

論文内容の要旨

論文題目 BolA タンパク質の立体構造および機能の解析
(Structural and Functional Analysis of BolA Proteins)

氏名 葛西 卓磨

1. 研究の背景

生体物質との相互作用や触媒活性など、分子そのものの働きがわかっていないタンパク質について解析する際には、立体構造を決定することによってさまざまな有意義な情報が得られる。すなわち、相互作用物質や触媒活性などがわかっているタンパク質と、アミノ酸一次配列の比較では結論できない程度の相同性がある場合、立体構造を決定することによりその相同性が明らかになり、相互作用物質や触媒活性が類推できる場合がある。また、タンパク質表面の疎水性や電荷分布などの物性の情報や、相互作用や触媒活性に関わると考えられる表面保存残基の集中した部分などの情報から、相互作用物質や触媒活性を絞り込むことができる場合もある。

BolA タンパク質は、さまざまな生物種に広く保存された、多くの場合全長 100 アミノ酸程度のタンパク質のファミリーである。多くの生物種には複数の BolA タンパク質があることから、その働きは多様性に富んでいると予想される。大腸菌 BolA は、stationary phase やストレスによって発現誘導される。生菌中で BolA の発現を誘導すると、菌の形態は通常よりも丸く変化するほか、PBP (Penicillin Binding Protein) の遺伝子が、bolA 欠失変異体や強制発現体で野生型に比べて転写量が変化していることが知られている。遺伝学的・細胞生物学的な研究はいくつかおこなわれているものの、ホモログを含めて BolA タンパク質と相互作用する物質や BolA タンパク質の触媒活性は知られていない。また、立体構造も発表されていなかった。

BolA タンパク質の立体構造を明らかにすることによって、表面保存残基が集中する部位の情報から相互作用や触媒活性に関わる部位を予想し、それらの部位の形状や物性から相

相互作用物質や触媒活性の候補を絞り込んだうえで実験的に同定し、NMR を用いた方法や表面保存残基に変異を入れる方法で相互作用部位を特定することを目的に研究をおこなった。

2 . BolA タンパク質の立体構造解析

マウス BolA2、マウス BolA1 および大腸菌 BolA の立体構造を NMR 法で決定した。いずれも H HHH H (ただし H は もしくは 3_{10} ヘリックス、 は ストランド) の二次構造をとっている (図 1)。

DALI 検索プログラムによって既知の立体構造との類似性を調べたところ、クラス KH フォールド、OsmC 様酸化還元酵素などが似たフォールドをとっていることがわかったが、そのいずれもそれぞれの活性に必要なアミノ酸残基は BolA タンパク質では保存されておらず、構造類似性からはただちに同一の活性をもっていると結論づけられないタンパク質ファミリーであることがわかった。

筆者が決定したタンパク質を含めて、これまでに決定された 5 種類の BolA タンパク質の立体構造を比較すると、 1 ストランドと 2 ストランドをつなぐ 1/ 2 ループは、タンパク質ごとに長さの違う柔軟性のあるループを形成していると考えられる。ヘリックス 2 とヘリックス 3 は短いリンカーでつながっており、HTH 様の立体構造をとっている。

BolA タンパク質の立体構造を明らかにすることによって、分子表面にあってかつ保存されているアミノ酸残基が集中している部位は 1/ 2 ループ、HTH 様構造、C 末端の 3 ヶ所であることがわかった。これらの部分が BolA タンパク質の生体物質との相互作用や触媒活性を担っていると考えられる。

3 . BolA タンパク質の配列解析

BolA タンパク質は、主に真正細菌と真核生物に見られるが、真正細菌では主にプロテオ細菌類とシアノバクテリアのみに存在し、真核生物では系統分類上多岐に渡る生物種にみられ、ほぼすべての真核生物に存在していると考えられる。

BolA タンパク質のアミノ酸配列を立体構造に基づいてアラインメントすると、 1/ 2 ループの長さの違いはタンパク質によって 20 アミノ酸残基以上にもなり、BolA タンパク質のアミノ酸配列および立体構造上の多様性の一因となっている。

このアラインメントをもとに分子系統樹を作成し、それぞれのタンパク質間の相同性を 2 次元のマトリックス上に相同性が高いものほど濃い色に、低いものは薄い色になるようにプロットしてみると、BolA タンパク質がおおむね 5 つのグループに分けられることがわかる (図 2)。このうち BolA1 グループは、真正細菌と真核生物に共通するグループであるが、

