

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 in *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

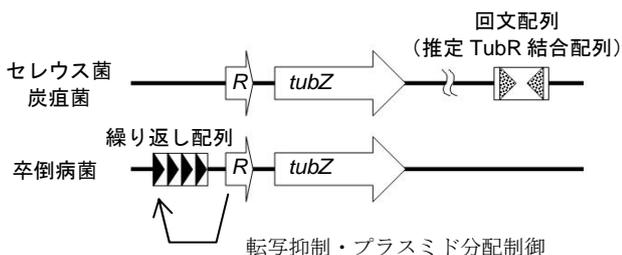
Ikuko Hayashi

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

1 はじめに

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になり、真核生物同様に細胞分裂や染色体分配において中心的な役割を果たすことがわかってきた。しかし異なる細菌間で関連分子が保存されない等の理由から、細胞分裂や遺伝子分配の分子機構はほとんど明らかになっていない。私達はグラム陽性細菌の中でもモデル生物であるバチルス属に焦点をあて構造機能解析を行っている。原核生物におけるチューブリン相同蛋白質 TubZ について、TubZ がモーター蛋白質として関与する毒素プラスミドの分配機構を原子レベルで明らかにすることを旨とする。本課題は将来的に病原性バチルス菌に対する創薬研究において分子基盤となることも期待できる。

病原性バチルス属に分類される炭疽菌やセレウス菌はヒトに対して壊死や食中毒をもたらす毒素を分泌する。これらの毒素遺伝子はすべて類似の低コピー数プラスミド pXO1 にコードされ、その継承が病原性を維持する要素の一つと考えられる。近年 GTP 加水分解酵素 TubZ が pXO1 の維持に関与することがわかってきた。TubZ は新規のプラスミド分配因子 (III 型) で、同じオペロン内の DNA 結合蛋白質 TubR と協同的にプラスミド分配を行うと推定されている (図 1)。これまでに近縁種の卒倒病菌で TubZ と TubR の結晶構造解析が行われているが [1, 2]、炭疽菌やセレウス菌の TubR は卒倒病菌とは異なる DNA 認識配列をもつなど、違った分子機構をもつことが示唆される。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 *tubZ* 遺伝子は *Bacillus cereus* ATCC10987 株の DNA から PCR により増幅し、pET21d に挿入した。野生型 TubZ をサーモリシンで限定分解することにより、安定に存在できる 1-389 アミノ酸残基の領域を結晶化に用いることとした。結晶化はフリーの状態ばかりでなく、GDP や GTP γ S 存在下で行った [3]。まず apo 型のセレノメチオニン導入された TubZ について：0.1 M BisTris (pH 5.6), 0.2 M MgCl₂, 30% PEG 4000 の条件により結晶化した。高エネルギー加速器研究機構 KEK NW12A ビームラインを利用して多波長異常分散法により位相を決定し、2.1 Å の分解能で立体構造を決定した。空間群は P2₁ ($a = 54.8 \text{ \AA}$, $b = 66.0 \text{ \AA}$, $c = 58.4 \text{ \AA}$, $\beta = 106.9^\circ$) であった。また GTP 結合型の立体構造決定のため GTP アナログである GTP γ S を用いて結晶化を行ったところ、0.1 M MES (pH 5.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM GTP γ S, 50% PEG 400 の条件で結晶が得られた。空間群は P2₁ ($a = 48.8 \text{ \AA}$, $b = 76.0 \text{ \AA}$, $c = 96.9 \text{ \AA}$, $\beta = 104.6^\circ$) であった。大型放射光施設 SPring-8 の BL26B ビームラインにて分子置換法により分解能 1.9 Å の結晶構造を決定した。TubZ には GDP が結合していたため (下記結果項を参照)、上記の GDP 結合型の結晶に GTP γ S のソーキングを行うことにより GTP 結合型の結晶構造を分解能 3.3 Å にて決定した。空間群は P2₁ ($a = 49.5 \text{ \AA}$, $b = 76.4 \text{ \AA}$, $c = 97.6 \text{ \AA}$, $\beta = 105.2^\circ$) であった。

