

# 病原性バチルス族の毒素遺伝子分配に関わる転写因子の立体構造解析 Structural Analysis of the Plasmid Partitioning Protein TubY from *Bacillus cereus*

林 郁子

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

〒230-0037 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, Kanagawa 230-0037, Japan

## 1 はじめに

細胞骨格が真核細胞ばかりでなく原核細胞にも存在することが明らかになって以来、様々な細胞骨格因子がバクテリアの細胞の形態や分裂、遺伝子分配に関わることがわかってきた。バクテリアにおいて染色体分配の分子機構は不明な点が多い。細胞の中に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分配レベルの正確な分配制御が必要であることがわかっており、遺伝子分配のモデルケースとして研究が進められている。

病原性バチルス属は低コピー数の毒素プラスミドをもち、そこにコードされる毒素遺伝子の産物によって人や昆虫などに対し病原性が発揮される。毒素プラスミドの分配にはチューブリン相同タンパク質 TubZ が必須である。TubZ は GTP の加水分解に依存して線維構造を形成する。この線維の重合と脱重合により産生される動力で毒素プラスミドは娘細胞に均等分配される。一般的に低コピー数プラスミドの分配には分配の動力源となるヌクレオチド加水分解酵素、プラスミド上のセントロメア配列、そしてプラスミドとヌクレオチド加水分解酵素をつなぐセントロメア DNA 結合タンパク質の 3 つが必要とされる。TubZ は III 型プラスミド分配機構に属し、DNA 結合タンパク質 TubR と協調的にはたらくことでプラスミドを分配する[1]。*tubZ* と *tubR* はプラスミド上でオペロンを形成し、セントロメア配列は *tubRZ* オペロンの転写制御領域にある。これより TubR と TubZ の発現は TubR により制御される (図 1)。セントロメア DNA は繰り返し配列からなり、TubR はセントロメアに結合することでセグロソームとよばれる巨大複合体を形成して転写制御ばかりでなく TubZ 線維と相互作用する[2,3,4]。私たちは病原性バチルス族であるセレウス菌の pXO1 プラスミド分配機構を構造生物学的に明らかにすべく TubZ 関連因子の立体構造解析を行ってきた。

*tubRZ* オペロンの近傍には *tubY* がコードされる。*tubRZ* は病原性バチルス族やクロストリジウム属の III 型分配機構をもつ毒素プラスミドに保存され、*tubY* は *tubRZ* の近傍に必ず存在する。しかし *tubRZ*

に対する *tubY* の転写方向が保存されないなど不可解な点が多い。しかし近年 TubY が *tubRZ* の転写制御に関わることが示唆され、*tubYRZ* レギュロンを構成することがわかってきた[5]

TubY は金属ストレス応答に関わる MerR 転写因子と配列相同性をもち転写に関わることが示唆されるが、プラスミド分配への関与は不明であった。TubY も MerR も N 末側に DNA 結合モチーフを、C 末側にコイルドコイル構造をもつ。TubY は C 末端に塩基性と疎水性に富んだ天然編成領域をもつが、この領域は MerR ファミリータンパク質には存在しない。MerR のコイルドコイル領域は 2 量体を形成し、保存されたシステイン残基をもつ[6]。このシステイン残基が金属イオンに配位することで金属イオンセンサーとなり MerR を介した転写が活性化されるが、TubY にはシステイン残基が存在せず、新規の MerR ファミリータンパク質と考えられる。本課題では TubY にある 2 つのドメインの結晶構造解析を試み、C 末領域の結晶構造を決定したのでここに報告する。

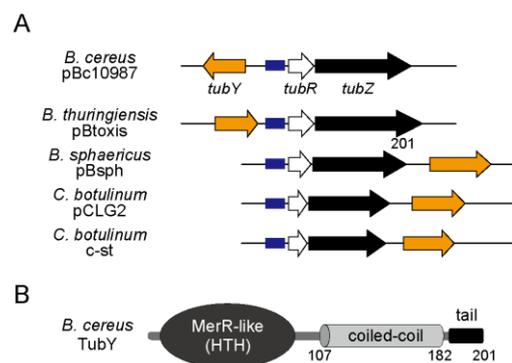


図 1 : *tubYRZ* レギュロン

(A) III 型プラスミド分配に関わる *tubYRZ* レギュロン。セントロメア配列 (青)、*tubR* (白矢印)、*tubZ* (黒)、*tubY* (黄) で示す。

(B) セレウス菌 TubY のドメイン構造

## 2 実験

セレウス菌の *tubY* 遺伝子は *Bacillus cereus* ATCC10987 株の DNA から PCR により増幅しクロー

ニングした。TubY の C 末ドメイン (TubYC; 107–182 残基) の遺伝子を pET21a に挿入し、BL21(DE3) 株を用いて発現させた。60%飽和硫酸による沈殿の後、陽イオン交換カラムを用いて精製を行った。セレノメチオニン導入された TubYC についても同様に精製し、結晶化を行った。TubYC を 1.4 mM に濃縮した後、0.1 M HEPES (pH 7.5), 0.2 M MgCl<sub>2</sub> and 30% PEG400 の条件でシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。高エネルギー加速器研究機構 KEK AR-NW12A ビームラインを利用して 100K で結晶の X 線回折像を測定した。データは HKL2000 により処理を行い、Phenix を用いてセレノメチオニンの多波長異常分散法により位相を決定した。空間群は P1 ( $a = 27.1 \text{ \AA}$ ,  $b = 40.3 \text{ \AA}$ ,  $c = 80.7 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 102.0^\circ$ ,  $\beta = 94.2^\circ$ ,  $\gamma = 98.5^\circ$ )、2.6 Å の分解能で立体構造を決定した。

### 3 結果および考察

TubY の C 末ドメインは平行のコイルドコイル 4 量体であることが明らかとなった (図 2)。4 量体は 2 回回転軸をもち、脂肪族アミノ酸による疎水性コアを形成していた。この結果から、従来の 2 量体を形成する MerR ファミリータンパク質とは異なる転写因子であることがわかった。TubY は C 末端の天然変性領域を介して膜に結合することを明らかにしているが、TubYC 領域が存在しないと TubY は膜に局在できないことも示すことができた。

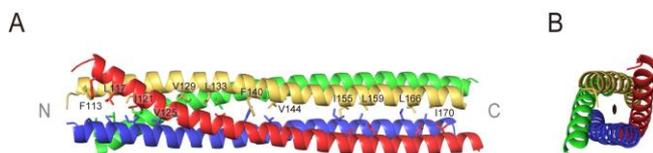


図 2 : TubYC の結晶構造

- (A) TubYC は平行のコイルドコイル 4 量体である。疎水性コアを形成するアミノ酸を示す。  
 (B) TubYC は 2 回回転軸をもつ。

### 謝辞

この結晶構造解析の結果は、PF スタッフ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。

### 参考文献

- [1] R.A. Larsen *et al.*, *Genes Dev.* **21**, 1340-1352 (2007).  
 [2] C.H. Aylett and J.I. Löwe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 16522-18527 (2012).  
 [3] I. Hayashi *et al.*, *J. Mol. Biol.* **430**, 5015-5028 (2018).  
 [4] G. Fink and J.I. Löwe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E1845-1850 (2015).  
 [5] Y. Ge *et al.*, *J. Bacteriol.* **196**, 4304- 4314 (2014).  
 [6] N.L. Brown *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 145-163 (2003).

### 成果

1. Hayashi I. (2020) The C-terminal region of the plasmid partitioning protein TubY is a tetramer that can bind membranes and DNA. *J Biol Chem.*, **295**(51):17770-17780.
2. 林郁子、「III 型プラスミド分配因子 TubY は膜結合能をもつ」、第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 2~4 日オンライン

\* ihay@yokohama-cu.ac.jp