

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19579003
 研究課題名（和文） 枯草菌のGABA代謝に関与する酵素の構造と機能
 研究課題名（英文） Structure and function of enzymes involved with the catabolisation of GABA in *Bacillus subtilis*.
 研究代表者
 後藤 勝 (GOTO MASARU)
 東邦大学・理学部・講師
 研究者番号：80379289

研究成果の概要（和文）：His-tag を付与したコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素を Ni-NTA をもちいたカラムクロマトグラフィーで精製した。GABA アミノ基転移酵素の立体構造を酸性と中性の条件で決定した。GabR タンパク質の結晶化に成功し、2.2 Å分解能のネイティブデータを収集した。Hg 誘導体を用いた重原子同形置換法により位相の決定に成功した。現在、3次元モデルの構築中である。

研究成果の概要（英文）：The recombinant succinate semialdehyde dehydrogenase with His-tag was purified in one chromatographic step by using Ni-NTA resin. The structures of GABA aminotransferase have determined at acidic and neutral pH. Crystals of GabR protein was obtained by the hanging-drop vapor-diffusion method. The X-ray diffraction data set for the native crystal was collected to 2.2 Å resolution. The phase of native GabR was solved by the multiple isomorphous replacement method, using Hg derivative data sets. Now the structure of native GabR is under construction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は、細胞内の窒素代謝において中心的な役割をしている。*Bacillus subtilis* (枯草菌) では、主なグルタミン酸の合成は、グルタミン酸合成酵素とグルタミン合成酵素によって行われている。しかし、グルタミン

酸は、グルタミン、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、ヒスチジンおよび他の化合物の代謝経路でも合成することができる。それらの経路の内、アスパラギン、アルギニンおよびヒスチジン利用については詳細な研究がなされている。また、抑

制性の神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) を経由するグルタミン酸の合成系も各種細菌で利用されていることが知られている。

枯草菌では、GABA を唯一の窒素源として利用できることや、GABA 透過酵素についての詳細が研究されているが、GABA 代謝系を担う他のタンパク質についてはそれほど研究が進んでいない。その GABA 代謝を担うのが、GABA アミノ基転移酵素 (GABA-AT) とコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SS-DH) であり、それぞれ大腸菌由来の酵素と 50% 程度の相同性がある。更に、それら 2 種の酵素は、培地中の GABA で発現誘導されるオペロンにコードされている。2002 年に Belitsky らが、GABA-AT と SS-DH のオペロンの上流にコードされている GabR が、そのオペロンの転写制御因子として働いていることを示した (Belitsky, B. R., and Sonenshein, A. L. (2002). *Mol. Microbiol.* 45, 569-583)。更に、2004 年に続報として、オペロンのプロモーター部位に結合した GabR は、ビタミン B6 であるピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) と GABA の存在下でプロモーターとの相互作用が低下し、GABA-AT と SS-DH の転写を活性化させることを明らかにした (Belitsky, B. R. (2004). *J. Mol. Biol.* 340,655-664)。

GabR はアミノ酸配列の解析などから、N 末端の DNA 結合ドメインと C 末端にアミノ基転移ドメインをもつ PLP 結合タンパク質であることが分かっており、MocR/GabR ファミリーに属している。MocR/GabR ファミリーは、N 末端のヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) ドメインと C 末端のアミノ基転移酵素の PLP 結合ドメインから構成されるタンパク質群であり、グラム陰性およびグラム陽性の両細菌でおよそ 200 種類のタンパク質が見つかっている。

研究開始当初では、SS-DH の立体構造の解析例はなかった。また、GABA-AT はいくつかの解析例はすでにあったが、それらはいずれも酸性の結晶化条件であり、生体中とおなじ中性での結晶化の例はなかった。GabR についても、機能が詳細に研究されている PLP 依存性酵素が多数あるなかで、PLP を利用した転写因子の構造解析の例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では以下に挙げる遺伝子上で隣接する 3 つの酵素の立体構造を決定し、生化学的、分光学的研究の結果と総合して、原子レベルでの構造・機能解析を行う。

GabR

GabR は、GABA 非存在下でオペロン上流

の DNA に結合することが明らかとなっている。しかし、DNA に何分子結合するかは明らかになっていない。GABA 存在下では、GabR はそのコンホメーションに変化を起こし DNA から解離する。その後、プロモーター以下の DNA 配列が翻訳され、GABA 代謝系を担う GABA-AT と SS-DH が産出される。そして GABA 代謝系の過程で、窒素源として活躍する L-グルタミン酸が生成される。GabR はアミノ基転移酵素のタイプ I に分類されており、基質との相互作用によって Open-Closed コンホメーション変化を起こすことが推測される。GabR のアミノ基転移ドメインにおけるコンホメーションの変化と GabR と DNA との結合様式の相関を立体構造解析により明らかにすることを目標とする。

GABA-AT

GABA は高等動物の中樞神経系における主な抑制性の神経伝達物質である。また、細菌では GABA がクオラムセンシングに関わっているという報告もある。その GABA の代謝に関わる酵素が、PLP 依存性 GABA-AT であり、GABA のアミノ基を 2-オキソグルタル酸に転移してコハク酸セミアルデヒドと L-グルタミン酸を生成する。現在、GABA-AT は大腸菌由来と Pig 由来の 2 種類が構造解析されているが、いずれも酸性での結晶化条件で解析されており、中性条件での基質認識機構が明らかとされることが期待されている。枯草菌由来の GABA-AT とそれらとのアミノ酸相同性は、それぞれ 43% と 17% である。GABA-AT はアミノ基転移酵素のタイプ II に分類されている。タイプ II の GABA-AT とタイプ I の GabR は、タイプが異なるにもかかわらず、GABA を基質として認識する。この違いを同じ枯草菌由来の酵素の立体構造より明らかにすることで、進化の過程を含めたより詳細な議論が出来ると考えている。

SS-DH

SS-DH はコハク酸セミアルデヒドからコハク酸を生成する反応を NAD⁺ を用いて触媒する。コハク酸セミアルデヒドも GABA と同じく細菌においてクオラムセンシングに関わっていると報告されている。また、高等動物やヒトでは、SS-DH 遺伝子の欠損が言語機能の発達を妨げるなど、様々な神経疾患に関与することが明らかとなっている。そのような重要な役割を持つ酵素ではあるが、研究開始当初はその立体構造の例は報告されていなかった。そこで、同じく枯草菌由来の SS-DH の立体構造を決定し、構造と機能の相関を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

GabR

研究開始当初においてすでに、枯草菌のゲノムから GabR 遺伝子をクローニングしており、大腸菌による大量発現系の構築も出来ていた。C 末端にヒスチジンタグを導入した GabR タンパク質の精製方法も確立していた。精製により得られたサンプルを蒸気拡散法で結晶化する。研究開始当初、微結晶ではあるが板状結晶が得られており、4.0 Å 分解能の回折強度データを収集している。詳細を議論するためには、少なくとも 3.0 Å 分解能のデータが必要であるため、開始後は結晶化条件の最適化を行う。結晶化条件最適化には、研究室にある X 線発生装置を用いて重原子多重同相置換法による位相決定を目指す。同時に、放射光施設での MAD 法や SAD 法での位相の決定も進行させる。大腸菌による大量発現系の構築が出来ているため、位相改良のためのセレンメチオン置換タンパク質の入手も可能である。更に、放射光施設を利用して 2.5 Å 分解能のデータを得られる結晶作成を目指した。

GABA-AT

枯草菌のゲノムから塩基配列の分かっている GABA-AT 遺伝子をクローニングする。その後、大腸菌での大量発現系の構築と生成方法の確立を行い、得られた精製酵素を用いて生化学的データの収集を行う。同時に、結晶化条件のスクリーニングを行い、ネイティブ型酵素の結晶化を目指す。結晶が得られた場合、東邦大学の in-house の装置、もしくは放射光施設を利用して回折実験をおこなう。得られた回折強度データを用い、アミノ酸配列の相同性が 43% の大腸菌由来 GABA-AT を初期モデルとする分子置換法により、位相の決定ならびに分子モデルの構築を行う。同時に、基質アナログとの複合体の結晶化条件の検索を行う。最終的に、GABA-AT のネイティブ構造と基質アナログ複合体の構造を決定し、GabR と比較することにより、それぞれの機能の相違を原子レベルで理解する。

SS-DH

GABA-AT と同様、枯草菌のゲノムから塩基配列の分かっている SS-DH 遺伝子をクローニングする。その後、大腸菌での大量発現系の構築と生成方法の確立を行い、得られた精製酵素を用いて生化学的データの収集を行う。詳細な酵素速度論のパラメーターを酵素反応の測定より導き出し、既に明らかとなっているヒト由来の SS-DH 等との比較を行なう。精製した酵素を用いて結晶化条件の検索を行う。結晶が得られた場合は、東邦大学の in-house の装置を用いて回折強度データ収集を行う。アミノ酸配列の相同性が 38% のラ

クトアルデヒド脱水素酵素を初期モデルとする分子置換法により、位相の決定ならびに分子モデルの構築を行う。同時に、基質アナログとの複合体の結晶化条件の検索を行う。最終的には、基質アナログとの複合体構造も決定し、SS-DH の機能と構造の相関を明らかにする。

4. 研究成果

GabR

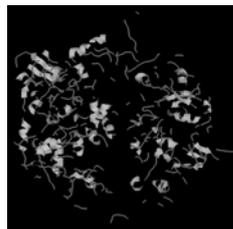
GabR については、N-末端に His-tag を導入したもの、C-末端に導入したもの、N-末端の His-tag を精製過程でトロンビンにより取り除いたものの 3 種類を同時進行で行った。精製条件の検討、結晶化条件の最適化の結果、図 1 のような黄色の結晶をえることができた。



