

学 位 論 文 題 名

X-ray Crystal Structure Analysis of DNA-Binding Domain of *Escherichia coli* Transcription Factor OmpR

(大腸菌転写因子 OmpR の DNA 結合ドメインの X 線結晶構造解析)

学位論文内容の要旨

大腸菌をはじめとするバクテリアは常に変化する環境の中で生命を維持するために、外界の情報を迅速に伝える機構を持っている。それらの中の最も簡単な系として 2-component system という二つの因子からなる系が存在する。この系は細胞外刺激のセンサータンパク質と遺伝子の発現を制御するレギュレータータンパク質から構成されている。センサータンパク質は細胞膜に存在し、受けた刺激の情報をそれぞれ特有のレギュレータータンパク質に伝達する。多くの場合情報伝達は ATP の加水分解で得たリン酸基のレギュレータータンパク質への受け渡しによって行われる。レギュレータータンパク質はリン酸化によって情報を受けとるレシーバーとして機能するドメインと、DNA に結合するエフェクタードメインに分けることができる。バクテリア由来の約 50 種類のレギュレータータンパク質が同定されていて、アミノ酸配列の相同性が高いことから、共通祖先の分子から進化したものであると考えられる。OmpR はその中の一つのファミリーに属する。

大腸菌の OmpR タンパク質は二種類の外膜タンパク質 OmpC と OmpF の生合成量の培地の浸透圧に応じた制御に関与している。OmpR はそれぞれ OmpC と OmpF の遺伝子のプロモータに結合し、RNA ポリメラーゼの転写活性に変化を及ぼす。センサーの役割をするタンパク質は EnvZ である。EnvZ は細胞膜に存在し、浸透圧の変化を感知し、リン酸化によって情報を OmpR に伝達する。OmpR(239 残基)は構造的に二つのドメインから構成されている。一つはアミノ酸配列の N 末端側ドメイン(OmpR-N, 121 残基)で、EnvZ によってリン酸化される部位を含んでいる。もう一つは C 末端側ドメイン(OmpR-C, 118 残基)で、DNA に結合する部位を含んでいる。本研究では OmpR 及び 2-component system に属する他の転写因子の DNA 結合による転写の調節機構の知見を立体構造から得るために、OmpR-C の X 線結晶構造解析を行った。

まず構造解析のために用いる OmpR-C の結晶性試料の作成を行なった。OmpR-C を精製し、さまざまな条件下で結晶化を試みた。その結果、ポリエチレングリコール 8000 を沈殿剤として用いる系で結晶が生成した。この結晶は約 2.5 オングストローム分解能までの X 線回折像を与え、原子レベルでの構造解析に用いることができることが示された。

構造解析には OmpR-C 中のメチオニン残基をセレノメチオニン(Se-Met)に置換し、セレン原子の異常分散効果を利用した多波長異常分散(MAD)法を用いた。OmpR-C の発現プラスミドで形質転換した大腸菌のメチオニン要求株を Se-Met を含んだ最少培地で培養し、置換された OmpR-C を精製、結晶化した。また測定の際、結晶を 100K にまで急速冷却することにより、分解能の向上と X 線照射による損傷の低下をさせた。回折強度測定は Photon Factory BL18B において行ない、2.2 オングストローム分解能の強度データ

を収集した。異常分散差パターン図を解釈することによってセレン原子の位置を決定し、その座標を用いて構造因子の位相を決定した。計算された電子密度図上に 118 残基のうち 100 残基を含んだタンパク質モデルを構築し、ネイティブ結晶の回折データを用いて座標の精密化を行なった。

OmpR-C はそのアミノ末端から、4 本鎖逆平行 β -シート、3 本の α -ヘリックスそしてカルボキシル末端側の 2 本鎖の β -ヘアピンからできている。2 番目と 3 番目の α -ヘリックスは、DNA 結合モチーフの一つであるヘリックスターンヘリックスモチーフに折りたたまれている。分子生物学的研究で提案されていた通り 3 番目の α -ヘリックスが直接 DNA の塩基を認識結合する部位であると考えられる。 β -シートの片側の面は 3 本のヘリックスの一部とタンパク質構造に重要な疎水性のコアを形成している。また、 β -ヘアピンは 1 番目と 2 番目のヘリックスの間のループ部分と水素結合をしていて、この 3 本のヘリックスと β -ヘアピンによって球状ドメインを形成していることがわかった。

ヘリックスターンヘリックスモチーフは、原核細胞由来のみならず真核細胞由来のいくつかの DNA 結合タンパク質の構造で見られるものである。それらの構造と OmpR-C のヘリックスターンヘリックス構造を比較してみると、 α -ヘリックスの間のターン部分の長さが典型的なモチーフでは 4 残基であるのに対し、OmpR-C では 11 残基のループとなっている。ターンが 4 残基よりも長い構造はいくつかのタンパク質に見られるものであるが、OmpR-C のループの長さは他のものと比較して最も長いことが明らかになった。また、このループ部分の $C\alpha$ 原子の温度因子は OmpR-C の α -ヘリックスや β -シートに存在するものよりも高い値であった。

OmpR は RNA ポリメラーゼの α サブユニットと相互作用することが知られている。また OmpR のアミノ酸配列の点変異実験によって、 α -サブユニットと相互作用する残基が同定されている。これらの残基は OmpR の立体構造では分子の片方の表面に位置している。さらにそれらの多くは 11 残基のループ領域の中に存在する。このことにより OmpR はフレキシブルなループで RNA ポリメラーゼの α -サブユニットと相互作用していると考えられる。

OmpR-C と他の OmpR ファミリーに属するタンパク質の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列を比較してみるとアミノ酸配列の長さはほぼ等しく、OmpR-C において構造の核となる疎水性領域、また DNA 結合ヘリックス部分において特に高い保存性があることがわかった。それに対して 2 番目と 3 番目の α -ヘリックスの間のループ部分には保存性が低い。このことより、OmpR ファミリーの各タンパク質の DNA 結合ドメインは OmpR-C と同じ折りたたみをしており、さらに同じ α -ヘリックスで DNA 配列を認識していることが示唆される。また、特定の構造を持たないループ部分で RNA ポリメラーゼと相互作用していると考えられる。

本研究は OmpR タンパク質の DNA 結合とそれによる RNA ポリメラーゼの活性化に関するこれまでの広範囲な研究に対して極めて重要な構造的情報を与えるものである。また、OmpR ファミリータンパク質の構造やこれから行われるであろう OmpR 全体の構造解析、リン酸化による OmpR の構造変化、さらには OmpR と DNA や RNA ポリメラーゼの α -サブユニットとの複合体の構造解析に向けての基礎的な情報を与えるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 助教授 中 川 敦 史

学 位 論 文 題 名

X-ray Crystal Structure Analysis of DNA-Binding Domain of *Escherichia coli* Transcription Factor OmpR

(大腸菌転写因子 OmpR の DNA 結合ドメインの X 線結晶構造解析)

大腸菌をはじめとするバクテリアは常時変化している環境の中で生命を維持するために、外界の情報を迅速に伝える機構を持っている。それらの中の最も簡単な系として二つの因子からなる系が存在する。この系は細胞外刺激のセンサータンパク質と遺伝子の発現を制御するレギュレータータンパク質から構成されている。センサータンパク質は細胞膜に存在し、環境の変化を検出し、その情報をそれぞれ特有のレギュレータータンパク質に伝達する。多くの場合、情報伝達は ATP の加水分解で得たリン酸基をレギュレータータンパク質へ受け渡すことによって行われる。レギュレータータンパク質はリン酸化によって情報を受けとるレシーバーとして機能するドメインと、必要な応答をするエフェクタードメインに分けることができる。バクテリア由来の約 50 種類のレギュレータータンパク質が同定されており、これらのタンパク質のアミノ酸配列の相同性が高いことから、これらは共通祖先の分子から進化したものであると考えられている。OmpR はその中の一つのファミリーに属する。

大腸菌の OmpR タンパク質は二種類の外膜タンパク質 OmpC と OmpF の生合成量の培地の浸透圧に応じた制御に関与している。OmpR はそれぞれ OmpC と OmpF の遺伝子のプロモータに結合し、RNA ポリメラーゼの転写活性に変化を及ぼす。センサーの役割をするタンパク質は EnvZ である。EnvZ は細胞膜に存在し、浸透圧の変化を感知し、リン酸化によって情報を OmpR に伝達する。OmpR(239 残基)は構造的に二つのドメインから構成されている。一つはアミノ酸配列の N 末端側ドメイン(OmpR-N, 121 残基)で、EnvZ によってリン酸化される部位を含んでいる。もう 1 つは C 末端側ドメイン(OmpR-C, 118 残基)で、

DNA に結合する部位を含んでいる。本研究では OmpR 及び OmpR ファミリーに属する他の転写因子の DNA 結合による転写の調節機構の知見を立体構造から得るために、OmpR-C の X 線結晶構造解析を行った。

OmpR-C はそのアミノ末端から、4 本鎖逆平行 β -シート、3 本の α -ヘリックスそしてカルボキシル末端側の 2 本鎖の β -ヘアピンからできている。2 番目と 3 番目の α -ヘリックスは、DNA 結合モチーフの一つであるヘリックスターンヘリックスモチーフに折りたたまれている。 β -シートの片側の面は 3 本のヘリックスの一部とタンパク質構造に重要な疎水性のコアを形成している。また、 β -ヘアピンは 1 番目と 2 番目のヘリックスの間のループ部分と水素結合をしていて、この 3 本のヘリックスと β -ヘアピンによって球状ドメインを形成していることがわかった。ヘリックスターンヘリックスモチーフは、原核細胞由来のみならず真核細胞由来のいくつかの DNA 結合タンパク質の構造で見られるものである。それらの構造と OmpR-C のヘリックスターンヘリックス構造を比較してみると、 α -ヘリックスの間のターン部分の長さが典型的なモチーフでは 4 残基であるのに対し、OmpR-C では 11 残基のループとなっている。また、このループ部分の $C\alpha$ 原子の温度因子は OmpR-C の α -ヘリックスや β -シートに存在するものよりも高い値であった。OmpR は RNA ポリメラーゼの α サブユニットと相互作用することが知られており、点変異実験によって、 α -サブユニットと相互作用する残基も同定されている。これらの残基多くは 11 残基のループ領域の中に存在する。このことにより OmpR はヘリックスターンヘリックス構造の変化したフレキシブルなループ構造で RNA ポリメラーゼの α -サブユニットと相互作用していると考えられるに至った。

OmpR-C と他の OmpR ファミリーに属するタンパク質の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列を比較してみるとアミノ酸配列の長さはほぼ等しく、OmpR-C において構造の核となる疎水性領域、また DNA 結合ヘリックス部分において特に高い保存性があることがわかった。それに対して 2 番目と 3 番目の α -ヘリックスの間のループ部分には保存性が低い。このことより、OmpR ファミリーの各タンパク質の DNA 結合ドメインは OmpR-C と同じ折りたたみをしており、さらに同じ α -ヘリックスで DNA 配列を認識していることが示唆される。また、特定の構造を持たないループ部分で RNA ポリメラーゼと相互作用していると考えられる。

本研究は OmpR タンパク質の DNA 結合とそれによる RNA ポリメラーゼの活性化に関するこれまでの広範囲な研究に対して極めて重要な構造的基盤を与えるものである。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。