子の FAD が結合していた。A 鎖では N 末端の 14 残基が FAD を溶媒から遮蔽していたが、B 鎖では N 末端部分の電子密度が不明瞭で不規則構造をとっており、FAD は溶媒に曝されていた。三成分複合体結晶においては B 鎖にのみ NADH が結合していた。

#### 4 まとめ

今回、レゾルシノール水酸化酵素のリダクターゼ成分 GraD について、基質 FAD との二成分複合体および補酵素 NADH を加えた三成分複合体の結晶構造を明らかにすることができた。今後は、アポ酵素および補酵素 NADH を含む二成分複合体などの解析を行い、より詳細な反応機構の解明を目指す。

#### 謝辞

データ測定にあたり、PF スタッフの方々に深く感謝いたします

\* hata@scl.kyoto-u.ac.jp