

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目      ビタミン B<sub>6</sub> に依存する *Bacillus subtilis* の転写制御因子 GabR に関する研究

氏名      奥田 啓太

## 論文内容の要旨

GntR スーパーファミリーはバクテリアの転写因子としては最大のファミリーを形成しており、様々な生化学プロセスに関わる遺伝子の転写制御を行っている。GntR スーパーファミリータンパク質は、N 末端側の DNA 結合ヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) ドメインと多様性に富む C 末端ドメインで構成される。N 末端の DNA 結合ドメインは保存性が高く、核となる 3 つの  $\alpha$ ヘリックスと wing となる 1 つの  $\beta$ シートによってウィングドヘリックスターンヘリックス (wHTH) を形成している。これまでの研究から、C 末端ドメインはオリゴマー化とエフェクター結合に関与すると考えられている。GntR スーパーファミリーは C 末端ドメインのアミノ酸配列に基づいて、さらに AraR、DevA、FadR、HutC、MocR/GabR、PlmA、YtrA の 7 つのサブファミリーに分類される。このうち MocR/GabR サブファミリーの C 末端ドメインは、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 酵素であるアミノトランスフェラーゼと高い相同性を示す。ビタミン B<sub>6</sub> の補酵素型である PLP は、グリコーゲンホスホリラーゼを除けばアミノ基転移やラセミ化、脱炭酸などアミノ酸の代謝に関わる酵素の補酵素として機能する。PLP の補酵素作用とその機構はこれまで幅広く研究されてきたが、転写因子 MocR/GabR サブファミリーにおける PLP の役割については十分な研究はなされてこなかった。

本研究で取り上げた *Bacillus subtilis* の GabR は MocR/GabR サブファミリーの中で最も研究が進んでいる転写因子であり、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の資化に関わっている。GabR は、自身をコードする *gabR* 遺伝子とこれと逆向きに隣接する *gabTD* オペロンの転写を制御する。GabR は GABA 非存在下では *gabR* と *gabTD* プロモーターの転写を抑制し、GABA 存在下では *gabTD* の転写を活性化する。*gabT*、*gabD* 遺伝子はそれぞれ GABA アミノトランスフェラーゼ (GABAT) とスクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSDH) をコードする。GABAT は GABA と  $\alpha$ -ケトグルタル酸

の間のアミノ基転移反応を触媒し、グルタミン酸とスクシニクセミアルデヒド(SS)を生成する。生成した SS は GabD によって NAD<sup>+</sup> 依存的にコハク酸に酸化される。このように GabR による *gabTD* 転写の制御は GABA 分解に対し合目的的に機能する。X 線結晶構造解析の結果では、GabR は結晶中で head-to-tail 型のホモダイマーで存在し、モノマーを構成する N 末端ドメインと C 末端ドメインは 29 アミノ酸残基からなるリンカーで結合している。また C 末端ドメインは *Thermus thermophilus* HB27 の 2-アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ (Z = 37.8、25% 配列相同性; PDB ID: 2ZYJ) などのアミノトランスフェラーゼと高い相同性を有し、これらの酵素の活性発現に必要な残基の多くが GabR にも保存されていることが明らかとなっている。以前の研究において、これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した場合 *gabTD* 転写活性化能が失われたことから、C 末端ドメインは転写活性化において、部分的にはあれアミノトランスフェラーゼ反応と同様の挙動を示すことが示唆されている。ただし GabR は、GABA と  $\alpha$ -ケトグルタル酸との間のアミノ基転移反応を触媒しない。本研究では現在不分明の状況にある転写制御因子における PLP 機能の解析を中心に、GabR の構造機能相関の解明を目的とした。

