

氏名	わた なべ さとし 渡 部 聡
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3162 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Structural study of the oxidative-stress sensing SoxR transcriptional activator (酸化ストレス応答転写活性因子 SoxR の構造研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 杉 山 弘 教 授 藤 井 紀 子

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌等の細菌においては、*soxRS* レギュロンが酸化ストレスに対する防御機構を担っている。*soxRS* レギュロンにおいては、SoxR が酸化ストレスセンサーとして機能しており、酸化ストレスによって活性化されると SoxS タンパク質の発現を活性化させる。次に誘導された SoxS が様々な抗酸化タンパク質の発現を活性化させる。SoxR は分子内に鉄硫黄クラスター (2Fe-2S) を有する単量体が二量体を形成して機能しており、鉄硫黄クラスターの酸化還元により転写制御が行われている。また SoxR は金属ストレスや多剤耐性に応答するセンサーとして機能している MerR ファミリーに属している。このファミリーでは、対象プロモーターの-35と-10領域の間が、通常の17bpではなく19bpまたは20bp離れており、共通のDNAの歪み機構による転写活性化機構が提唱されている。本研究では、SoxR および SoxR と DNA との複合体について X 線結晶構造解析を行い、酸化ストレス応答機構および転写活性化機構についての構造的基盤に関するいくつかの知見が得られた。

大腸菌由来の SoxR について、精製法を改善することにより溶液中での安定性を向上させ、結晶化に成功した。まず、SoxR-DNA 複合体の完全酸化型および完全光還元型の結晶構造を、鉄原子を用いた単波長異常分散法を適用して、それぞれ 2.8Å, 2.9Å 分解能で決定した。また、SoxR 単独の結晶構造も 3.2Å 分解能で決定した。SoxR の全体構造は、DNA 結合ドメイン、二量化ヘリックス、および鉄硫黄クラスター結合ドメインで構成されており、二量化ヘリックスがコイルドコイルを形成し、SoxR 二量体を安定化している。DNA 結合ドメインは、典型的なウイング・ヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) モチーフを含んでおり、HTH モチーフにおいて DNA と結合している。SoxR-DNA 複合体と SoxR 単独の構造における SoxR を比較した結果、DNA 結合に伴って各ドメインに回転変化が見られた。同様の構造変化は他の MerR タンパク質でも起こっていることが予想される。

一方、SoxR の鉄硫黄クラスターは、非対称的な環境に囲まれており、溶媒領域と接触していることが明らかになった。外的要因によって容易に酸化還元が起こりやすいことが示唆される。プロモーター DNA の全体構造は、中央において約 65°, SoxR から離れる方向に湾曲している。BmrR や MtaN では、中心の塩基対が壊れスライディングを起こしていたが、SoxR では、中央の 2 塩基対は Watson-Crick 塩基対を保っている。さらに BmrR や MtaN と比較して、全体の長さは約 3.4Å, すなわち約 1 塩基対分短くなっている。MerR ファミリーのプロモーター配列を比較した結果、*soxS* プロモーターは 20bp スペーサーグループに分類されることが明らかになった。20bp スペーサーグループでは、対称的な配列が 2 塩基対を挟んで配列しており、今回得られた SoxR-DNA 複合体の構造は、MerR や ZntR など 20bp スペーサーを持つプロモーターの活性化構造を表すものと考えられる。

酸化型と還元型の構造比較の結果、各ドメインの配向が小さく変化し、DNA の二重らせんをねじる方向に変化が見られた。観測された構造変化は、結晶内における DNA の密なパッキングの影響で制約されていることが考えられるが、鉄硫黄クラスター結合サイトの非対称的な電荷分布が酸化還元による構造変化を引き起こしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、MerR ファミリーに属して、酸化ストレスセンサーとして機能している SoxR およびその DNA との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、SoxR の酸化ストレス応答機構、および SoxR を含め MerR ファミリーの転写活性化機構について考察したものである。SoxR は分子内に鉄硫黄クラスターを含む転写因子で、鉄硫黄クラスターの酸化還元によって転写制御を行っている。また、対象遺伝子のプロモーター配列に特徴があり、DNA の構造変化によって転写活性が制御されていると考えられている。

本研究では、大腸菌由来の SoxR について、精製法を改善することにより安定なタンパク質試料の供給を可能にして、タンパク質およびその DNA 複合体の回折実験に適した結晶を得ることに成功している。X 線結晶構造解析においては、タンパク質に含まれる鉄原子を利用した単波長異常分散法を用いることによって、位相決定を成功に導いている。構造解析は、SoxR-DNA 複合体の完全酸化型および完全光還元型、および SoxR 単独を対象として、それぞれ 2.8Å, 2.9Å, 3.2Å 分解能における結晶構造を決定している。

構造解析の結果、SoxR-DNA 複合体については、コイルドコイルを形成した SoxR 二量体が DNA を分子中央において大きく曲げて結合している全体構造を明らかにしている。また、その鉄硫黄クラスターは分子表面に位置しており、非対称的な環境に囲まれていることを見いだしている。得られた構造をもとに、SoxR の酸化ストレス応答機構および MerR ファミリーの転写活性化機構について考察を行っている。結晶構造によって、鉄硫黄クラスターの周辺環境は非対称的な電荷分布をしていることが明らかになり、酸化還元に伴う構造変化が非対称的な電荷分布によって引き起こされていることを考察している。また複合体中のプロモーター DNA の構造が、これまで報告されている BmrR や Mta の構造と比較して、約 1bp 短くなった構造をとっていることを明らかにしている。このファミリー内でのプロモーター配列を比較したところ、スペーサーが 19bp である場合の多くは、対称配列が 1 塩基対挟んで配列しているのに対し、スペーサーが 20bp である場合は、対称配列が 2 塩基対挟んで配列していることを見出している。これらの結果から、SoxR は配列構造のうえでは、例外的に 20bp スペーサーグループに分類され、今回得られた複合体構造は、20bp スペーサーをもつプロモーターの活性化構造であることと結論している。

以上のように、本研究は酸化ストレスセンサーとして機能している SoxR とその DNA との複合体の結晶構造を決定し、得られた構造情報から、酸化ストレス応答機構、転写活性化機構を考察することに成功したものと評価することができる。これらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められた。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。