



# 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：1210106F

B L 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基質複合体の X 線結晶解析

X-ray crystallographic analysis of glucokinase complex 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 ADP を含む条件での共結晶を作成した。それらの結晶の X 線回折実験を行った結果、グルコキナーゼは複合体を形成していなかった。

#### (English)

We have created a co-crystal of conditions, including the ATP and glucose complex of glucokinase from Antarctic *Pseudoalteromonas* sp. AS-131. Result of the X-ray diffraction experiments of their crystals, glucokinase did not form a complex.

### 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 ADP 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 1Å前後、試料温度 100K、2θ 角度範囲 0°、振り角 1°、測定枚数 180 枚もしくは 360 枚、検出器 CCD、カメラ長 50 ~ 200 mm

#### Summary of data collection statistics

Spacegroup	P3121		
Unit cell dimensions	98.08	98.08	59.33
	90.00	90.00	120.00
Mosaicity	1.45		
Resolution range	16.84 – 2.00	(2.07 – 2.00)	
Total number of reflections	453631		
Number of unique reflections	22496		
Average redundancy	20.16	(19.90)	
% completeness	100.0	(99.9)	
Rmerge	0.109	(0.839)	
Rmeas	0.112	(0.862)	
RmeasA (I+,I- reflns kept apart)	0.112	(0.856)	
Reduced ChiSquared	0.96	(1.16)	
Output <I/sigI>	8.2	(1.5)	

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

### 4. 実験結果と考察

測定データはが得られたが、基質を含まない結晶と同じ結晶系で、構造解析の結果、基質を含まない構造であった。

### 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

- 2011年度 修士論文 (織田)  
2010年度 修士論文 (中山)

**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、複合体

**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: 2015年 3月)**