

病原性バチルス属細胞骨格因子の立体構造解析 Structural Analysis of cytoskeletal proteins from *Bacillus cereus*

林 郁子*

横浜市立大学、〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広 1-7-29

Ikuko Hayashi

Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Japan

1 はじめに

正確な遺伝子分配はすべての生物が存続していく上で必須の生命現象であるが、分配に関わるタンパク質や分子機構などすべてについて、バクテリアと真核生物では大きく異なっている。近年原核生物の中にも細胞骨格因子が存在することが明らかとなり、真核生物と同様に染色体の分配に中心的な役割を果たすことがわかってきた。バクテリアにおいて染色体の分配の分子機構は不明な点が多いのが現状である。しかし細胞内で数個しか存在しない低コピー数プラスミドについては染色体同様の正確な分配機構が必要であることが知られており、バクテリアの遺伝子分配のモデルケースとして研究が進められてきた。

私達はグラム陽性細菌の中でもバチルス属に焦点をあて構造機能解析を行っている。本研究で取り扱う病原性バチルス属は人や昆虫などに対し病原性をもち、その毒素タンパク質の遺伝子は pXO1 とよばれる低コピー数プラスミドによって継承される。pXO1 の分配には、新規のプラスミド分配因子であるチューブリン様 GTP 加水分解酵素 TubZ が必須である。この TubZ タンパク質はプラスミド分配の動力として機能すると推測される。これまで知られているプラスミド分配機構には分配モーターとして機能するヌクレオチド加水分解酵素ばかりでなく、プラスミド上にコードされるセントロメア様配列、プラスミドとモーターをつなぐ DNA 結合タンパク質が必要であることが明らかとなっている。セントロメア様配列に DNA 結合タンパク質が結合することで分配の起点となるセグロソームが形成され、このセグロソームがモーター分子と相互作用することで加水分解活性が上昇しプラスミド分配が行われる。これより TubZ はセントロメア様 DNA 配列 *tubC* と DNA 結合タンパク質 TubR と協同的にはたらくことによって pXO1 プラスミドを分配すると考えられている。

私達はセレウス菌の TubR と TubZ について分子生物学的解析と並行して結晶構造解析による立体構造決定を行うことにより、分子機構の解析を目指している。

2 実験

セレウス菌の *tubR* 遺伝子は *Bacillus cereus* ATCC10987 株の DNA から PCR により増幅し、pET28a に挿入した。TubR は His タグ融合タンパク質として BL21(DE3)を用いて発現させ、His タグアフィニティークロマトグラフィー、TEV プロテアーゼによるタグの切断、陰イオン交換カラムによって精製を行った。セレノメチオニン導入された TubR についても同様に精製し、結晶化を行った。高エネルギー加速器研究機構 KEK BL-6A ビームラインを利用してセレノメチオニンをを用いた多波長異常分散法により位相を決定した。空間群は $P2_12_12_1$ ($a = 47.2, b = 73.4, c = 73.7$) であり、 2.1 \AA の分解能で立体構造を決定した。また TubR 結合 DNA 配列との複合体結晶構造解析に向けて、TubR と 27 塩基対の合成 DNA との複合体を作成、結晶化を行い BL5A で X線回折の測定を行った。

3 結果および考察

図 1 に TubR の結晶構造を示す。ゲル濾過法から予測された通り、TubR は二量体を形成し、転写因子に見られる winged-helix 構造をとる。ふたつの wing 間の距離はおよそ 43 \AA であり (図 1 (a))、TubR の認識配列長 15 塩基対とほぼ合致する。TubR 二量体の結晶構造の表面電荷表示をみると、wing を含む表面は塩基性残基に富み、表面電荷は正に帯電していることがわかった (図 1 (b))。この領域は DNA の認識に関わることが推測される。



(b)

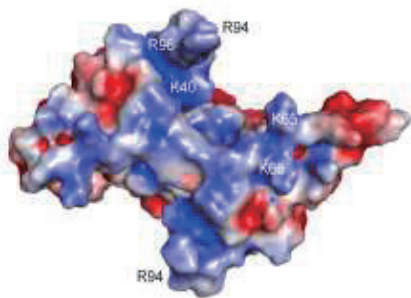


図 1 : TubR の結晶構造

- (a) TubR 二量体構造。単体をそれぞれ青とシアンで示す。2次構造を併記した。二つの wing ($\beta 1$ と $\beta 2$ で構成される) の間の距離はおよそ 43\AA である。
- (b) TubR の静電ポテンシャルマップ。分子の向きは (a)と同じ。 $-8 \sim +8 \text{ kT/e}$ で表示した。Wing のある面は正電荷に富んでいる。

私達は TubR の DNA 認識を明らかにするため、TubR と DNA の複合体の結晶化を試みている。TubR 二量体は 15 塩基の回文 DNA 配列を認識するが、15 塩基の鎖長の DNA には親和性が非常に弱い。実際のプラスミド上には 15 塩基の認識配列が重複した領域が存在し、27 塩基中に二つの認識配列が存在し、TubR 二量体が二つ結合している。この 27 塩基対の合成 DNA と TubR との複合体の結晶化を試みた。末端が平滑、あるいは 3'突出した DNA に関して結晶が得られたため、放射光施設にて X線回折を測定した。これまでのところ、X線回折パターンに異方性がみられるため、結晶化条件や凍結条件を変えることで改善を試みている。

4 まとめ

セレウス菌 pXO1 の TubR の結晶構造を決定した。結晶構造解析で得られた推定 DNA 結合アミノ酸が実際 DNA 認識に関わることをゲルシフトアッセイによって明らかにしている。本課題は原核生物の遺伝子分配機構を明らかにする基礎研究であるとともに、今後毒素遺伝子分配を阻害する薬剤開発のターゲットともなりうる応用研究である。

謝辞

この結晶構造解析の結果は、PF スタッフの方々のサポートがあって得られたものです。ここに感謝申し上げます。