

BL-5A, BL-17A, NW-12A, NE-3A/2007G551, 2009G557, 2011G571

枯草菌の GABA 代謝に関わる酵素群の X 線結晶構造解析
X-ray crystallographic study of the proteins
involved in the utilization of γ -aminobutyrate in *Bacillus subtilis*.

後藤 勝^{1*}¹ 東邦大学理学部, 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

1 はじめに

枯草菌では、抑制性の神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (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) である。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ことが知られており、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^[1]。更に、オペロンのプロモーター部位に結合した GabR は、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が明らかになっている^[2]。

このように枯草菌の GABA 代謝には、2 種類の PLP 依存性たんぱく質が関わっているが、その性質は異なっている。GABA-AT は PLP 依存性酵素ファミリーの Fold type I に属する酵素として一般的ともいえる基質二重認識を発揮し、GABA と 2-ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドと L-グルタミン酸を生成する反応を触媒する。一方、GabR は N 末端の DNA 結合ドメインと C 末端の PLP 依存性アミノ基転移酵素ドメインをもつキメラタンパク質であり、GABA をリガンドとして認識および結合し転写の制御をおこなうが、酵素反応は触媒せず、コハク酸セミアルデヒドを生成しない。我々は、この GABA-AT と GabR の機能発揮のメカニズムを解明するために、X 線結晶構造解析に取り組んでいる。

2 実験方法

GABA-AT および GabR は、大腸菌をもちいた大量発現系により調製し、His-tag を付与したタンパク質を Ni または Co をもちいたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。測定にもちいた全ての結晶は、室温にてハンギングドロップ蒸気拡散法により得た。GabR の立体構造は、水銀および白金をもちいた重原子多重同形置換法によって決定した位相から得られた電子密度をもとに構築した。

GABA-AT の三次元構造は、ブタ由来の GABA-AT を初期モデルとした分子置換法により決定した。

3 結果および考察

2.3 Å 分解能で決定した GabR の結晶構造は、C 末端の PLP 依存性アミノ基転移酵素ドメインによるサブユニット相互作用によりダイマーを形成しており、それぞれのサブユニットの DNA 結合ドメインは、離れた位置に存在している。このことは、バクテリアの転写制御因子の多くがダイマーを形成し、その DNA 結合ドメインが近接していることと比べて珍しいコンホメーションを採っているといえる。この DNA 結合ドメインの配置は、GabR の認識配列である 51bp の塩基対の両端に結合配列があることから、GabR の機能のために都合が良いと考えられるが、得られた構造とその 51bp の塩基対の結合モデルを予想してみたところ、このままの構造では、DNA 結合ドメイン間が離れすぎていることがわかり、GabR は DNA と結合した場合にコンホメーション変化をすることが示唆された。GABA-AT は、2 種類の性質の違う基質である GABA と L-グルタミン酸をそれぞれ補酵素の PLP と結合させ有機合成した反応中間体アナログとの複合体の結晶構造を決定し、活性部位の Glu224 残基の側鎖のコンホメーション変化が基質の二重認識機構の鍵であることを明らかにすることができた。

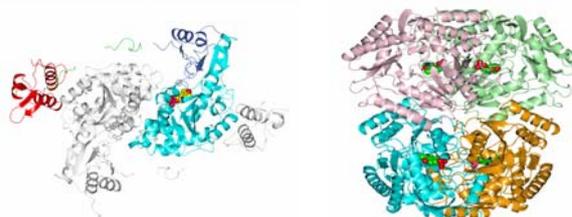


図 1 : 全体構造 (左) GabR、(右) GABA-AT

参考文献

- [1] Belitsky, B. R., and Sonenshein, A. L. *Mol. Microbiol.* **45**, 569-583 (2002).
[2] Belitsky, B. R. *J. Mol. Biol.* **340**, 655-664. (2004).

* goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp