

論文内容の要旨

論文題目 超好熱性古細菌由来の Lrp/AsnC ファミリー蛋白質の結晶化と立体構造決定

氏名 工藤 紀雄

1. はじめに

生物体内において蛋白質の生産は遺伝子 (DNA) から mRNA、蛋白質へと合成されており、蛋白質生産は、主に DNA から mRNA への転写の段階で転写因子と呼ばれる蛋白質によって制御されている。転写制御に関与する蛋白質は、RNA ポリメラーゼと共に転写に直接関与する基本転写因子と、それら基本転写に作用し、転写制御を行う特異的転写因子に分類される。

古細菌における転写制御では、基本転写は TATA ボックス結合蛋白質を用いていることが知られている。一方、それら基本転写因子の制御を行う特異的基本転写因子については、ほとんど解明されていなかった。近年、古細菌のゲノム配列が数多く決定され、その解析から、古細菌には真正細菌様の特異的転写因子の遺伝子を持つことが明らかとなった。その中でも、真正細菌に広く存在する Lrp/AsnC ファミリー(Lrp: Leucine responsive regulatory protein, AsnC: Asparagine synthetase の制御因子)遺伝子が数多く存在しており、古細菌の転写制御に大きな役割を果たしていると考えられた。

2. Lrp/AsnC ファミリー蛋白について

大腸菌 Lrp は、50 種類以上の代謝制御関連遺伝子の発現を転写の促進、抑制の両面で制御しており、特に菌体のロイシン濃度によってその制御に変化することが知られている。これは、栄養状態の良い時、悪い時など、生育環境の変化に対応し、遺伝子発現の促進、抑制を行うための機構であると考えられている。また、大腸菌の菌体内には、約 3000 個の Lrp 分子が存在することが確認されており、Lrp は遺伝子制御のプラットフォームとしてクロマチン構造を形成することが予想されている。

Lrp/AsnC ファミリーに分類される蛋白質の立体構造はいまだに決定されていない。そこで、Lrp/AsnC ファミリー蛋白質の立体構造を X 線結晶解析法を用い決定し、Lrp/AsnC ファミリーの転写制御機構を明らかにすることを目的とした。

本研究では、超好熱性古細菌 *Pyrococcus* sp. OT3 を対象とした。この菌の全ゲノム配列が決定されており、その解析から特異的転写因子として 22 種の遺伝子が同定されていた。そのうちの 14 種が Lrp/AsnC ファミリーの遺伝子であった。また、そのうち 11 遺伝子は、160 残基の Lrp 全体をコードする一方、3 遺伝子は約 80 残基の Lrp の C 末端側をコードするだけの短い Lrp(以下、demi-Lrp と呼ぶ)であった。

3. Lrp/AsnC ファミリー蛋白質の発現系の構築、結晶化

Pyrococcus sp. OT3 の Lrp/AsnC ファミリー蛋白質 14 種類について、大腸菌を用いた発現系の構築を行った。PCR 法によって *Pyrococcus* OT3 のゲノムよりクローン化し、T7 プロモータを用いた発現ベクターを作成した。作成したベクターを大腸菌に形質転換し、蛋白質の発現を試みた。その結果、4 種類の Lrp について発現が確認された。3 種類は Lrp であり、1 種類は、demi-Lrp であった。これらの蛋白質を精製し、結晶化を行った。その結果、Lrp 2 種については、0.1 mm 角程度の小さい結晶を得ることに成功したが、分解能が 3 Å 程度の結晶であった。しかし、demi-Lrp については、PEG 6000, LiCl を用いた条件において良質な単結晶を成長させることに成功した。demi-Lrp の結晶は 0.2 mm 程度の大きさに成長し、実験室系の X 線回折装置では 2.3 Å、シンクロトロン放射光では 1.8 Å の分解能の反射を与え、結晶の空間群は、回折点の幾何学的解析から $P3_121$ または $P3_221$ と決定された。また、結晶格子の大きさは、 $a = b = 96.8$ Å、 $c = 98.5$ Å と決定することができた。

4. Lrp/AsnC ファミリー蛋白質の立体構造決定

Lrp/AsnCファミリーに分類される蛋白質の立体構造は、いまだに決定されていない。そのため、重原子同型置換法(MIR法:multiple isomorphous replacement)によって行った。得られた demi-Lrp の結晶を用い、水銀や白金、金、など約50種類ほどの重原子を結晶に浸透させ、重原子同型置換体結晶の作成を試みた。その結果、白金($K_2[Pt(CN)_6]$)、金($K[AuCl_4]$) の2種類の重原子を用いた同型置換体結晶を得ることに成功した。重原子誘導体結晶から得られたデータから、 3.0\AA までの位相を決定し、位相改良を行った結果、蛋白質モデルを構築できる良好な電子密度図を得ることができた。この電子密度図から蛋白質分子のモデルを構築し、さらに放射光実験施設SPring-8 BL24XU (Hyogo-BL)で測定した 1.8\AA 分解能のデータを用い、モデルの改良を重ねた。その結果、 R -factor 21.2% と精度よく立体構造を決定することができた。

決定した demi-Lrp は、4本の β シート、2本の α ヘリックスから成る構造であった。この構造と既知の蛋白質立体構造との比較を行ったが、類似の立体構造は見つからず、新規の構造であると考えられた。また、分子は2本の水素結合を介して2量体を形成していた。

demi-Lrpは結晶中では、8分子(4つの2量体)が一つの固まりを形成しており、8分子でディスク状の構造を形成していた。ゲルろ過の結果からも溶液中では8分子を単位として存在すると考えられた。この8分子ディスク状構造は、直径が 60\AA で厚みは 40\AA 程度の大きさであった。

5. Lrp/AsnCファミリー蛋白質の立体構造の解析

8分子ディスク状構造

Lrp/AsnCファミリー蛋白質のN末端ドメインには、helix-turn-helixのDNA結合モチーフが存在することがアミノ酸配列の解析から予測されている。そこでDNA結合ドメインの大きさを予測し、demi-Lrp立体構造のN末端部分に配置したモデルを作成した。すると、8分子ディスク状構造の外周を一周する形でDNA結合ドメインを配置することが出来た。またこのモデルに対し、DNA二重らせんを一周させると約100bpで一周する計算となった。これは、大腸菌Lrpのフットプリント実験での報告とよく一致する。また、DNA結合ドメイン一つあたりのDNAの湾曲は45度($360\text{度}/8\text{分子}$)と計算され、この数字も、大腸菌LrpでのDNA

湾曲角度（52度）の報告と良く一致している。つまり、Lrpは、DNA二重らせんを外周にひと巻きする形を取ることが予測された。

ロイシン濃度の感知

大腸菌 Lrp では、ロイシン濃度によって転写制御に変化が生じることが知られており、アミノ酸改変体実験から、ロイシン濃度感知に関係する残基が7つ同定されている。この残基を demi-Lrp 立体構造に当てはめると、二量体同士が弱く結合を形成しているクレフト部に存在していた。このクレフト部にロイシン分子を導入したモデルを作成すると、二量体の間で形成されていた相互作用がロイシン分子によって消失する。つまり、ロイシンが多量体構造のクレフト部に侵入することで、多量体間の相互作用に変化が生じ、多量体構造が破壊されることが予測された。demi-Lrp 結晶をロイシンの溶液に結晶を浸透させると、結晶に亀裂が入り、白濁した。これもロイシンの作用を示唆する結果であると考えられる。

シリンダー状の空間

さらに、8分子ディスク状構造の中心部には、直径約12Åのシリンダー状の空間が存在していた。その空間には、アミノ酸などの低分子が入り込める大きさであることから、この空間に分子が入り込み、多量体の形成に影響を与えているモデルが考えられた。この空間に位置する残基の多様性から、この空間に様々なリガンドが導入され、その選択性によって多量体が安定化もしくは不安定化されるモデルを考えた。また、N末端にヒスチジンのタグ(His-tag)をつけた融合型Lrp蛋白質とdemi-Lrpを混合し、ニッケルカラムを用いた実験を行ったところ、Lrpとdemi-Lrpがヘテロ多量体を形成することを示唆する結果を得た。このことから、Lrp, demi-Lrpは、様々な組み合わせで多量体を形成し、転写の制御を行っていると考えられた。

6. まとめ

Pyrococcus OT3 由来の Lrp/AsnC ファミリー蛋白質 demi-Lrp について、X線結晶解析法による立体構造決定を行った。Lrp/AsnC ファミリーに分類される蛋白質では、初めての立体構造決定である。得られた構造から、ロイシン濃度の感知機構や、多量体形成機構について解析を行い、Lrp/AsnC ファミリーの転写制御機構について考察を行った。