

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

奥田 啓太

名古屋大学大学院 生命農学研究科

応用分子生命科学専攻 応用生命化学講座 生体高分子学研究室

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。GntR スーパーファミリーは多様な 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していると考えられている。例えば FadR サブファミリーの *Escherichia coli* FadR は脂肪酸の生合成と分解を制御しており、C 末端ドメインにアシル CoA 結合部位を有している。アシル CoA の結合はタンパク質全体の構造変化を引き起こし、FadR の DNA 結合能を喪失させる (Van Aalten et al., 2001)。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、脱炭酸などのアミノ酸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、 γ -アミノ酪酸 (GABA) の資化に関わっている (Belitsky, 2004 ; Belitsky & Sonenshein, 2002)。GabR は、*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(Fig. 1)(Edayathumangalam, et al., 2013、Okuda et al., 2015)。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 α -ケトグルタル酸との間のアミノ基転移反応(全反応)を触媒しない。本研究では転写制御因子における役割は不明の状況にある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。

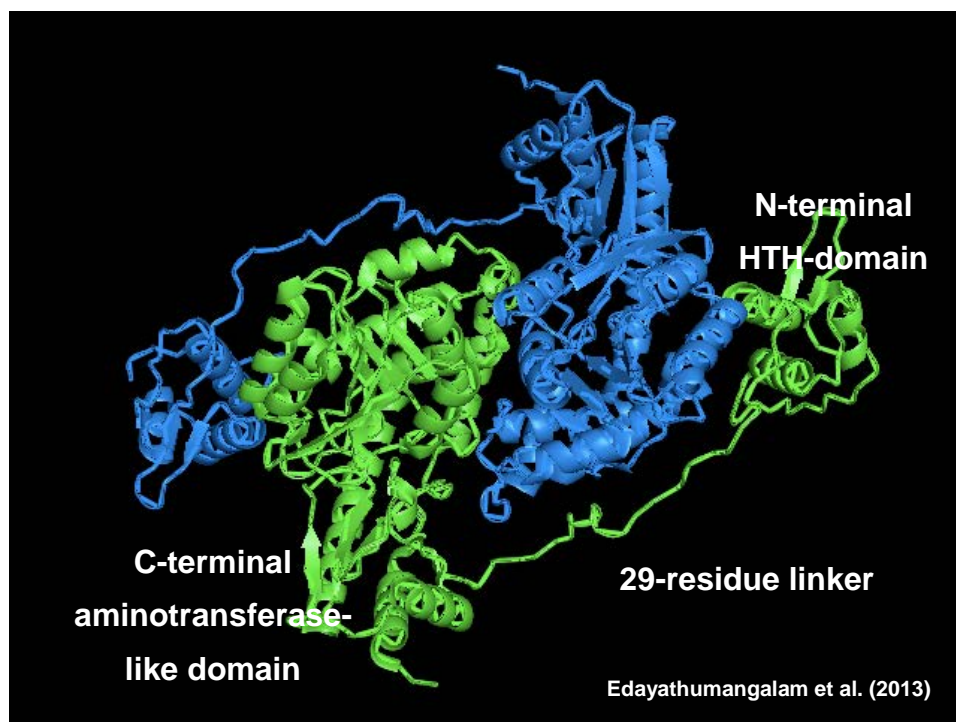


Fig. 1. GabRの立体構造

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を経て*gabTD*の転写活性化をもたらすのかを検討した結果(Okuda et al., 2015)を記した。

分光学的解析から、GabR はその Lys 残基 (Lys312) 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 の添加によって 420 nm のピークが減少し、330 nm のピークが増加した。この吸収スペクトルの変化は GabR と GABA が反応し、何らかの分子種が生成した事を示す。そこで両者がアミノ基転移反応の半反応を起こし、ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) が生成する可能性を検討したが、抽出した補酵素を HPLC で解析した結果 PMP 生成は認められなかった。最終的に、蛍光分析の結果からこの増加した 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ものであることが明らかとなった。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と考えられる。

次に GabR と GabR 結合領域を含む 51 bp の DNA フラグメントとの結合について、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 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となった (Table 1)。

Table 1. GabR と GabR 結合配列をコードする 51-bp DNA フラグメントとの結合の熱力学的解析

Ligand	n	Kd (nM)	ΔG (kJ \cdot mol $^{-1}$)	ΔH (kJ \cdot mol $^{-1}$)	ΔS (J \cdot K $^{-1}$)
None	0.47	36.4 \pm 21.6	-42.46 \pm 1.47	-12.42 \pm 0.33	100.7 \pm 5.1
(+) PLP,GABA	0.44	69.8 \pm 16.5	-40.85 \pm 0.59	-40.56 \pm 0.63	0.9 \pm 2.9

すなわちリガンド非存在下では ΔS ($\Delta S = 100.7 \pm 5.1 \text{ JK}^{-1}$ 、 $-T\Delta S = -30 \text{ kJ mol}^{-1}$) の寄与が ΔH ($\Delta H = -12.4 \pm 0.6 \text{ kJmol}^{-1}$) の寄与より大きかった。一方リガンド存在下では ΔH の寄与が大きく、大きな負の ΔH ($\Delta H = -40.9 \pm 0.6 \text{ kJmol}^{-1}$) と小さな ΔS ($\Delta S = 0.9 \pm 2.9 \text{ JK}^{-1}$ 、 $-T\Delta S = -0.268 \text{ kJ mol}^{-1}$) が観察された。このような熱力学的な違いが、どのような構造的相違に由来するかは構造解析等の検討を待つしかないが、例えばリガンド存在下では GabR と DNA フラグメント間で新たに水素結合が形成されるといったことが考えられる。ITC による解析では、GabR と DNA フラグメントの結合モル比を示す n 値はリガンド存在下、非存在下でそれぞれ 0.47 と 0.44 と算出された。これらの結果は、リガンドの有無に関わらず 2 分子の GabR が 1 分子の DNA に結合することを示している。以上の結果は、GABA の存在・非存在によって 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ことを示している。すなわち 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る。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。すなわち、GabR 非存在下では *gabT* プロモーターによる低いルシフェラーゼ活性が検出されるのに対して、GabR 存在下で GABA 非存在の場合にはルシフェラーゼ活性は検出されなかった。一方、GabR と GABA の共存在下では GabR 非存在下と比較しておよそ 10 倍のルシフェラーゼ活性が検出された。この結果は、GabR は GABA 非存在下で *gabT* プロモーターを抑制し、GABA 存在下で活性化することを半定量的に示したものである。

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 ω -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。なお C'-GabR は GabR 同様、アミノ基転移反応の全反応、半反応ともに触媒しなかった。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'-GabR は、単独あるいは C'-GabR 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機能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ものと考えている。

文献

Belitsky, B. R. (2004). Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for de novo pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **186**, 1191-1196.

Belitsky, B. R., & Sonenshein, A. L. (2002). GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of γ - aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **45**, 569-583.

Edayathumangalam, R., Wu, R., Garcia, R., Wang, Y., Wang, W., Kreinbring, C. A., & Liu, D. (2013). Crystal structure of *Bacillus subtilis* GabR, an autorepressor and transcriptional activator of *gabT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 17820-17825.

Okuda K, Kato, S., Ito S., Shiraki S, Kawase S., Goto M., Kawashima S., Hemmi, H., Fukada, H., and Yoshimura, T. (2005) Role of the aminotransferase domain in *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator
Mol. Microbiol. **95**, 245-257.

Van Aalten, D.M., DiRusso, C.C., Knudsen, J. (2001) The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J.* **20**, 2041-2050.