ヘムをシグナル分子とする *Lactococcus lactis* における遺伝子発現制御

青野　重利
（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）

研究の目的

Lactococcus 属の乳酸菌は、ヘム生合成系を欠損しているにも関わらず、チトクローム *bd* を末端酸化酵素とする一連の呼吸鎖酵素が発現しており、菌体外部からヘムを取り込むことにより呼吸による生育が可能となる[1)]。フリーなヘム分子は細胞毒性を示すため、乳酸菌菌体内部でのヘム濃度は厳密な制御が必要となるが、その制御機構については全く不明な状況にある。そこで本研究では、 *Lactococcus lactis* を対象とし、本菌の菌体内ヘム濃度制御の分子機構解明を目的として研究を行った。なかでも特に、過剰なヘムを菌体外へ排出するトランスポーターの発現制御に関与する転写調節因子 YgfC（HrtR と命名）の構造機能相関の解明に重点をおいて研究を進めた。

方法

HrtR 発現用ベクターは、ゲノム配列データをもとに化学合成した DNA 断片を pET3a ベクター中に挿入することにより調製した。大腸菌中での効率的な発現を期待して、大腸菌において使用頻度の高いコドンを使用して *hrtR* 遺伝子の合成を行った。発現用宿主には、大腸菌 BL21(DE3)株を用いた。発現した HrtR の精製は、HitrapQ および、Hitrap-Heparin カラムを用いて行った。X 線結晶構造解析用の回折データは、Spring-8 BL26B1、BL26B2、BL41XU を用いて測定した。

結果

本研究で構築した発現系を用いて HrtR を発現させたところ、大腸菌中において、HrtR はヘムを結合したホロ型と、ヘムを含まないアポ型の混合物として発現することが分かった。実験項で述べたような方法で精製を行うことで、ホロ型とアポ型 HrtR を区別して精製することが可能であった。発現した HrtR が、大腸菌中でヘムを結合していることは、HrtR に対するヘム結合が生理的な反応であることを強く示唆している。このことを確認するために、精製したアポ型 HrtR とヘムとの反応を行った。

アポ型 HrtR にヘミンを滴定した結果を図 1 (A)に示す[2)]。ヘミンの添加に伴い、413nm

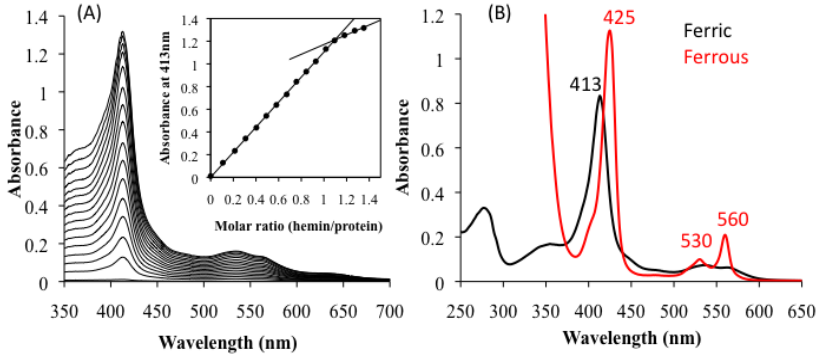

図 1　(A) アポ型 HrtR に対するヘミン滴定(B) HrtR の電子吸収スペクトル

における Soret 帯、および 550nm 付近の Q 帯の吸光度が増加した。Soret 帯吸光度変化を添加したヘミンとアポ型 HrtR の濃度比に対してプロットした結果、ヘミンとアポ型 HrtR の濃度比が 1 付近を境に、プロットの傾きが変わることが分かった。このことは、HrtR 1 分子中にヘム分子が結合することを示している。HrtR に対するヘムの結合は、非常に安定であることも分かった。HrtR に対して少過剰となるようヘミンを添加した後、反応溶液を陰イオン交換（DEAE）カラムにより精製することにより、100% ホロ型の HrtR を調製することが可能であった。このようにして調製したホロ型 HrtR の電子吸収スペクトルを図 1 (B)に示す。酸化型 HrtR、還元型 HrtR いずれも 6 配位型ヘムタンパク質に特徴的なスペクトルを示した[2)]。

