

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006 ~ 2008
 課題番号： 18770093
 研究課題名 (和文) 一酸化炭素センサーとして働く転写制御ヘムタンパク質の構造解析
 研究課題名 (英文) Structural analysis of CO-sensing transcription factor
 研究代表者
 小森 博文 (KOMORI HIROFUMI)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
 研究者番号：30382261

研究成果の概要：

生物は環境に適応するために外界のシグナルを受容し、生体内へ伝達する仕組みを持っている。一酸化炭素 (CO) 以外の気体分子のシグナルセンサーとして働くタンパク質も多数発見されているが、CooA タンパク質はその分子中にヘムを含むとてもユニークな転写制御因子であり、ヘムタンパク質としても全く新規なものである。本研究は、CO による転写制御のメカニズムを明らかにすることを目的として、嫌気性微生物 *C. hydrogenoformans* 由来 CooA タンパク質の構造解析を行った。CooA タンパク質は、C 末端に his-tag の付いた組換えタンパク質として発現、精製し、ポリエチレングリコールを沈殿剤として用いた条件で結晶化に成功した。ヘム鉄の異常分散を利用して SAD 法による位相決定を行い、最終的に 2.2 Å 分解能で結晶構造を決定した。明らかとなった不活性型 CooA の結晶構造と同じ転写制御因子ファミリーに属する活性型 CRP の結晶構造を比較した結果、活性化によって DNA 結合ドメインが大きく構造変化をすることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

生物は環境に適応するために外界のシグナルを受容し、生体内へ伝達する仕組みを持っている。一酸化炭素 (CO) 以外の気体分子のシグナルセンサーとして働くタンパク質も多数発見されているが、CooA タンパク質はその分子中にヘムを含むとてもユニークな転写制御因子であり、ヘムタンパク質としても全く新規なものである。嫌気性微生物 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* は、CO をエネルギー源として生育することが可能であり、CooA タンパク質が転写制御因子として機能することにより、CO 代謝にかかわる一連のタンパク質の発現を制御している。CO によりその機能が制御されているため、CooA の機能発現および CO による DNA 転写制御においては、分子中に含まれるヘムが重要な役割を果たしていると推定されるものの、その詳細な分子機構は明らかにされていない。これまでに、アメリカの Poulos らのグループによって光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来 CooA (Rr-CooA) の CO 非結合型の結晶構造が決定されている [Nature Struct. Biol. 7, 876-880 (2000)] (図 2b)。しかし、活性型である CO 結合型の立体構造の情報はなく、CooA に CO が結合することによってどのような構造変化が起こり、DNA を認識しているのかについては未だによく分かっていない。詳細な分子認識機構を明らかにするためにも立体構造情報は不可欠である。CooA は、外界のシグナルに応答して転写制御を行う cAMP receptor protein (CRP) family の一つであるが、未だに、CRP family の活性型と非活性型の両方の結晶構造が解析された例はない。

2. 研究の目的

CooA が CO センサー機能を有することから、CooA 中のヘムに CO が可逆的に吸脱着することにより、CooA の分子構造が変化し、その結果、CooA が転写活性化因子として活性化されるのではないかと考えられている。そこで、本研究は、CooA タンパク質中に含まれるヘムが転写調節機能に果たす役割、および CO による転写制御のメカニズムを明らかにすることを目的として、CooA タンパク質の構造解析を行った。CooA のシグナルに依存した RNA ポリメラーゼの転写制御機構は、他の CRP family にも共通のものであり、本研究によって、CooA の結晶構造が明らかになれば、他の CRP family の分子機構の解明にも大きく貢献できる。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の精製

大腸菌における *C. hydrogenoformans* 由来 CooA (Ch-CooA) タンパク質発現系の構築、お

よび発現した Ch-CooA の大量精製法を確立している。具体的には、結晶化に用いるタンパク質サンプルは不安定であり、結晶化実験を行うたびに精製する。具体的には、Ni アフィニティーカラムとヘパリンカラムを使用し、SDS-PAGE 上で単一のバンドのレベルまで純度を上げる。

(2) 結晶構造解析

これまでの結晶化スクリーニングの結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤として用いた条件で CO 非結合型 Ch-CooA の結晶が得られている。蒸気拡散法による結晶化条件の最適化を行う。最適な結晶が得られれば、直ちに X 線回折実験を行う。X 線回折データの測定はシンクロトロン放射光施設 SPring8 を利用する。X 線回折実験においては、顕微分光吸収スペクトルによって、ヘム鉄の酸化還元状態を確認する。X 線回折データ収集後、データ処理とモデル分子の構造精密化を進める。さらに、CO 結合型と DNA 結合型 Ch-CooA の結晶化も進める。

4. 研究成果

結晶化に用いた Ch-CooA タンパク質は His-tag 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、Ni-NTA カラムと Heparin カラムによって精製した。Ch-CooA は凝集しやすく高塩濃度下で安定であるため、1M NaCl 存在下で結晶化スクリーニングを行った。その結果、沈殿剤としてポリエチレングリコールを用いた条件で Ch-CooA タンパク質の結晶を得ることができた (図 1)。結晶は単斜晶系に属し空間群 $P2_1$ 、格子定数は $a = 61.8 \text{ \AA}$, $b = 94.7 \text{ \AA}$, $c = 92.8 \text{ \AA}$ and $\beta = 104.8^\circ$ であった。

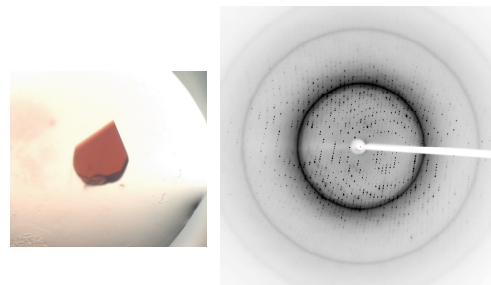


図 1 Ch-CooA の結晶と X 線回折写真

ヘム鉄の異常分散を利用して SAD 法による位相決定を行い、最終的に 2.2 \AA 分解能で結晶構造を決定することに成功した。

顕微分光吸収スペクトルを測定することによって 5 分以上 X 線を照射することによって、ヘム鉄が酸化型から還元型に変化することが確認されたが、ヘム鉄還元による全体構造への影響は少ないと考えられる。

明らかになった Ch-CooA の結晶構造は、図

2に示すように二量体を形成している。8本の β ストランドと3本の α ヘリックスを持つN末ドメインとヘリクスターンヘリックスを持つC末ドメインから成っている。N末ドメインには、ヘムが見つかっておりCOを結合するエフェクタードメインとして働くと考えられる。また、N末ドメインによって二量体形成されている。

CooAはこれまでにないユニークなヘムの配位構造をもっており、COの配位構造も注目されていたが、Ch-CooAでは、COの代わりにタンパク質精製中に使用したイミダゾールが配位したイミダゾール結合型の構造であることが分かった。

これまでに、光合成細菌 *R. rubrum* 由来 CooA (Rr-CooA) のCO非結合型の結晶構造が決定されている(図2)。同じ不活性型の構造であるが、本研究で決定したCh-CooAの結晶構造とはDNA結合ドメインの配置が大きく異なっている(図2)。Rr-CooAの結晶構造は非対称な二量体を形成している。Rr-CooAは、Ch-CooAと同様に、N末にヘムを結合したエフェクタードメイン、C末にDNA結合ドメインを持った構造をしているが、Rr-CooAの結晶構造ではDNA結合ドメインがまったく異なる配向をとっている。一方はCヘリックスからDヘリックスまで一本の伸びたヘリックスを形成しDNA結合ドメインがエフェクタードメインから離れた場所に配置している。もう一方は、CヘリックスとDヘリックスをつなぐヒンジ領域が折れ曲がっている。Ch-CooAでは、どちらもCヘリックスとDヘリックスをつなぐヒンジ領域が折れ曲がった対称な二量体を形成している。Rr-CooAでの非対称なドメイン配置は結晶形成時のアーティファクトである可能性が高い。

CooAと同様に、外部のシグナルを結合して転写制御を行うタンパク質として、cAMP receptor protein (CRP)がよく知られており、その活性型の結晶構造が報告されている。CRPもCh-CooAと同様に、N末にエフェクタードメイン、C末にDNA結合ドメインを持った二量体を形成する。活性型では、N末のエフェクタードメインにCAPのシグナル分子であるサイクリックAMPが結合しており、活性型としてDNAに結合できる。活性型CAPではDNA認識ヘリックスは、タンパク質の外側に飛び出し、DNAの大きな溝に入り込むのに適した配置をしている。一方Ch-CooAではDNA認識ヘリックスは内側のエフェクタードメインに向いており、二本鎖DNAと結合することはむずかしい。Ch-CooAもCAPと同様の活性型構造をとると考えられるが、そのためにはDNA結合ドメインがDヘリックスを中心に180度回転する必要がある。CヘリックスとDヘリックスをつなぐヒンジ領

域の構造変化が重要であるが、活性型CAP構造をもとにしたモデリングの結果、Dヘリックスを形成している水素結合のスイッチングが重要な役割を担っていると考えられる。

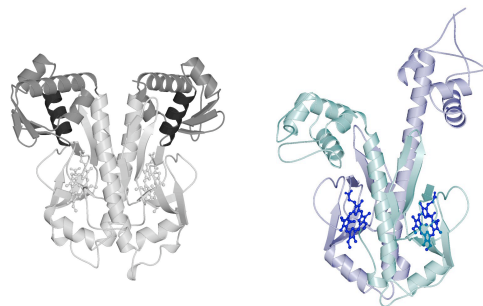


図2 Ch-CooA (右), Rr-CooA (左) の結晶構造

活性型であるCO結合型Ch-CooAのサンプル調整と結晶化を試みたが、現在のところ、X線結晶解析に適する結晶は得られていない。一酸化炭素(CO)の結合によるヘムの軸配位子の交換がDNA結合ドメインの構造変化へどのように伝わるのかを理解するために、活性型Ch-CooAの構造解析を行うことが今後の課題である。

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2件)

- ① 小森博文、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、Crystal structure of CO-sensing transcription activator CooA bound to exogenous ligand imidazole、Journal of Molecular Biology、367巻、864-871、(2007)、査読有
- ② 小森博文、里本健輔、上田康文、柴田直樹、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、Crystallization and preliminary X-ray analysis of CooA from *C. hydrogenoformans*、Acta Crystallogr. F、62巻、471-473、(2006)、査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 小森博文、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、X-ray crystallographic analysis of CooA homologue from *Carboxydothemus hydrogenoformans*、アジア結晶学会、(2006)

- ② 小森博文、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、Structure of CO-sensing transcription regulator CooA bound to exogenous ligand imidazole、東アジア生物物理学シンポジウム、(2006)
- ③ 小森博文、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、Activation mechanism of CO sensing transcription activator CooA、第 20 回国際生化学・分子生物学会議、(2006)
- ④ 小森博文、稲垣さや香、吉岡資郎、青野重利、樋口芳樹、一酸化炭素センサーとして働く転写制御因子 CooA の結晶構造、第 6 回日本蛋白質科学会年会、(2006)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 博文 (KOMORI HIROFUMI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：30382261

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ② 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

[学会発表] (計5件)

- ①
- ②
- ③

[図書] (計2件)

- ①
- ②

〔産業財産権〕

○出願状況（計□件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：