格子定数は、 $a = 98.3$ 、 $b = 101.1$ 、 $c = 212.2$ Å、空間群は $P2_12_12_1$ 、分解能は 2.2 Å であった。

図 1

GabR の位相は水銀を用いた重原子多重同相置換法をもちいて決定した (図 2)。



非対称単位胞当たりに GabR 分子が 2 分子含まれていることが初期位相から構築したモデルからも確認できる (図 2)。

図 2

現在、この初期位相を用いて立体構造を構築中である。また、最近セレンメチオン化 GabR の精製にも成功したため、これを結晶化し、位相の改良にもちいる予定である。

GABA-AT

GABA-AT については、N-末端に His-tag の付いたものの大量発現系の構築に成功し、それをもちいた大腸菌の大量培養、精製を行った。精製した GABA-AT の結晶化条件をスクリーニングしたところ、当初はすでに立体構造が報告されている大腸菌および Pig 由来の GABA-AT と同じく酸性での条件で結晶を得ることができた (図 3)。この結晶をもちいて、つくばの放射光施設 PFにて X 線解説強度データ測定を行い、格子定数 $a = 82.0$ 、 $b = 58.8$ 、 $c = 172.6$ Å、空間群 $P2_1$ 、分解能 1.6 Å のデータを得ることに成功した。この酸性条件下の GABA-AT の立体構造は、43% のアミノ酸配列の相同性をもつ大腸菌由来の GABA-AT の構

造を初期モデルとした分子置換法により決定した(図4)。精密化後の R_{free} と R_{factor} は、それぞれ18.7と16.8%であった。GABA-ATは同じサブユニットからなるホモテトラマー構造をしており、サブユニット当たり一つのPLPを結合していた。

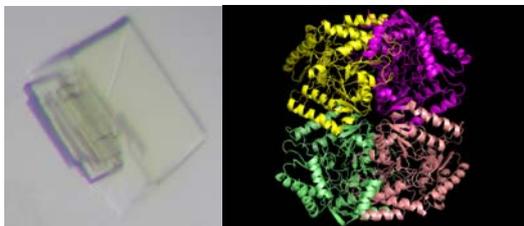


図3

図4

酸性の結晶化条件から得られたGABA-ATの結晶にさまざまな基質、および基質アナログをソーキングしてみたが、活性部位にそれらの電子密度を確認することはできなかった。

この酸性条件のGABA-ATのモデルの構築と精密化と平行して、中性での結晶化条件のスクリーニングを行っていた結果、世界で初めて中性条件下でGABA-ATの結晶を得ることに成功した(図5)。この結晶をもちいて、つくばの放射光施設PFにてX線解析強度データ測定を行い、格子定数 $a = 93.1$ 、 $b = 101.1$ 、 $c = 101.2$ Å、空間群 $P1$ 、分解能1.75 Åのデータを得ることに成功した。



前述の酸性条件のGABA-ATの立体構造を初期モデルとした分子置換法により中性条件のGABA-ATの構造を決定した。精密化後の R_{free} と R_{factor} は、それぞれ18.8と16.4%であった。

図5

酸性条件と中性条件のGABA-ATの全体構造に、小さなループのコンホメーションを除くと、大きな差異は見られなかった。しかし、アミノ酸残基の側鎖のコンホメーションには多少の相違が確認されたため、今後より詳細な議論ができるように調べていく予定である。

現在は、中性条件下で基質もしくは基質アナログとの複合体の結晶を得るため、共結晶化およびソーキング方法の検討を行っている。

SS-DH

SS-DHについては、N-末端にHis-tagの付いたものの大量発現系の構築に成功し、それをもちいた大腸菌の大量培養、精製を行った。この精製酵素のキャラクタリゼーションを行ったところ、有機系の緩衝溶液(たとえば

Good buffer)をもちいた場合、活性が著しく減少することが分かった。また、基質自身による阻害がかかることも明らかとなった。残念ながら、現在のところこのSS-DHの結晶化条件はわかっていない。今後も引き続き、結晶化条件のスクリーニングを行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

①Tohru Yoshimura, Keita Okuda, Hisashi Hemmi, Masaru Goto, Harumi Fukada, Role of pyridoxal 5'-phosphate and γ -amino butyrate of GabR, a transcriptional regulator of *Bacillus subtilis*, Second International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes and Biofactors、平成20年10月28日、GEORGIA, USA

②吉村 徹、奥田啓太、邊見 久、深田はるみ、後藤 勝、ピリドキサルリン酸に依存する細菌の転写制御因子、GabRの構造と機能、日本ビタミン学会第60回大会、平成20年6月14日、仙台

③奥田啓太、深田はるみ、後藤 勝、邊見 久、吉村 徹、ピリドキサルリン酸に依存する細菌の転写制御因子、GabRの構造と機能、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、平成19年12月11日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 勝 (GOTO MASARU)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：80379289

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし