

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏 名 夏目 亮

指導教官名 堀之内 末治

論文題目 放線菌の自己調節因子レセプターの X 線結晶構造解析

放線菌 *Streptomyces griseus* は、原核生物でありながらも形態分化し、それに同調して抗生物質等を生産する。これらの現象は、細胞内／細胞間情報伝達物質である自己調節因子 A-ファクターによって引き起こされる。A-ファクターは、 $\gamma$ -ブチロラクトン環を有する低分子性の微生物ホルモンであり、特異的な受容体に結合し、抗生物質等の二次代謝産物の生産や気中菌糸形成、胞子形成などの形態分化を誘導する。A-ファクターの受容体である ArpA (A-factor receptor protein) は、リプレッサーとして機能する DNA 結合蛋白質である。ArpA は A-ファクターと結合することによって標的遺伝子のオペレーター領域から解離し、その結果 A-ファクターカスケード系の遺伝子群の転写が次々と誘導され、二次代謝や形態分化が引き起こされる。同様の自己調節因子-受容体系は広く放線菌から見つかっており、二次代謝に関わる遺伝子群の転写を制御する放線菌に共通した機構と考えられる。様々な放線菌から単離されている自己調節因子は、いずれも  $\gamma$ -ブチロラクトン環を有する非常に類似した低分子性化合物であるが、対応する受容体はこれら化合物を極めて特異的に認識する。

放線菌のモデル菌として研究されている *S. coelicolor* A3(2)には、ArpA と相同な CprB が存在する。当研究室の以前の研究で、CprB は DNA 結合能を持ち、ArpA 同様にリプレッサーとしての機能を持つことが示されている。

当研究室の大きな目標は、ArpA の結晶構造および A-ファクター、DNA との複合体の構造を決定することによりその分子機構を明らかにすることであるが、本研究では結晶化の可能な CprB の立体構造を解明することとした。放線菌の自己調節因子受容体の立体構造は、これま

で一例も明らかになっていないため、CprB の立体構造から自己調節因子-受容体系の転写調節機構を明らかにしようとするものである。

## 1. CprB の結晶化および X 線結晶構造解析

大腸菌により CprB を大量発現させ、精製および結晶化を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶を得た。PEG6000 を沈殿剤として用いた同一の結晶化条件において、3種の異なる結晶が成長した。それぞれの結晶を以下、Form A (セレノメチオニン置換 CprB、晶系；斜方晶、空間群； $P2_12_12_1$ 、格子定数； $a = 38.15 \text{ \AA}$ ,  $b = 68.07 \text{ \AA}$ ,  $c = 145.42 \text{ \AA}$ )、Form B (wild type CprB、晶系；斜方晶、空間群； $P2_12_12_1$ 、格子定数； $a = 37.79 \text{ \AA}$ ,  $b = 69.56 \text{ \AA}$ ,  $c = 148.93 \text{ \AA}$ )、Form C (セレノメチオニン置換 CprB、晶系；正方晶、空間群； $P4_12_12$ 、格子定数； $a = b = 111.95 \text{ \AA}$ ,  $c = 43.44 \text{ \AA}$ ) とする。CprB の結晶は同一の形状、晶系の結晶においても結晶の格子定数が異なり、明らかに同型性が低いものだったため、Form A の結晶を用いて多波長異常分散法により初期位相を求めた。プログラム RESOLVE によって改良して得られた電子密度図からモデルを構築し、Form A の結晶構造を  $2.4 \text{ \AA}$  分解能で決定した。次に、Form B の結晶を用い、Form A の立体構造を初期モデルとして分子置換法により解析し、 $2.3 \text{ \AA}$  分解能で結晶構造を決定した。また、Form C の結晶についても Form A の立体構造を初期モデルとして分子置換法で解析し、 $3.0 \text{ \AA}$  分解能で結晶構造を決定した。

## 2. CprB の構造

CprB は二量体を形成しており、サブユニット会合面において両サブユニットの Cys159 間で S-S 結合を形成していた。各サブユニットは 10 本の  $\alpha$ -ヘリックスで構成され、N 末端側のドメイン (Ala2-Phe50) と C 末端側のドメイン (Ser81-Ala215) の 2 つのドメインからなることが明らかになった。2 つのドメインは、N 末端側から 4 番目の非常に長いヘリックス (Helix-4 ; Lys53-Asp74) によりつながっていた。

N 末端側のドメインは 3 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなり、典型的なヘリックス-ターン-ヘリックス DNA 結合構造モチーフを持っていたため、DNA 結合ドメインとして機能していることが示唆された。一方、C 末端側のドメインは 6 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなり、自己調節因子との結合に必須であることが推測される Trp127 を含む。さらに、Trp127 周辺では自己調節因子受容体間で保存性の高い疎水性の残基からなる疎水ポケットが形成されていたことから、C 末端側のドメインは自己調節因子が結合する調節ドメインとして機能していることが示唆された。

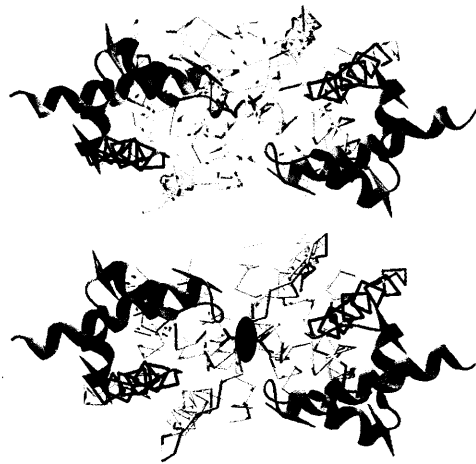
これらのことは、以前の ArpA への部位特異的変異導入の結果に合致している。自己調節因子レセプターのアミノ酸配列の相同性から、今回決定した構造は、ArpA をはじめとする自己調節因子レセプターの構造と基本的に共通であると考えられる。


### 3. 各 Form の構造比較

それぞれの Form は、サブユニット間の対称性が異なる。Form C は、結晶の非対称単位中に一つのサブユニットが含まれており、結晶学的 2 回軸により 2 つのサブユニットが関係づけられている。したがって、2 つのサブユニットは完全な 2 回対称軸で関係づけられている。しかし、Form A, Form B は結晶の非対称単位中に一つの二量体が含まれており、各サブユニットは 2 回対称性を持つものの、2 回対称軸で関係づけられていない。すなわち、C 末側の調節ドメインに関しては、疑似の 2 回軸で関係付けられているが、N 末側の DNA 結合ドメインは、2 回対称からの有意なずれが観察された。そのため、Form A から C の構造を調節ドメインで重ねあわせて比較すると、DNA 結合ドメインの相対位置は各 Form で異なっていることが分かった。このことから、DNA 結合ドメインは自由度の高いドメインであり、その位置は環境によって容易に変わりうるということが明らかになった。この DNA 結合ドメインの位置の変化は、主に N 末端側から 4 番目のヘリックス(Helix-4)の調節ドメインに対する相対位置が異なることに起因する。



Form A の立体構造 (Front View)  
自己調節因子との結合に必要な Trp127, DNA 結合能に関与する Pro123, サブユニットを連結している Cys159 の側鎖をそれぞれ示してある。



Form A (上), Form B (下) の立体構造 (Bottom View)  
DNA 結合ドメインをリボンモデルで、Helix-4 の主鎖の色を黒で、それぞれ示してある。  
Form C の結晶学的 2 回軸を  で紙面に垂直に示してある。

### 4. 自己調節因子受容体の転写調節機構

CprB の構造は、*Escherichia coli* の TetR および *Staphylococcus aureus* の QacR と共通性を持つものであった。TetR、QacR 両蛋白質は薬剤耐性遺伝子群の転写を抑制しているリプレッサーであるが、薬剤と結合することによって DNA から解離する。両蛋白質とも  $\alpha$ -ヘリックスのみからなる構造を持ち、3 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる N 末端側 DNA 結合ドメイン、C 末端側の薬剤が結合する調節ドメイン、および両ドメインをつなぐ N 末端側から 4 番目の長い  $\alpha$ -ヘリックス(Helix-4)で構成される。薬剤と結合することにより、Helix-4 が分子の外側に開くのに伴い N 末端 DNA 結合ドメインも分子の外側に開き、DNA との結合能を失う。

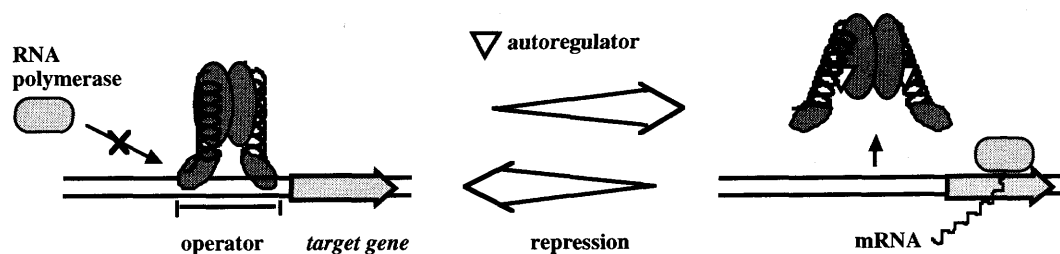
CprB が TetR/QacR と基本的に同じフォールドを持っていること、Helix-4 より N 末端側の構造の自由度が高いことを考えると、CprB の転写調節機構は、TetR や QacR と基本的に同一であることが示唆された。DNA 結合ドメインと調節ドメインの間には水素結合がほとんど観察されないのも、DNA 結合ドメインが構造変化を起こしやすくするための機構であると考えられる。また、リガンド結合に直接関与すると考えられる Trp127 は、構造変化の鍵となる Helix-4 の近傍にあり、リガンド結合により Helix-4 が構造変化を起こしやすい配置になっていた。



全ての自己調節因子受容体で保存されており DNA 結合能に関わる Pro123 は、調節ドメインの下方、DNA 結合ドメインの近傍に位置していた。この部位のプロリンに変異が導入された変異型 ArpA は、DNA 結合能を持たない。これは、プロリンが他のアミノ酸に変異することで DNA 結合ドメインと接触している Pro101 から Pro123 の領域の自由度が上がり、これが結果的に DNA 結合ドメインの運動性を上昇させて、変異型 ArpA は DNA 結合能を失ったと考えることができる。自己調節因子が結合することによって、リプレッサーが DNA から解離して転写の抑制を解除するためには、DNA 結合ドメインの自由度が、構造上必要なのであろう。

CprB の構造は、自己調節因子受容体蛋白質群のモデル構造であると考えられ、本構造から得られた上記の知見は、他の自己調節因子受容体にも当てはめられると考えられる。従って、ArpA を含む放線菌の自己調節因子受容体は、TetR ファミリーと同様な転写調節機構を有することが示唆された。

## 5. まとめ

本研究によって、初めて放線菌の自己調節因子受容体ファミリーの立体構造が決定された。自己調節因子受容体ファミリーの転写調節機構は次のように考えられる。自己調節因子が C 末端側の調節ドメインに結合することによって、N 末端側 DNA 結合ドメインが分子の外側に開いて DNA 結合能を失い、制御を受けている遺伝子の転写が誘導されるというものである。



自己調節因子レセプターの転写調節機構モデル図  
Helix-4を  で、自己調節因子を  でそれぞれ示してある。