1/ 2 ループと C 末端のアミノ酸配列により、さらに動物および真正細菌の一部で見られる動物型サブグループと、植物・酵母および真正細菌の一部で見られる植物型サブグループに分かれる。BolA2 や BolA3、BolAc、YrbA の各グループは、それぞれ真核生物、シアノバクテリア等、プロテオ細菌に特異的なグループである。

各グループ内では保存されているがグループ間では違いがみられるアミノ酸配列は、1/ 2 ループ、HTH 様構造、C 末端に存在し、これらの部分が BolA タンパク質のグループ間の機能の違いを担っていると考えられる。

4 . BolA タンパク質の機能解析

BolA タンパク質の表面保存残基が集中している部位は、いずれも分子表面に大きく露出し、他のタンパク質と相互作用する可能性が高いと考えられたため、相互作用タンパク質の探索をおこなった。大腸菌 BolA およびホモログの YrbA を用い、大腸菌粗抽出液から相互作用タンパク質をプルダウンして、質量分析で同定をこころみた。すると、BolA に対しては PhoL、YpeA が、YrbA に対しては Grx4 (YdhD) が同定され、プルダウンと表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で、BolA と YpeA、BolA と Grx4、YrbA と Grx4 の相互作用が確かめられた。

それぞれの相互作用に立体構造上のどの部分が関与しているかを調べるため、NMR による滴定実験と、BolA および YrbA のアミノ酸置換変異体を用いた SPR による相互作用測定をおこなった。すると、BolA や YrbA が Grx4 と相互作用する場合は HTH 様構造の部位が、BolA が YpeA と相互作用する場合は HTH 様構造と 1/ 2 ループの両方が関与していることがわかった。

また、大腸菌 BolA が菌の形態に対して影響を与える活性についても、各アミノ酸置換変異体による活性の違いを調べ、どの部位がこの活性に関与しているかを解析した。すると、HTH 様構造の部位に変異を導入したものでは形態変化活性は損なわれた。1/ 2 ループに変異を導入したものでは、アミノ酸残基によって形態変化活性が減少するものと増加するものがみられた。C 末端を短くした BolA では、形態変化活性が減少した。

これらのことから、HTH 様構造は、Grx4 と相互作用するという BolA および YrbA に共通した機能を担うほか、YpeA との相互作用や形態変化活性という BolA 特有の機能を担っており、1/ 2 ループは BolA 特有の機能に関与しており、BolA の C 末端アミノ酸残基は形態変化活性に関与していると言える (図 3)。このタンパク質間相互作用の共通点および相違点は、HTH 様構造は BolA と YrbA でアミノ酸残基の違いはあるものの立体構造が似ており、1/ 2 ループと C 末端は BolA と YrbA で長さが異なっていて立体構造が大きく異なることに原因すると考えられる。

5 . 総合討論

BolA タンパク質の立体構造を決定することによって、表面保存残基の集中部位が明らかになり、それらの部位の溶媒露出度などからタンパク質との相互作用が予想されたので、プルダウン法により相互作用タンパク質を同定し、さらにその相互作用部位を調べることができた。さまざまな生物種で酸化ストレス耐性獲得に関わるモノチオール型グルタレドキシンの大腸菌ホモログである Grx4 と相互作用することと、大腸菌においては酸化ストレスなどによって発現誘導されることから、BolA タンパク質が酸化ストレス耐性の獲得に関わっていることが考えられる。BolA タンパク質はアミノ酸配列の特徴からグループに分けることができ、立体構造上で表面保存残基が集中している 3 ヶ所は、グループごとにアミノ酸が異なっている。BolA タンパク質はこれらの部分のアミノ酸配列を入れかえながら進化し、各グループにわかれてきたと予想できる。ほとんどの BolA タンパク質はその共通の HTH 様構造でモノチオール型グルタレドキシンの相互作用するが、HTH 様構造部分のアミノ酸配列の違い、1/ 2 ループの長さのアミノ酸配列の違い、C 末端の保存されたアミノ酸配列の有無によって、グループごとに特異的な機能をもっていると結論づけられる。

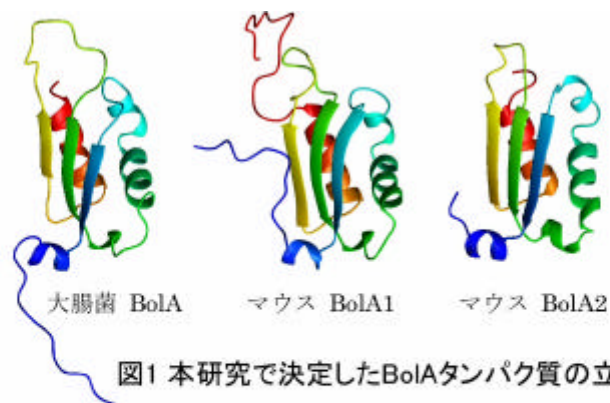


図1 本研究で決定したBolAタンパク質の立体構造

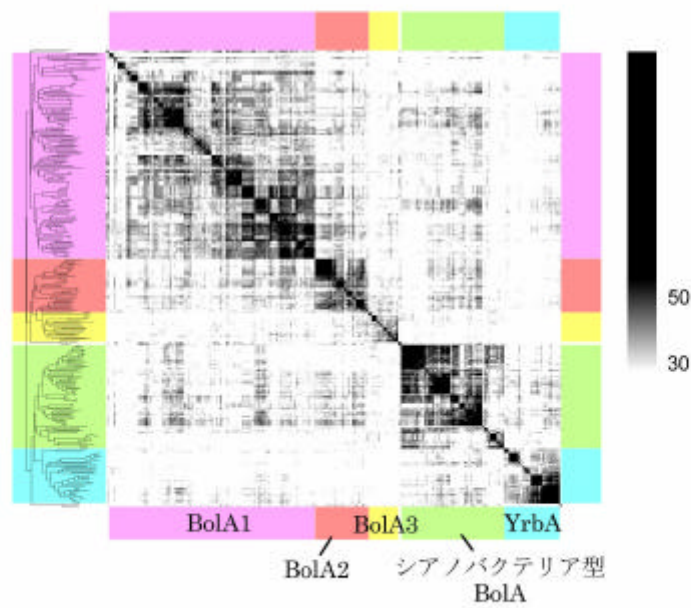


図2 BolAタンパク質の相同性2次元プロットによるグループ分け

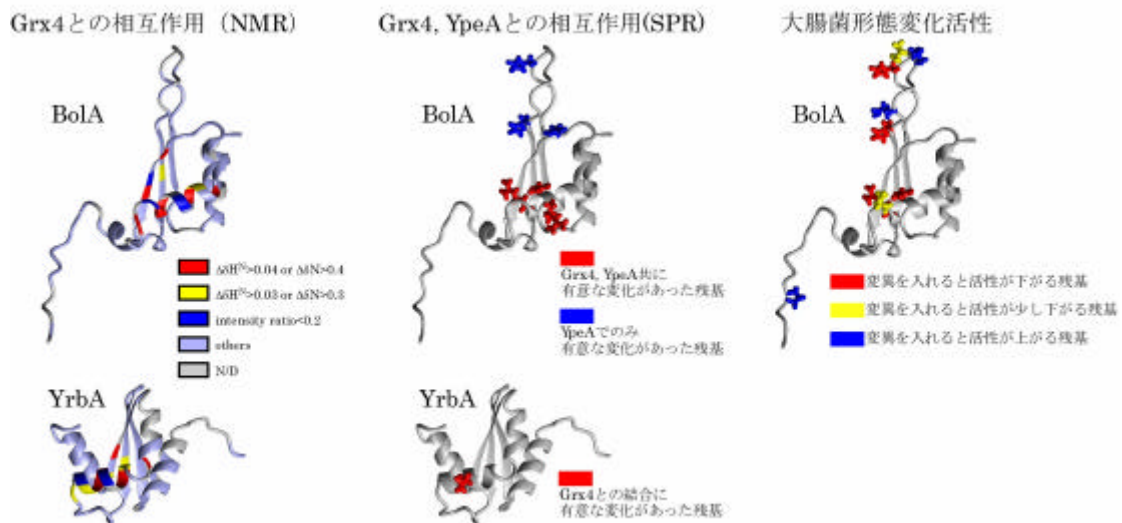


図3 BolAタンパク質の機能部位