

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14384

研究課題名(和文) 微生物の新しい酸素センシングの分子機構：センサータンパク質の構造と機能を中心に

研究課題名(英文) Bacterial Oxygen Sensing Mechanism: Structure and Function Relationships of Sensor Proteins

研究代表者

北西 健一 (Kitanishi, Kenichi)

東京理科大学・理学部第一部化学科・助教

研究者番号：90815482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物から新たに同定した酸素センシングに関わると推定されるセンサータンパク質である、ヘムエリスリンをセンサードメインとして持つフォスフォジエステラーゼとヒスチジinkinaseの2つのセンサータンパク質の構造機能相関について研究を行った。その結果、微生物において、ヘムエリスリンドメインを持ったセンサータンパク質は、酸素を直接結合するのではなく、酸素によって引き起こされる酸化を感知するセンサー、つまりレドックス(酸化還元)センサーとして機能していることが、示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、微生物のセンサータンパク質におけるヘムエリスリンドメインの役割の一端を解明することができた。そして、微生物における新たな酸素センシングモデルを提唱することができた。また、本研究の対象であるセンサータイプのヘムエリスリンに加えて、病原菌由来の新たなセンサータンパク質の同定にもつながった。

研究成果の概要(英文)：Using bioinformatics analysis, two sensor proteins containing hemerythrin domain were identified. I characterized these sensor proteins using spectroscopic, crystallographic and biochemical techniques. Based on these data, I discuss the structure and function relationships of these sensor proteins associated with bacterial oxygen sensing.

研究分野：生化学

キーワード：酸素 酸化還元 鉄 ヘムエリスリン センサー c-di-GMP ヒスチジinkinase

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は外界の様々な環境変化を迅速に感知して、それに適応し、生存しなくてはならない。センサータンパク質は一般に微生物の重要な生理機能を制御している。これらのセンサータンパク質は、周囲の環境変化をシグナルとして感知するセンサードメインと、そのシグナルをアウトプットする機能ドメインから構成されるマルチドメインタンパク質である。

近年、微生物がヘムエリスリンを酸素(及び、酸化還元)を感知するためのセンサードメインとして利用していることが明らかとなってきた。ヘムエリスリンは、もともと海洋無脊椎動物の酸素運搬タンパク質として知られ、鉄二核中心と呼ばれる酸素結合部位を持つ。したがって、センサードメインに存在する鉄二核中心への酸素結合、及び酸化還元変化によって、機能ドメインにおける活性を制御している可能性が示唆された。

本研究では、バイオインフォマティクス解析によって、微生物のゲノムデータベースより、ヘムエリスリンドメインを持った新たなフォスフォジエステラーゼとヒスチジンキナーゼと推定される遺伝子を同定した。ドメイン構造より、これらのタンパク質をそれぞれ Bhr-HD-GYP と Bhr-HK と命名した。

2. 研究の目的

微生物のセンサータンパク質における、ヘムエリスリンドメインの役割について解明し、微生物における、新しい酸素センシングのメカニズムを提唱する。

3. 研究の方法

上記の 2 つのセンサータンパク質を大腸菌で大量発現させ、各種クロマトグラフィーで精製し、その構造機能相関について、調べた。

4. 研究成果

(1) Bhr-HD-GYP に関する研究

鉄酸化細菌 *Ferroplasma* sp. PN-J185 由来の Bhr-HD-GYP は、N 末端にヘムエリスリンドメイン、C 末端に HD-GYP ドメインを持っている。この HD-GYP ドメインは、c-di-GMP 分解酵素ドメインであることが知られている。c-di-GMP は、近年、微生物において注目されている重要なセカンโดメッセンジャーである。c-di-GMP 濃度が上昇すると、微生物はバイオフィルムを形成し、外界の環境変化に対して防御する。一方、c-di-GMP 濃度が減少すると、微生物はより活発に動くようになり、病原菌の感染などに関与していることが示唆されている。ICP 発光分光分析より、精製した Bhr-HD-GYP には、鉄が 4 当量含まれていることが示された。よって、ヘムエリスリンドメインに 2 当量、HD-GYP ドメインに 2 当量の鉄が含まれていると考えられる。この鉄は一方のドメインでは酸化還元のセンサーとして、もう一方のドメインでは触媒部位として働いていることが興味深い。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、溶液中におけるオリゴマー状態を解析したところ、二量体か三量体かはっきりしなかった。そのため、SEC-MALS 解析によって、絶対分子量を調べたところ、溶液中で二量体であることがはっきりと示された。Bhr-HD-GYP の紫外可視吸収スペクトルは、非ヘム鉄に特徴的なスペクトルが観測された。この酸化還元の相互変換は可逆的であった。海洋無脊椎動物由来のヘムエリスリンとは異なり、還元型に酸素は直接結合せず、自動酸化し、酸化型となった。また、酸化型は活性を示さなかったのに対し、還元型は c-di-GMP を pGpG へと加水分解することが明らかとなった。したがって、この Bhr-HD-GYP は、酸化還元に応答して、微生物内の -di-GMP 濃度を調整し、微生物の形態を制御するセンサータンパク質であることが示唆された。

本研究結果は、アメリカ化学会発行の生化学専門誌 *Biochemistry* に掲載された。また、本研究結果の一部が昭光サイエンス株式会社のアプリケーションノートとして、紹介されている (<https://www.shoko-sc.co.jp/application/2021/02/000558.html>)。

(2) Bhr-HK に関する研究

鉄酸化細菌 *Sideroxydans lithotrophicus* 由来の Bhr-HK は、N 末端にヘムエリスリンドメイン、C 末端にヒスチジンキナーゼドメインを持っている。ICP 発光分光分析より、精製した Bhr-HK には、鉄が 2 当量含まれていることが示された。この鉄二核中心の酸化還元相互変換は可逆的であった。酸化型が自己リン酸化活性を示したのに対して、還元型は不活性であった。自己リン酸化部位は His265 であった。

全長タンパク質の結晶化スクリーニングを行ったが、結晶は得られなかった。そこで、酸素(及び酸化還元)センシングに重要なヘムエリスリンドメインのみのタンパク質を発現、精製し、結晶化スクリーニングを行った。その結果、1.5 Å 分解能で酸化型の構造を決定することができた。全体構造は α ヘリックス 4 本の束の内側に酸素結合部位と考えられる鉄二核中心が存在していた。この鉄二核中心の一方の鉄には、塩化物イオンが配位していた。しかしながら、結晶化の再現性が良くないために、還元型の構造解析は行えなかった。

また、このヒスチジンキナーゼを含む二成分情報伝達系における、レスポンスレギュレーターは、N 末端にレシーバードメイン、C 末端に HD-GYP ドメインを持っている。リン酸化された Bhr-HK からレスポンスレギュレーターへのリン酸基転移反応を Phos-tag アクリルアミドゲルを用いて調べた。また、アセチルリン酸を用いて、レスポンスレギュレーターのレシーバードメインの Asp68 がリン酸化部位であることを確認した。したがって、この二成分情報伝達系は、外界環境の酸素濃度や酸化還元の変化(酸化ストレス)に応答して、微生物の形態を制御するシステムであることが予想される。これらのデータをまとめて、現在投稿準備中である。

以上の結果より、本研究成果をまとめると、微生物において、ヘムエリスリンドメインを持ったセンサータンパク質は、酸素を直接結合するのではなく、酸素によって引き起こされる酸化を感知するセンサー、つまりレドックス(酸化還元)センサーとして機能していることが、示唆された。本研究によって、微生物のセンサータンパク質におけるヘムエリスリンドメインの役割の一端を解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenichi Kitanishi, Jotaro Igarashi, Arika Matsuoka, Masaki Unno	4. 巻 59
2. 論文標題 Identification and Characterization of a Redox Sensor Phosphodiesterase from <i>Ferroplasma</i> sp. PN-J185 Containing Bacterial Hemerythrin and HD-GYP Domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 983-991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南本晃希、北西健一、海野昌喜
2. 発表標題 緑膿菌由来の酸素結合タンパク質マイクロヘムエリスリンの構造解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北西健一、味澤梨香、下仲基之
2. 発表標題 病原菌由来の新しいガスセンサータンパク質の同定
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Kitanishi, Masaki Unno
2. 発表標題 Characterization of Oxygen and Redox Sensing Histidine Kinases
3. 学会等名 XXth International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京理科大学
https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/achievement.php?7149
昭光サイエンス株式会社アプリケーションノート
<https://www.shoko-sc.co.jp/application/2021/02/000558.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------