3 結果および考察

図 2 に apo 型 TubZ の結晶構造 (a) と GDP 結合型 TubZ の結晶構造 (b) を示す [4]。apo 型の結晶構造においてヌクレオチド結合領域は高い B ファクターを示し、そのなかでも T2 と T3 とよばれるループ領域では電子密度が見えなかった。一方 GDP 結合型の結晶構造においては GDP 結合領域の電子密度が観察された。C 末端の最後のヘリックス (H11) の構造変化を除いては apo 型と GDP 結合型の結晶構造はほぼ同じであった (図 1 (c))。

図 1 : 病原性バチルス属のプラスミド分配 *tubRZ* オペロン。

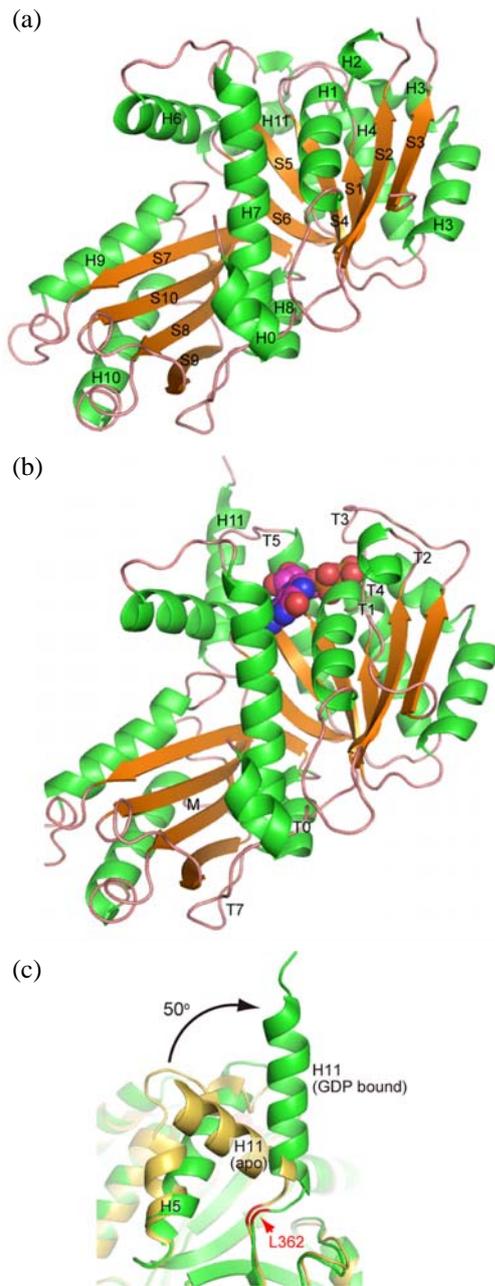


図 2 : セレウス菌 TubZ の結晶構造

- (a) apo 型 TubZ の結晶構造。2 次構造もあわせて示す。
- (b) GDP 結合型 TubZ の結晶構造。GDP 認識に関わるループおよび H11 もあわせて示す。
- (c) H11 における構造変化。L362 を中心にして H11 ヘルックスが 50 度回転している。

難分解性 GTP アナログである GTP γ S を用いたにもかかわらず、TubZ は GDP に結合していたことから (図 2 (a))、私達は TubZ が結晶化したのちに GTP γ S を加水分解したのであろうと推定した。結晶

