

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12221

研究課題名(和文) 環境汚染物質に対する自発集積能を有する高感度汚染検出システムの構築

研究課題名(英文) Self-accumulating detection systems for environmental pollutants

研究代表者

青野 重利 (Aono, Shigetoshi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60183729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：重金属イオンを高感度にセンシング可能なセンサータンパク質の候補として、銅イオンセンサー能を有するセンサー型転写調節因子の取得、ならびにそれら銅イオンセンサータンパク質の構造解明を試みた。

鉄イオンを分子中に含む有機化合物の一種であるヘムに対するセンサー能を有するタンパク質として、コリネバクテリア中においてヘム取り込みに関与しているヘム結合・輸送タンパク質(HtaA、HtaB)を対象とし、これらのタンパク質の結晶構造決定を行った。得られた構造を基に、ヘム認識の分子機構解明を行い、ヘムの認識・結合を制御している分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：As a candidate of sensor protein for heavy metal ions, preparation and structural determination were tried with copper sensor proteins that act as a copper-sensing transcriptional regulators. And heme transport proteins in Corynebacteria were also chosen as research targets. In this work, we have studied the structural and functional relationships of HtaA and HtaB from *Corynebacterium glutamicum*. We determined the crystal structure of the N-, and C-terminal domains of HtaA (HtaA-N and HtaA-C, respectively) and HtaB. HtaA-N consists of 11 strands and two short helices and accommodates one heme molecule with Tyr58 located in the first helix as the heme axial ligand. Tyr58 forms a hydrogen bond with His111. HtaA-C and HtaB show similar global structures to HtaA-N. The key residues for heme-binding and recognition including the axial ligand of heme and residues involved in the hydrogen bonding interactions with heme are conserved among HtaA-N, HtaA-C, and HtaB.

研究分野：生物無機化学

キーワード：センサータンパク質 ヘム結合タンパク質 ヘム 銅センサータンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生物に対して深刻な障害をもたらす重金属汚染や多環芳香族化合物 (PAHs) 汚染の有無を判定するための手法は、これまでにいくつか報告されているが、いずれの分析手法においても測定試料の前処理が必要であり、迅速かつ簡便には分析結果が得られないという欠点がある。重金属汚染や PAHs 汚染に対して迅速な対応を取るためには、汚染の有無を迅速・簡便・高精度に判定するための分析システムの開発が必要不可欠である。

申請者は、これまでの研究において、各種バクテリア中に含まれる、外部環境因子に対するセンサー機能を有するセンサータンパク質の構造機能相関の解明に関する研究に取り組んできた。また、外部環境シグナルに応答したバクテリアの運動性制御 (走化性制御) に関する研究にも取り組んできた。センサータンパク質に関する研究では主に、遷移金属が関与するセンサータンパク質を重点的な研究対象としてきたことから、タンパク質を利用した重金属イオンセンサータンパク質の構築に関するアイデアを着想した。また、バクテリア走化性制御に関する研究を基に、タンパク質工学的的手法により、走化性制御系においてセンサーとして機能するシグナルトランスドューサータンパク質を改変することで、汚染物質 (重金属イオン、PAHs 等) を外部環境シグナルとして感知し、それらの物質に対して自発的に集積する性質を有したバクテリアが創製可能ではないかとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、重金属や多環芳香族化合物 (PAHs) による土壌・水圏の汚染を簡便かつ高感度に判定可能なシステムの開発を目的として研究を行う。そのために、蛍光タンパク質発現システムと組み合わせることにより、高感度な環境汚染物質検出が可能と考えられる、重金属イオンあるいは PAHs に対する高感度なセンシング能をもった転写調節因子をデザイン・創製し、それらの構造機能相関を明らかにする。そのような転写調節因子のデザインにあたっては、申請者がこれまで研究対象としてきたセンサー型転写調節因子を基盤として利用する。また、重金属イオンあるいは分子中に重金属イオンを含む分子に対する高感度なセンシング能をもった新規なタンパク質の探索も行い、それらの特性についても明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究で研究対象としたタンパク質はいずれも、大腸菌 BL21(DE3)株を発現用宿主、T7 プロモータを有する pET ベクターを発現用プラスミドとして使用して、組換えタンパク質として発現したものをカラムクロマトグラフィーにより精製した。タンパク質結晶化は、ハンギングドロップ法により行い、得

