

枯草菌の一般ストレス応答機構に関する構造生物学的研究

Structural Study of General Stress Response Mechanism in *Bacillus subtilis*

星野武司, 牧野正知, Teh Aik Hong, 熊坂崇

Takeshi Hoshino, Masatomo Makino, Teh Aik Hong, Takashi Kumasaka

(財団法人 高輝度光科学研究センター)

(SPRING-8/JASRI)

e-mail: thoshino@spring8.or.jp

微生物は常に外界からのストレスにさらされており、これらの生物が生存するためにはストレスに対し応答し適切な対応をする必要がある。グラム陽性菌の枯草菌は、このストレスに対抗するために 100 種類以上の遺伝子を発現していることが知られており、それらの遺伝子の発現は、 σ^B (SigB) と呼ばれるシグマ因子によって制御されている。 σ^B を活性化する経路は、ストレスの種類によって2つ分けられる。一つは、環境ストレス応答、つまり高温や高塩濃度、有機溶媒などの周辺環境への応答であり、もう一つは栄養飢餓状態に関わるエネルギーストレスである (図1)。これらの経路については、遺伝子破壊株などの実験により、関与する遺伝子が *sigB* オペロン上に存在していることが知られている。

σ^B の活性化の最終段階は、2つの経路に共通の機構で RsbV の脱リン酸化および RsbW との相互作用によるパートナースイッチングによって起こる活性型 σ^B の遊離である。その上流側においては、2つのストレス応答経路が異なっている。エネルギーストレス応答では、*sigB* オペロンとは別のオペロン上にある RsbQ と RsbP が関わっているとされている。RsbP は RsbV の脱リン酸化を行い、RsbP の脱リン酸化の機能はさらに上流にある RsbQ によって制御されていると推定されているが、現在のところその分子機構は明らかにされていない。また、環境ストレス応答では、RsbS、RsbT、RsbR 複合体が何らかのシグナルを受け取ることで、キナーゼである RsbT が活性化し、RsbS と RsbR をリン酸化することで自身が遊離する。さらに、RsbT が、エネルギーストレス経路における RsbP に対応する RsbU と複合体を新たに形成することで、RsbU が RsbV の脱リン酸化の活性をもつようになると推定されている。また、この活性化状態を解消するために RsbX が RsbS と RsbR に作用し脱リン酸化することが知られている。現在までに、RsbS、RsbT、RsbR 複合体の電子顕微鏡再生像による立体構造が知られているが、詳細な分子機構は不明である。

本研究では、これらストレス応答に関わるタンパク質の立体構造の詳細を明らかにすることで、タンパク質同士や低分子とタンパク質の間の相互作用に基づいた、情報伝達機構の解明を目指している。また、最上流の情報伝達機構を明らかにすることで、ストレス応答系の全貌の解明を最終目標にしている。これらを明らかにすることで、生命現象についての理解のみならず、グラム陽性菌が生産する薬剤などの生産能の増加や、グラム陽性菌の病原性獲得の機構について知見が得られることが期待される。

これまでに、当グループでは *sigB* オペロン上に含まれる 9 種類の遺伝子について、遺伝子組換え大腸菌を用いた発現系および

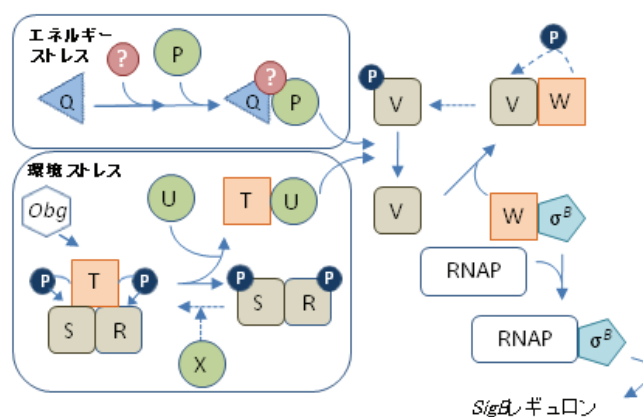


図1. 枯草菌一般ストレス応答のシグナル伝達経路

融合タンパク質を用いた精製系を構築しており、これらの遺伝子産物の一部について、立体構造解析を行っている。本発表では現在までに得られている研究結果について報告する。

RsbQ: すでにわれわれが解析した立体構造 (図2) によると、RsbQ は α/β -hydrolase (abH) スーパーファミリーに属しており、Ser プロテアーゼ様の catalytic triad は非常に疎水性の高い奥深いトンネル内に存在している。^[1] abH にはエステラーゼやリパーゼ、ペプチダーゼなどの活性をもつ種々の酵素が含まれるが、これまでの実験で RsbQ はエステラーゼ活性を有することが明らかとなっている。これらのことから、エネルギーストレスを伝達する物質は疎水性の高いエステル系低分子であると推測され、種々の基質候補分子を用いた活性測定を行って、基質分子の特定を進めている。RsbQ は大腸菌のビオチン生合成酵素の一つ BioH と非常に類似の構造をしているため、BioH の基質の一つである補酵素 A を RsbQ に対し作用させたところ、エステラーゼ活性が阻害された。このことから、RsbQ と補酵素 A は相互作用していることが推定される。

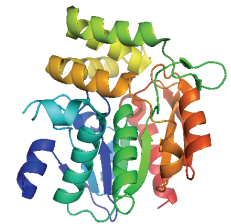


図 2. RsbQ の全体構造

RsbP: RsbP は PASドメインをもつホスファターゼである。PASドメインは様々なタンパク質に存在しており、他の分子と相互作用することで、触媒ドメインの活性を制御していることが知られている。PAS による活性化と酵素反応の機構の知見を得るために、全長の遺伝子産物について結晶化を行っているが、今のところ良好な結晶は得られていない。そこで、PAS ドメインのみについて SeMet を用いた異常分散法で解析を行ったところ、1.6 Å の分解能の立体構造を得ることができた (図3)。^[2] その構造は多くの他の PAS の構造と類似しており、安定な二量体を形成している。ただし、リガンド結合部位と推定されるポケットは嵩高い疎水残基が多いために比較的狭く、認識するのは疎水性の低分子リガンドであると推定される。

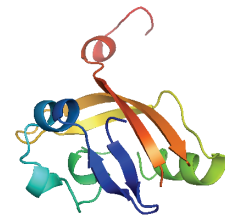


図 3. RsbP-PAS ドメイン構造

RsbX: RsbX は Mn イオン要求性の PPM ホスファターゼである。これまでに PPM Type I 酵素の立体構造は解析され、11 のモチーフからなることが知られているが、RsbX は motif 5a/5b を欠いている Type II 酵素に属し、立体構造が明らかではなかった。そこで、天然に含まれる Mn イオンや置換した金属イオンの異常分散法を用いて解析を行った。全体の構造 (図4) は、Type I のそれとほぼ同様であるが、欠けたモチーフに対応する可動性の高いループ部分で異なる構造を示した。このループは 3 つ目の金属イオンの配位と関係するとされており、新たな配位構造や基質認識機構が考えられる。また、RsbP/RsbU のホスファターゼドメインも類似の構造をもつと考えられることから、今後の検討によってこれらの酵素の活性化機構に関する知見も得られるものと考えている。

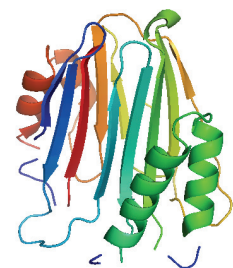


図 4. RsbX の全体構造

References:

[1] Kaneko, T., Tanaka, N., Kumasaka, T. (2005) *Protein Sci.*, **14**, 558-565.

[2] Makino, M., Kondo, S., Kaneko, T., Baba, S., Hirata, K., Kumasaka, T. (2009) *Acta Cryst.*, **F65**, 559-561