

論文審査の結果の要旨および担当者

| | | | |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

氏 名 奥 田 啓 太

論 文 題 目

ビ タ ミ ン B6 に 依 存 す る *Bacillus subtilis* の 転 写 制 御 因
子 GabR に 関 す る 研 究

論 文 審 査 担 当 者

| | | |
|-----|----------|---------|
| 主 査 | 名古屋大学教授 | 吉 村 徹 |
| 委 員 | 名古屋大学教授 | 下 村 吉 治 |
| 委 員 | 名古屋大学准教授 | 邊 見 久 |
| 委 員 | 名古屋大学助教 | 伊 藤 智 和 |

論文審査の結果の要旨

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 α ヘリックスと wing となる 1 つの β 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。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おり、**GntR** スーパーファミリーはそのアミノ酸配列に基づいて、**AraR**、**DevA**、**FadR**、**HutC**、**MocR/GabR**、**PlmA**、**YtrA** の 7 つのサブファミリーに分類されている。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 B₆ 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。

本研究で取り上げられた *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、 γ -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 α -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⁺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。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、部分的にで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 α -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。本研究は不分明の状況

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ものである。

本研究ではまず、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。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。GABA を添加した場合にはこの 420 nm のピークが減少し、330 nm のピークが増加した。蛍光分析では、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。これらの結果から、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結論した。

続いて本研究では、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ーメトリー (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 ΔH と ΔS の寄与の度合に大きな影響を与えることが明らかにした。これにより 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推定した。さらに ITC の結果から、2 分子の GabR が 1 分子の DNA フラグメントと結合することを示した。以上の結果、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した。本研究で行われた 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は、これらの推測を支持した。

本研究ではさらに 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。N'-GabR と C'-GabR が *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を示した。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 ω -アミノ酸や D-アミノ酸と結合することを明らかにした。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ものと推測した。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ものと推定した。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が 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 結合に必要であること、すなわち GabR の 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 結合能を付与していると結論した。

以上のように、奥田啓太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共に、GabR のドメイン構造と転写制御活性の相関について検証した。本研究は原核細胞における転写制御機構の構造生物学的研究に新たな頁を加えるものであると考えられる。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細菌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可能性も想定される。本研究は新規性、独自性等の点から微生物学や分子遺伝学、ビタミン学などの分野における高い学術的価値を有し、これら分野の今後の研究に大きく貢献するものと考えられる。よって当審査委員会は本論文が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