られた結晶を用い、SPring-8 において X 線回折データを収集した。

### 4. 研究成果

(1) 重金属イオンを高感度にセンシング可能なセンサータンパク質の候補として、銅イオンセンサー能を有するセンサー型転写調節因子の取得、ならびにそれら銅イオンセンサータンパク質の構造と機能の解明を目的として研究を実施した。

ゲノム配列データの検索を行い、4 種の高度好熱性古細菌 (*Sulfolobus solfataricus*、*Sulfolobus acidocaldarius*、*Pyrococcus furiosus*、*Thermoplasma volcanium*) より銅イオンセンサー能を有する転写調節因子をコードしていると推定される copR 遺伝子をクローニングした。クローニングした copR 遺伝子を T7 プロモーター下流に挿入し、CopR タンパク質発現系の構築を行った。調製した発現系を用いて CopR タンパク質の発現を検討した結果、*Sulfolobus solfataricus* 由来の CopR (SsCopR) および *Thermoplasma volcanium* 由来の CopR (TvCopR) では目的タンパク質の発現が確認されたが、*Sulfolobus solfataricus* および *Pyrococcus furiosus* 由来の CopR ではタンパク質発現が観測されなかった。

組換えタンパク質の発現が観測された SsCopR および TvCopR を用い、これらの結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶を与える条件を見出すことはできなかった。その原因を明らかにするため、これら CopR の高次構造を解析したところ、SDS-PAGE では純度よく精製されており、いずれも可溶性標品として精製されているが、溶液中で凝集状態であることが分かった。このことが、結晶化がうまく進行しない原因として考えられる。そこで、抗凝集効果が期待されるグリセロール、エチレングリコール、アルギニンの添加、および塩化マグネシウム、塩化ナトリウム等を添加することにより溶液の塩強度を変化させることにより、凝集状態を解離させ、安定な二量体 (生理的に機能している状態) を形成することを試みた。これら添加剤存在下において結晶化条件のスクリーニングを実施したが、結晶構造解析に適した結晶を得るには至らなかった。

(2) 鉄イオンを分子中に含む有機化合物の一種であるヘムに対するセンサー能を有するタンパク質として、コリネバクテリア中においてヘム取り込みに関与しているヘム結合・輸送タンパク質 (HtaA、HtaB) を対象とし、これらのタンパク質によるヘム認識の分子機構解明を行った。

鉄イオンは全ての生物に必須の遷移金属であり、生物は生育環境に応じた様々な鉄取り込み系を有している。感染症の原因菌を含むヒト等に共生する細菌の多くは宿主のヘモグロビンに由来するヘムを鉄源としており、ヘム取り込み系を有している。これまでに、黄

色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* を対象としたグラム陽性菌のヘム取込み系が盛んに研究されてきた。*S. aureus* は NEAT-domain と呼ばれる共通の構造モチーフを有する iron-regulated surface determinant (Isd) タンパク質群からなるヘム取込み系を有している (図 1 A)。この系は Isd システムと称され、*Bacillus anthracis* などのグラム陽性菌に広く保存されている。一方、同じグラム陽性菌でもコリネバクテリアや放線菌は Isd システムを有しておらず、NEAT-domain をもつタンパク質も見つかっていない。コリネバクテリアにおいては、新規なヘム結合タンパク質 HtaA と HtaB がヘム取込みに関わっていることが分かった (図 1 B)。

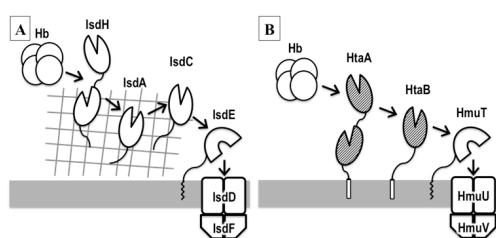


図 1 グラム陽性菌におけるヘム取込み系の模式図 (A) 黄色ブドウ球菌由来の Isd システム (B) コリネバクテリア由来のヘム取込み系

本研究では、*Corynebacterium glutamicum* 由来の HtaA および HtaB によるヘム認識・結合の分子機構を明らかにするため、これらの結晶構造解析を行った。まず、HtaA の N 末端領域 (HtaA-N) の結晶化、ならびに構造解析を行った。その結果、HtaA-N は 11 本の  $\beta$ -strand と 2 本の短い  $\alpha$ -helix から構成されており、HtaA-N 1 分子あたりにヘム 1 分子が結合していた (図 2)。分子表面近傍に、 $\beta$ -strand 間を繋ぐ二つのループ領域がヘム分子を挟み込むように存在し、疎水性アミノ酸が豊富なポケット中にヘムが結合していた。ヘム鉄は Tyr58 を軸配位子とする 5 配位構造をとって

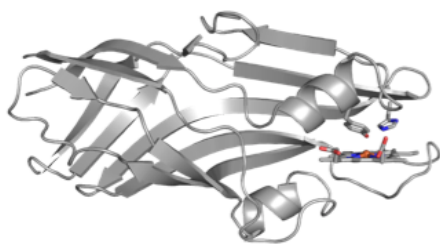


図 2 HtaA-N の全体構造

いた。Tyr58 のヒドロキシ酸素は、近傍の His111 のイプシロン位の窒素と水素結合を形成していた (図 3)。HtaA-N と HtaA の C 末ドメイン (HtaA-C) および HtaB のアミノ酸配列を比較すると、HtaA-N においてヘム結合ポケットを形成する疎水性アミノ酸や、ヘム鉄の軸配位子である Tyr58、Tyr58 と水素結合している His は、HtaA-C、HtaB の対応する位置に保存されていた。このことから、HtaA-N、HtaA-C、HtaB は共通の構造基盤を有するヘム結合・輸送タンパク質であると考えられる。

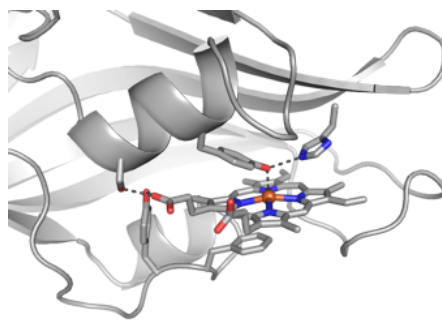


図 3 HtaA-N のヘム周辺構造

HtaA-N と共通のフォールディングを有する既知のヘム結合タンパク質は存在しなかった。しかしながら、HtaA-N と NEAT-domain 間には、いくつかの共通する性質が見られた。HtaA-N と NEAT-domain では、アミノ酸配列の相同性はないが、 $\beta$ シート構造を骨格としているという共通点があった。また、ヘム結合部位に着目すると、いずれも Tyr がヘムの軸配位子として機能しており、軸配位子である Tyr は近傍の残基と水素結合を形成している。この水素結合は、ヘム取込み系で機能するタンパク質に共通の構造基盤であると考えられ、ヘムの結合親和性の制御に寄与していると推定される。

HtaA はリンカーでつながれた N 末端ドメイン (HtaA-N) と C 末端ドメイン (HtaA-C) から、HtaB は 1 つのドメインから構成されている。HtaA-C および HtaB の構造決定にも成功した。決定した HtaA-C および HtaB の全体構造は、HtaA-N と高い相同性を示した。いずれの構造においても、Tyr が第 5 配位子としてヘム鉄に配位しており、Tyr は近傍の His と水素結合を形成していた。また、HtaA-N で観測されていた、ヘムプロピオン酸と Ser 間での水素結合、Phe とヘムピロール環の間の  $\pi$ - $\pi$ スタッキングも、HtaA-N、HtaA-C、HtaB すべてで保存されており、これらの相互作用が、ヘム認識に重要な役割を果たしていることを示唆している。全体構造が高い相同性を示す一方、結合するヘムの配向やヘム結合部位周辺のループの長さには、違いが見られた。黄色ブドウ球菌のヘム取り込み系では、ヘム結合部位周辺のループがヘム結合タンパク

質間の特異的な認識に寄与することが報告されており、HtaA/HtaB においてもループの長さの違いがヘムの輸送に関わっている可能性が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

すべて査読あり。

1. "A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-Helix in CooA Upon CO Dissociation Using Time-Resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy" A. Otomo, H. Ishikawa, M. Mizuno, T. Kimura, M. Kubo, Y. Shiro, S. Aono, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B.* **2016**, 120 (32), 7836-7843.  
doi: 10.1021/acs.jpcc.6b05634
2. "Structural Characterization of Heme Environmental Mutants of CgHmuT that Shuttles Heme Molecules to Heme Transporters" N. Muraki, C. Kitatsuji, M. Ogura, T. Uchida, K. Ishimori, S. Aono, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 829.  
doi:10.3390/ijms17060829
3. "Structural Basis for Heme Recognition by HmuT Responsible for Heme Transport to the Heme Transporter in *Corynebacterium glutamicum*" N. Muraki, S. Aono, *Chem. Lett.*, **2015**, 45, 24-26.  
doi:10.1246/cl.150894