HrtR の転写調節因子としての機能を調べるため、ゲルシフトアッセイによる DNA 結合実験を行った。標的 DNA としては、別途実験により明らかにした、*hrtR* 遺伝子のプロモーター領域に存在している HrtR 結合配列を含む 33bp の合成 DNA を用いた。図 2 に示すように、アポ型 HrtR は標的 DNA と結合する（レーン 2）のに対し、ヘム結合型であるホロ型 HrtR は標的 DNA とは結合しないことが分かった（レーン 3）。また、アポ HrtR と標的 DNA の複合体を含む反応溶液にヘミンを添加すると、添加したヘミンの濃度依存的に標的 DNA からの HrtR の解離が進行することが明らかとなった（レーン 4－6）[2)]。HrtR に対して 1 等量のヘミンを添加すると、アポ HrtR と標的 DNA の複合体は全く観測されなくなった。これらの結果より、HrtR の DNA 結合能は、外部から加えられるヘムにより制御されていること、すわわち、HrtR はヘムを生理的なエフェクターとする転写調節因子であることが分かる。*hrtR* 遺伝子のプロモーター領域に存在する HrtR 結合配列の位置と、HrtR によりヘム排出に関わるタンパク質が発現制御されていることを考慮すると、HrtR はリプレッサーとして機能しており、細胞内のヘムを感知すると標的 DNA より解離することにより過剰なヘムの排出に関与するタンパク質の発現を促していると考えられる。

HrtR の構造機能相関の詳細を解明するため、X 線結晶構造解析を行い、アポ型 HrtR 標的 DNA・アポ型 HrtR 複合体、およびヘムを結合したホロ型 HrtR の結晶構造決定に成功した[2)]。HrtR はいずれの場合もホモダイマー構造を有しており、その構造は TetR ファミリー転写調節因子と類似していた。HrtR では、N 末領域が、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造を DNA 結合モチーフとする DNA 結合ドメインを構成している。エフェクター分子であるヘムの結合サイトは、C 末領域に存在する疎水性キャビティー中に存在しており、His72 と His149 が軸配位子としてヘムに配位することが分かった。HrtR は、ヘム結合に伴ってα4 ヘリックス部分にコイル・ヘリックス転移が誘起され、その結果 DNA 結

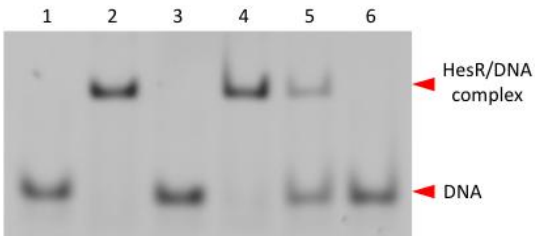

図 2.　HrtR ゲルシフトアッセイ
レーン 1：標的 DNA のみ
レーン 2：アポ HrtR
レーン 3：ホロ HrtR
レーン 4：アポ HrtR + 0.2 等量ヘミン
レーン 5：アポ HrtR + 0.5 等量ヘミン
レーン 6：アポ HrtR + 1.0 等量ヘミン

合ドメインの相対配置が変化することによりDNA結合能を失うことが明らかとなった。

標的DNA・アポ型HrtR複合体の結晶化には、15塩基対のDNA断片（センス鎖の配列：5’-ATGACACAGTGTCAT-3’）を用いた。得られた構造を解析した結果、Tyr50の側鎖とチミン12との間で、CH-π相互作用が、Arg46の側鎖とグアニン11の間で水素結合が観測された。DNA中の塩基と相互作用しているのは、Tyr50とArg46の二残基のみであった。また、これら二つの側鎖（Arg46とTyr50）間にも水素結合が観測された。His37、Arg46、およびTyr50の側鎖、ならびにIle35、Met36の骨格アミド基は、DNA骨格のリン酸基との間で水素結合を形成していることも分かった。

結論

Lactococcus lactis 中に含まれるHrtRは、ヘム分子を生理的なエフェクターとする転写調節因子であり、そのDNA結合能がヘム分子により制御されていることが明らかとなった。HrtRのX線結晶構造解析にも成功し、得られた構造情報を基にし、HrtRによるヘムセンシング、ならびにヘム分子によるHrtRの機能制御の詳細な分子機構の解明にも成功した。

文献

1) Pedersen, M. B. *et al.* (2008) Impact of aeration and heme-activated respiration on Lactococcus lactis gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J. Bacteriol.* **190:** 4903-4911.
2) Sawai, H., Yamanaka, M., Sugimoto, H., Shiro, Y., and Aono, S. (2012) Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **287:** 30755-30768.