本論文の第 1 章では、GABA 添加によって C 末端ドメインがどのような分子メカニズムによって *gabTD* の転写活性化をもたらすのかを検討した結果を記した。分光学的解析から、GabR はその Lys 残基と PLP 間で分子内シッフ塩基を形成し、これがそれぞれ 420 nm と 330 nm に吸収極大を示すケトエナミン型とエノールイミン型の平衡状態にあることを明らかにした。ここに GABA を添加した場合には 420 nm のピークが減少し、330 nm のピークが増加した。蛍光分析の結果、この増加した 330 nm ピークは PLP と GABA 間で形成される分子外シッフ塩基に由来することが示唆された。即ち、GabR と GABA の反応はアミノ基転移反応の中間体である分子外シッフ塩基形成で停止するものと考えられる。

GabR と GabR 結合領域を含む 51 bp の DNA フラグメントとの結合の等温滴定カロリメトリー (ITC) による熱力学的解析を行った。その結果、GABA の有無は、GabR と DNA との結合における  $\Delta G_{\text{binding}}$  にはほとんど影響しないものの、 $\Delta G_{\text{binding}}$  に対する  $\Delta H$  と  $\Delta S$  の寄与の度合に大きな影響を与えることが明らかとなった。すなわち、GABA の存在・非存在において GabR と DNA フラグメントの親和性は変わらないものの、その結合の様式が変化すると考えられた。さらに ITC の結果では、2 分子の GabR が 1 分子の DNA フラグメントと結合することが示唆された。以上の結果から、DNA に結合した GabR に GABA を加えた場合には、GabR は GABA と分子外シッフ塩基を形成することにより構造変化を起こし、DNA から遊離することなく DNA との結合様式を変化させ、結果として *gabTD* 転写の活性化をもたらすと推測された。これらの推測は、DNA-directed *in vitro* タンパク質合成システムを利用した *gabT* プロモーター制御下でのルシフェラーゼ発現実験によって支持された。

本論文の第 2 章では GabR のドメイン間相互作用の解析を目的とし、GabR の N 末端ドメインと C 末端ドメインにそれぞれ相当するペプチドフラグメント、N'-GabR と

C'-GabR を発現・精製し、それらの性質を分析した結果について記述した。N'-GabR と C'-GabR は *E. coli* の可溶性画分に発現したことから、各ドメインフラグメントは独立したフォールディングユニットとして振る舞う可能性が示された。野生型 GabR は GABA とのみ結合するのに対して、C'-GabR は GABA に加えて何種類かの  $\omega$ -アミノ酸や D-アミノ酸と結合した。このことから、野生型 GabR では N 末端ドメインが C 末端ドメインのリガンド特異性を制御していることが示唆された。GabR は GABA 分解に関与する *gabTD* オペロンの転写制御因子であるため、このリガンド特異性は重要である。electrophoretic mobility shift assay (EMSA) において、野生型 GabR は GabR 結合配列を含む DNA フラグメントと複合体を形成したのに対して、N 末端ドメインフラグメントは、単独あるいは C 末端ドメインフラグメント存在下でも DNA との結合能を示さなかった。両ドメインフラグメントが協同作用を示さなかったことから、リンカーによる両ドメインの結合がドメイン間相互作用に重要な役割を担うことが推測された。N'-GabR の DNA 結合能とオリゴマー化の関係を評価するために、野生型 GabR の C 末端ドメイン部分を、ダイマー構造を有する *T. thermophilus* の 2-アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼと置き換えた融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質は DNA フラグメントと結合したことから、N 末端ドメインのオリゴマー化が DNA 結合に必要であると推測された。即ち、C 末端ドメインはダイマー化を通して N 末端ドメインに DNA 結合能を付与するものと考えられた。

以上述べたように、本研究ではこれまで不分明な状況にあった PLP の転写制御因子における機能を明らかにするとともに、GabR の構造とその転写制御活性の相関について検討した。本研究は原核細胞における転写制御機構研究に新たな頁を加えるものである。また MocR/GabR スーパーファミリーに属する転写制御因子がグラム陽性菌、グラム陰性菌を問わず様々なバクテリアに存在することから、本研究の成果は将来的には転写制御の攪乱を目的とした新たな抗生物質の創成に役立つものと考えている。