[学会発表] (計 19 件)

1. S. Aono, N. Muraki, "Structural Basis for the Molecular Mechanism of Heme Acquisition in *Corynebacterium glutamicum*" 8<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2016年12月4日～12月9日, Auckland, (New Zealand)
2. S. Aono, "New functions of heme: sensing and signaling in biological systems" 9<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, 2016年11月14日～11月16日, Gyeongju, (Korea)
3. N. Muraki, S. Aono, "Structural analysis of a novel heme acquisition protein, heme transport-associated (Hta) family" 9<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, 2016年11月14日～11月16日, Gyeongju, (Korea)
4. H. Sawai, S. Aono, "Structural Basis for the

Mechanism of Oxygen Sensing by a Chemotaxis Signal Transducer Protein Aer2" 19<sup>th</sup> International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, 2016年9月11日～9月14日, Hamburg, (Germany)

5. S. Aono, N. Muraki, "Crystal structures of novel heme binding domains in *Corynebacterium glutamicum* HtaA and HmuT responsible for heme uptake" 10<sup>th</sup> International Biometals Symposium 2016, 2016年7月10日～7月15日, Dresden, (Germany)
6. S. Aono, "Structural Basis for Heme Acquisition in *Corynebacterium glutamicum*" 9<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2016年7月3日～7月8日, Nanjing, (China)
7. 村木則文、青野重利、「コリネバクテリアのヘム取込み系の構造と機構」第43回生体分子科学討論会、2016年6月24日～6月25日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)
8. S. Aono, "Structure and Function of Heme Acquisition System in *Corynebacterium glutamicum*" 229<sup>th</sup> ECS Meeting, 2016年5月29日～6月3日, San Diego, (U.S.A.)
9. Y. Okamoto, C. Kitatsuji, N. Muraki, S. Aono, "Spectroscopic Properties of Heme-binding protein HupD responsible for heme acquisition in *Listeria monocytogenes*" Pacificchem 2015, 2015年12月15日～12月20日, Honolulu, (U.S.A.)
10. N. Muraki, S. Aono, "Structural basis for heme acquisition in *Corynebacterium glutamicum*" Pacificchem 2015, 2015年12月15日～12月20日, Honolulu, (U.S.A.)
11. S. Aono, "Molecular Mechanisms of Heme Homeostasis in Gram-positive Bacteria" Pacificchem 2015, 2015年12月15日～12月20日, Honolulu, (U.S.A.)
12. S. Aono, "Regulation of heme homeostasis in Gram positive bacteria" 17<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2015年7月20日～7月24日, Beijing, (China)
13. S. Aono, H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, "Structure and function of heme-responsive transcriptional regulator HrtR" FEBS Congress, 2015年7月4日～7月9日, Berlin, (Germany)
14. S. Aono, "Molecular Mechanism of Heme-responsive Transcriptional Regulation in *Lactococcus lactis*" 6<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2015年6月10日～6月12日, Lisbon, (Portugal)
15. S. Aono, "Structural basis for heme transport by HmuT in *Corynebacterium*

*glutamicum*” 227th The Electrochemical Society Meeting, 2015年5月24日～5月28日, Chicago, (U.S.A.)

16. S. Aono, “Molecular Mechanisms of Heme Acquisition in *Corynebacterium glutamicum* revealed by X-ray crystallography” 5th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2015年5月19日～5月23日, Parry Sound, (Canada)
17. 青野重利、岡本泰典、北辻千展、村木則文、「*Corynebacterium glutamicum* のへム取込みに関与するへム輸送タンパク質の構造と機構」第116回触媒討論会、2015年9月16日～18日、三重大学（三重県・津市）
18. 村木則文、岡本泰典、北辻千展、青野重利、「コリネバクテリアのへム取り込みに関わるタンパク質の構造機能相関」第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日～12日、熊本大学（熊本県・熊本市）
19. 村木則文、北辻千展、青野重利、「*Corynebacterium glutamicum* のへム取り込み系におけるへム認識の構造基盤」第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日～26日、あわぎんホール（徳島県・徳島市）

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

青野 重利 (Aono, Shigetoshi)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60183729

##### (3)連携研究者

村木 則文 (Muraki, Norifumi)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：20723828