格子中では TubZ の分子間で水素結合が形成しており (図 2 (b, c))、分子間の距離は近縁種である卒倒病菌 TubZ 繊維の電子顕微鏡観察において観察された TubZ の分子間距離と類似していることから[2]、この結晶構造は TubZ の重合状態を反映しているものと考えた。実際、この水素結合に関わる残基 (R85, E238, E332) に関して変異を導入し TubZ の GTP 加水分解能を生化学的に調べたところ GTP 加水分解能が失われたことから、セレウス菌 TubZ の繊維状構造における分子認識機構の知見を得たと考えている[4]。これらの残基すべてが近縁種 TubZ に保存されているわけではないこと、GTP 加水分解を促進する塩基性残基がセレウス菌において未だ見つかっていないことから、繊維状構造を反映する GTP 結合型 TubZ の結晶構造の決定が待たれるところであり、私達は現在それに向けて結晶化に取り組んでいる。

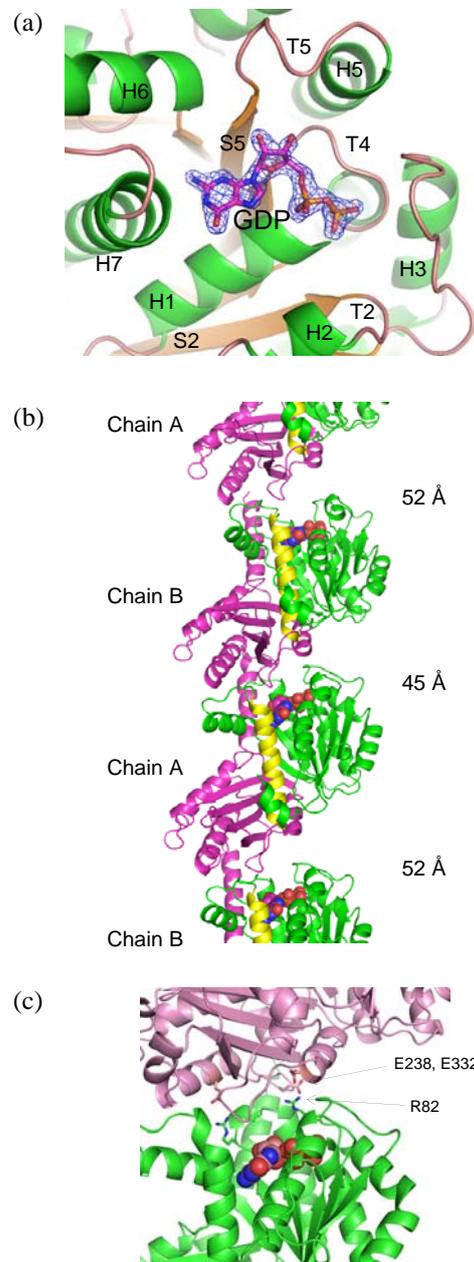


図3：TubZの繊維状構造

- (a) TubZ 結晶構造中のヌクレオチドの電子密度。
GTP γ S が加水分解されて GDP の電子密度が観察された。
- (b) 結晶格子中の TubZ 分子の並び。N 末端ドメイン (GTP 結合ドメイン) を緑色で、C 末端度面をピンクで示す。各分子間の距離を右に示す。分子間距離 45 Å の分子表面に置いて水素結合が観察された。この距離は卒倒病菌における TubZ 繊維の分子間距離と類似する。
- (c) TubZ 分子間における水素結合。R85 側鎖は E238、E332 側鎖と水素結合を形成する。

4 まとめ

セレウス菌 TubZ の結晶構造を決定するとともに、重合反応に関わる分子認識残基を決定した。病原性バチルス属のなかでも TubZ の配列相同性は 30% 足らずであり、相互作用に関わるアミノ酸残基が決して保存されているわけではないことから、結晶構造解析による活性型の立体構造決定の必要性がある。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。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] Ni *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 11763-11768 (2010).
- [2] Aylett *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 19766-19771 (2010).
- [3] Hoshino *et al.*, *Acta Cryst.* **F68**, 1550-1553 (2012).
- [4] Hoshino & Hayashi, *J Biol Chem*, **287**, 32103-32112 (2012).

* ihay@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp