



# 九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：1305052F

BL番号：BL-07

(様式第5号)

## 南極産好冷細菌由来グルコキナーゼの高分解能X線結晶解析 High resolution X-ray crystallographic analysis of glucokinase from Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. AS-131

本島 浩之、渡邊 啓一  
Hiroyuki Motoshima, Keiichi Watanabe

佐賀大学  
Saga University

- ※1 先端創生利用(長期タイプ、長期トライアルユース)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記して下さい。
- ※2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開(論文(査読付)の発表又は研究センターの研究成果公報で公表)が必要です。(トライアルユースを除く)

### 1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

南極産好冷細菌由来グルコキナーゼのグルコース及びATPアナログを含む条件での共結晶を作成した。複合体結晶の回折実験の結果、得られた回折データが3.0 Åと低分解能、かつR-mergeが悪くデータ収集には適さない結晶であったため、構造解析を行うことができなかった。

#### (English)

We have created a co-crystal of conditions, including the ATP analog and glucose complex of glucokinase from Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. AS-131. Results diffraction experiments of complex crystals, because collection preparative data R-merge poor diffraction data were obtained at low resolution at 3.0 Å, these data could not be carried out structural analysis.

### 2. 背景と目的

低温環境で生育する生物の保有する酵素は低温に適応している酵素(低温適応酵素)であると考えられている。低温適応酵素とは温度低下による化学反応速度低下を、酵素の構造の動き(ゆらぎ)を大きくすることによって、低温での活性低下を防いでおり、それゆえ熱安定性が低いものが多いといわれている。今回用いる南極産好冷細菌由来グルコキナーゼ(PsGk)はこれまでの研究により、中温菌である大腸菌 K-12 株由来グルコキナーゼ(EcGk)と比較して熱安定性が20℃高く、活性の温度依存では至適温度が5℃低く、至適温度以下では約6倍活性が高いことがわかっている。この特徴はこれまでの低温適応酵素では見られない熱安定性の高い低温適応酵素であることがわかった。また、基質であるグルコースとATPに対する親和性を調べた実験から、南極産好冷細菌由来グルコキナーゼ(PsGk)は大腸菌 K-12 株由来グルコキナーゼ(EcGk)と比較して、グルコースの場合、あまり違いは見られなかったが、ATPの場合、親和性の低下が見られた。ATP結合部位はヒト由来グルコキナー

ゼの X 線結晶構造からわかっており、南極産好冷細菌由来グルコキナーゼ (PsGk) はその領域の近傍に 5 残基の挿入が見られた。

### 3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

大腸菌で発現した好冷細菌由来グルコキナーゼを用いた。このグルコキナーゼは 1 mM グルコース、1 mM ATP アナログ (PNP) を含む蛋白質溶液に沈殿溶液 0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate、0.1 M Tris pH 8.5、25% w/v PEGMME 2000 の条件にから生じた結晶を用いた。

用いる試料は単結晶のタンパク質の結晶で、放射線照射による劣化を防ぐため、窒素噴きつけによる低温測定 (100 K) を行う。測定は単結晶 X 線回折実験。測定条件は波長 1 Å 前後、試料温度 100K、 $2\theta$  角度範囲  $0^\circ$ 、振り角  $1^\circ$ 、カメラ長 100 mm で行った。

#### Summary of data collection statistics

Spacegroup	P4132		
Unit cell dimensions	168.19	168.19	168.19
	90.00	90.00	90.00
Mosaicity	0.78		
Resolution range	23.32 – 3.05	(3.15 – 3.05)	
Total number of reflections	353835		
Number of unique reflections	16069		
Average redundancy	22.02	(21.98)	
% completeness	99.8	(99.2)	
Rmerge	0.766	(0.939)	
Rmeas	0.784	(0.961)	
RmeasA (I+,I- reflns kept apart)	0.787	(0.962)	
Reduced ChiSquared	0.99	(0.82)	
Output $\langle I/\sigma I \rangle$	3.7	(2.6)	

Note: Values in () are for the last resolution shell.

### 4. 実験結果と考察

今回は基質を含まない結晶とは結晶系が異なっていたため、基質アナログが結合している可能性が高かったが、得られた回折データが 3.0 Å と低分解能、かつ R-merge が悪くデータ収集には適さない結晶であったため、構造解析を行うことができなかった。

### 5. 今後の課題

現段階では基質や基質アナログを含んだ複合体結晶を得ることができていないので、結晶が条件と基質アナログの変更および検討を行い、複合体結晶の調整を行う必要がある。

## 6. 参考文献

2013年度 修士論文 (湧川)  
2011年度 修士論文 (織田)  
2010年度 修士論文 (中山)  
2009年度 修士論文 (小川)

## 7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

## 8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

好冷細菌、グルコキナーゼ、ATP アナログ

## 9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消して下さい。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入して下さい(2012年度実施課題は2014年度末が期限となります。))

② 研究成果公報の原稿提出

(提出時期：2016年 3月)