

令和元年6月25日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07287

研究課題名(和文) 枯草菌一般ストレス応答蛋白質の構造とシグナル分子の解明

研究課題名(英文) Investigation of protein structure and signaling molecule in general stress response in *Bacillus subtilis*

研究代表者

熊坂 崇 (Kumasaka, Takashi)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・タンパク質結晶解析推進室・主席研究員

研究者番号：30291066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：熱や乾燥に強い芽胞の形成により滅菌が難しい枯草菌は食品腐敗の原因となり増殖制御が課題となっている。本研究では枯草菌の一般ストレス応答を司る蛋白質群のシグナル伝達機構を構造生物学とX線結晶学により解明を進めた。栄養ストレス系蛋白質間RsbQ/Pのシグナル伝達は未知分子の関与を示唆していたが、構造解析によりその蛋白質結合構造の解明ができた。下流のRsbPは複雑な構造を持ち、分子内部のシグナル伝達による活性化が示唆されたが、部分構造解析と溶液散乱により全体の分子モデルが構築できた。その他この系に関わる蛋白質群の構造解析も合わせて進め、特に上流部に関わる蛋白質について一部結晶が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命にとって生存を脅かすストレスへの応答は生き延びるための生来的な機構である。細胞がエネルギー消費を抑えストレス環境に適用するために必要な遺伝子の活性化は、細胞内情報伝達機構により達成されている。特に細胞の増殖と代謝の分子制御機構は、高等生物では低分子量G蛋白質Rasなどを含むリン酸リレー系に見られるが、微生物でも普遍的な機構が存在する。この機構は生体防御としての病原菌の毒性発現や抗生物質などの二次代謝物生産や食品工学においては腐敗にも関与するため関心を集めており、その解明によりこれらの微生物の振舞の制御を可能にすることに繋がる。

研究成果の概要(英文)： *Bacillus subtilis* is difficult to sterilize due to the formation of spores that are resistant to heat and dryness, and therefore causes food spoilage and its growth control has become an issue. In this study, we proceeded to elucidate the signal transduction mechanism of proteins responsible for general stress response of *Bacillus subtilis* by crystallographic analysis. RsbQ / P proteins, involved in the signal transduction of nutrient stress, suggested the contribution of ligand molecules, then here we elucidated the protein-ligand complex structure. The RsbP has a complex structure, suggesting activation by signal transduction inside the molecule, then here we constructed and proposed an entire molecular model by combination of partial crystal structural analysis and X-ray solution scattering. In addition, structural analysis of the proteins involved in this system was also carried out, and some crystals were obtained for proteins involved in the upstream part.

研究分野：構造生物学

キーワード：微生物 ストレス応答 結晶構造解析 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレスと微生物：生命にとって生存を脅かすストレスへの応答は生き延びるための生来的な機構である。細胞がエネルギー消費を抑えてストレス環境に適用するために必要となる遺伝子の活性化は、細胞内の情報伝達機構により達成されている。なかでも細胞の増殖と代謝の制御は、高等生物に見られる低分子量 G 蛋白質 Ras を含むリン酸リレーカスケードなどがよく知られている一方、微生物でも対数増殖期から定常期に移行する普遍的な機構が存在する。この機構は環境適応に加え、病原菌の毒性発現や抗生物質などの二次代謝物生産に関与する遺伝子の発現に関わり、食品工学の観点では腐敗に関与する微生物の増殖の制御機構としても関心を集めている。

(2) 枯草菌のストレス応答：グラム陽性の代表的な微生物である枯草菌は、類縁種の納豆菌にも見られるように、芽胞形成により容易に死滅しない特徴があり、食品保存中の品質低下の原因菌とも目されている。この微生物の細胞周期の制御は、遺伝子の転写に関わる酵素である RNA polymerase において、DNA を認識するサブユニットである 因子のうち、SigB とその制御蛋白質 (rsb; Regulators of SigB) 群でなされることが遺伝子実験で調べられてきた。SigB を直接制御する初段の系 (RsbVW) は多くの微生物にみられ、類似体の構造生物学研究から蛋白質間相互作用を蛋白質リン酸化によって切り替えるパートナースイッチモデルが分子機構として提唱されている。さらにその上流はエネルギーストレスと環境ストレスにそれぞれ応答するカスケードに分岐し、詳細な構造と分子機構解明は現在途上にある。

(3) エネルギーストレス応答：エネルギー (栄養飢餓) ストレスを伝達する蛋白質 RsbP と RsbQ はそれぞれマルチドメイン構造を持つ酵素ホスファターゼと / 型加水分解酵素に分類される。これらは一部のグラム陽性菌に特徴的に見られ、活性化には未知のシグナル分子が関わりと示唆されている。我々のグループでは RsbQ および RsbP の部分構造 (PAS およびホスファターゼドメイン) の構造解析を行い、疎水性低分子と考えられるシグナル分子が RsbQ によって加水分解され RsbP の PAS ドメインに移行してそのホスファターゼドメインを活性化すると推論した。しかし、依然としてシグナル分子の実態は不明である。

(4) 環境ストレス応答：もう一方の上流部にあたる環境ストレス応答系 (RsbRSTUX) はより普遍性が高く、広く微生物に存在することがわかっている。その中心的な役割を担う RsbRST のヘテロ口 60-72 量体からなる 1.8MDa の巨大なハブタンパク質 Stressosome のクライオ電顕構造は既に報告され、リン酸化モジュール STAS ドメインの新規な複合体構造が明らかとなったが、その構築原理に関する情報は得られていない。

われわれは、このモジュールの脱リン酸化にかかわるフォスファターゼ RsbX の結晶構造を報告し、この酵素の Mn 濃度依存的な活性制御機構を構造および機能解析から議論し、ハブとの複合体モデルを考察した。ハブのモジュールである RsbS の結晶化は進行中であるが、分解能が低いこと (3.0 Å) および非対称単位中の分子が 8-10 個と推定されることから、類似分子がありながら解析が未完である。RsbS と相互作用する RsbT との親和性を変化させる成分も精製の過程で抽出されている。

(5) さらに上流へ：一方、さらに上流の情報伝達においては、RsbT を活性化する Obg とそれを活性化するリボソーム蛋白質との相互作用についてデータが得られ始めた。また、エネルギーストレスの起源については、細胞内 ATP 濃度との関連が示唆されているが RsbPQ との関連は不明で、大腸菌等で調べられているアミノ酸飢餓条件下の緊縮制御 (RelA およびその GTP プールのバランス制御) との関連も未解明である。

2. 研究の目的

本研究では微生物の増殖制御に深く関与する一般ストレス応答系について、その情報伝達機構を蛋白質の構造解析と機能解析を組み合わせることを目的とする。これまでの研究を踏まえ、二つに分岐したストレス応答系の上流のシグナル伝達機構解明を中心課題とする。具体的には、(1) エネルギーストレスを担う蛋白質 RsbP/RsbQ に関わるストレスシグナル低分子探索とそれによるタンパク質間の情報伝達機構の解明、(2) RsbP タンパク質の全長構造解析によるマルチドメインタンパク質の活性化機構の解明 (3) その他関連タンパク質の構造解析、特に環境ストレス応答のハブとなる蛋白質 Stressosome に関わる RsbS 複合体の構造機能解析を中心に、細胞内ストレスシグナル伝達複合体の解析を行い、ストレス制御の起源を明らかにする。研究にあたっては、研究代表者が所属し測定技術開発を行っている放射光施設を活用し、その施設を活かした計測手法や手法開発に、これらの試料を適用することも目的としている。実際にこれまでも、RsbQ 結晶は室温測定や安定的な凍結に利用できる技術の開発にも貢献している。

3. 研究の方法

(1) RsbPQ 未知シグナル分子の同定と構造解析：枯草菌 RsbQ の未知シグナル分子の同定について、結晶化と構造解析を同時に進めつつ、細胞抽出物の活性への影響や、それら候補分子との

結合構造の解析を進める。

(2) RsbP 全長構造の解析: RsbP について、これまでに得られている RsbP-PAS のシグナル候補分子複合体の解析と合わせ、RsbP の全長構造解析に向けた結晶化と、より精度の高い溶液散乱データを取得する。

(3) その他関連タンパク質の構造解析: 上記の RsbPQ 以外で SigB の活性化に関わる Rsb タンパク質群に加え、それらの活性化に関与すると考えられている Obg, RplK, RplM, RelA について、発現系を見直し効率化を進める。RsbS については、これまでに結晶中に非対称単位中に多くの分子を含むため解析が困難を極めているが、発現系の見直しも行い、別の結晶系を得られるような変異を加えた新たなデザインを行う。

4. 研究成果

(1) RsbPQ 未知シグナル分子の同定と構造解析: 枯草菌 RsbQ の未知シグナル分子の同定について、結晶化と構造解析を同時に進め、細胞抽出物および候補分子に対する結合構造の解明ができた。なお、両者の結合構造は活性中心近傍では類似しているが、一部異なる部分も確認されており、抽出物の同定のために種々の有機溶媒で処理した細胞画分の抽出物と RsbQ の複合体を大量調製し、質量分析を試みた。しかし現時点では優位なシグナルは得られていない。その分子構造の同定は、枯草菌などの微生物の細胞周期を制御する薬剤の開発につながると期待できる。

(2) RsbP 全長構造の解析: RsbP の全長構造解析に向けた結晶化として、発現精製条件を見直し、種々の結晶化スクリーニングキットを用いて微量分注により効率的な条件検討を行ったが、結晶は得られていない。また、RsbP 金属配位子の X 線蛍光分析により安定構造形成を試みた。既に得ているホスファターゼドメインの結晶構造では活性に必要な Mn イオンが観測できていない。そこで透析法による Mn の添加や除去を試みるとともに、XAFS 測定を行った。その結果、精製時に緩衝液に Mn を添加することではじめて Mn の X 線蛍光が観測できた。結合した Mn は透析では除去できなかったため、大腸菌における蛋白質発現時に Mn 供給が不十分なことがこの欠乏の原因と考えられる。

さらにこの Mn を添加して結合させた全長の試料を用い、SEC-SAXS 法による X 線溶液散乱データを取得した。Mn の有無およびリガンドの有無について解析した結果、散乱曲線には大きな違いが見られず、結合そのものは全体構造には大きな影響を与えないことが示唆された。さらに共同研究により、溶液散乱曲線にフィットしたモデルの構築ができたが、構造解析ができていないコイルドコイル領域が分子動力学計算においてフレキシブルとなっており、適合解の多様性が見られている。この部分についてよりリジッドな構造を用意することで、信頼性の高いフィッティングがさらに実施できると考えている。

(3) その他関連タンパク質の構造解析: 上述の Rsb 群以外のタンパク質、特に Obg, RplK, RplM, RelA については、発現系の全面的な見直しを行った。その結果、いずれも大腸菌にて発現が確認され、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過により高純度の試料を得ることができた。一部については十分な発現量が得られたため、結晶化条件を検索したところ、結晶様物が析出している。引き続き構造解析を実施したい。

RsbS については取得済みの結晶回折データの解析を継続して進めたが、依然として結晶中に非対称単位中に多くの分子を含むことが原因となり、位相決定には至らなかった。本研究課題とは別に、蛋白質分子の会合を促進する技術開発を進めており、一定の効果が得られた(論文発表準備中)ので、RsbS 蛋白質にこの技術を導入して、別の結晶系を得られるような付加を加えるデザインを行って、新たな結晶の作成に役立てたいと考えている。

< 引用文献 >

- Kaneko T, Tanaka N, Kumasaka T. Crystal structures of RsbQ, a stress response regulator in *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.* 14, 558-565 (2005).
- Makino M, Kondo S, Kaneko T, Baba S, Hirata K, Kumasaka, T. Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the PAS-domain of RsbP, a stress-response phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst.* F65, 559-561 (2009).
- Suganuma M, The A-H, Makino M, Shimizu N, Kaneko T, Hirata K, Yamamoto M, Kumasaka T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the stress response PPM phosphatase RsbX from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst.* F65, 1128-30 (2009).
- Teh A-H, Makino M, Hoshino T, Baba S, Shimizu N, Yamamoto M, Kumasaka T. Structure of RsbX Phosphatase in General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst.* D71:1392-1399 (2015).
- Baba S, Hoshino T, Ito L, Kumasaka T. Humidity control and hydrophilic glue coating applied to mounted protein crystals improves X-ray diffraction experiments. *Acta Cryst.* D69, 1839-1849 (2013).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

熊坂 崇、馬場 清喜、河村 高志、結晶調湿 X 線回折法と室温測定の評価、日本結晶成長学会誌、査読有、2019、電子出版、DOI: 10.19009/jjacg.3-45-4-02

Baba S, Mizuno N, Okumura H, Nuemket N, Hasegawa K, Nakamura Y, Murakami H, Ueno G, Fukui T, Irie T, Tanaka M, Yamazaki H, Ohashi H, Yamamoto M, and Kumasaka T. Upgrade of bending magnet MX beamline BL38B1 at SPring-8. AIP Conf Proc, 2054, 060008 (2019). Yamamoto M, Hirata K, Yamashita K, Hasegawa K, Ueno G, Ago H and Kumasaka T. Protein microcrystallography using synchrotron radiation. IUCrJ, 4:529-539 (2017).

[学会発表](計 4 件)

Nuemket Nipawan, Omichi Kazuki, Kumasaka Takashi, Crystal analysis investigates signaling molecule for general response protein RsbQ in Bacillus subtilis, The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2018.

Nuemket Nipawan, Omichi Kazuki, Kumasaka Takashi, Crystal analysis investigates signaling molecule for general response protein RsbQ in Bacillus subtilis, ComBio2017, 2017.

Nuemket Nipawan, Omichi Kazuki, Kumasaka Takashi, Membrane lipids as energy stress signal via RsbQ/P in Bacillus subtilis, American Crystallographic Association 66th Annual Meeting, 2016.

Nuemket Nipawan, Omichi Kazuki, Kumasaka Takashi, Signaling molecules of the energy stress response pathway in Bacillus subtilis, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016.

[その他]

アウトリーチ活動情報

研究紹介展示「いのちの源・タンパク質の世界」, 熊坂 崇ほか、2018 年度第 26 回 SPring-8 施設公開, 兵庫県佐用郡, 2018

学生向け講演「SPring-8 でタンパク質を見る」熊坂 崇、ROOT-国際的科学技术人材育成挑戦プログラム 週末セッション@播磨, 兵庫県姫路市, 2018

研究紹介展示「いのちの源・タンパク質の世界」, 熊坂 崇ほか、2017 年度第 25 回 SPring-8 施設公開, 兵庫県佐用郡, 2017

研究紹介展示「いのちの源・タンパク質の世界」, 熊坂 崇ほか、2016 年度第 24 回 SPring-8 施設公開, 兵庫県佐用郡, 2016

ホームページ

研究室ホームページ: <http://bioxtal.spring8.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: ヌアムケット ニパワン

ローマ字氏名: Nuemket Nipawan

研究協力者氏名: 大道 一輝

ローマ字氏名: Omichi Kazuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。