

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570128
 研究課題名（和文）酸化ストレスをセンサーとする鉄イオウクラスターを持つ転写因子の制御機構の解明
 研究課題名（英文）Mechanism in Regulation of Transcription Factor containing Fe-S Clusters Sensing Oxidative Stress
 研究代表者
 小林 一雄 (KOBAYASHI KAZUO)
 大阪大学産業科学研究所助教
 研究者番号：30116032

研究成果の概要：

本研究ではバクテリアにおけるSoxRの多様な生理機能を分子レベルで解明することを目的として、構造生物学的手法による研究として、X線構造解析により大腸菌SoxRの酸化ストレスを感知する機構や酸化還元によりおこる構造変化と、機能発現を原子レベルで解明した。SoxR-DNAの複合体では2.8 Å、SoxRでは3.2 Åの分解能の結果が得られた。全体の構造はバクテリアの水銀解毒に働く転写因子であるMerR familyとよく似た構造を示し、センサー部位である鉄イオウクラスタードメイン、DNA結合ドメイン、ダイマー生成ドメインから成ることが分かった。DNAが結合すると、DNA結合ドメイン約9°、鉄イオウクラスターが約6°外側に傾き、全体として大きく構造変化した。酸化ストレスセンサー部位である鉄イオウクラスターは完全に溶媒に露出し非対称の環境にあり、もう一方のサブユニットと相互作用し安定化している。この非対称の環境の酸化還元によりタンパク質の構造変化とプロモーターとの相互作用が変化すると考えられる。SoxRに結合したDNAはワトソン-クリック相互作用を保持したまま折れ曲がり、20塩基の長さが1塩基分だけ短くなり、その結果転写が活性化される。以上のX線構造解析により大腸菌SoxRの酸化ストレスを感知する機構および酸化還元によりおこる構造変化を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遺伝子、ストレス、放射線、X線、粒子線、生物物理、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

大腸菌には SoxR とよばれる鉄イオウクラスターを持つユニークな性質を持つ転写因子が存在する。この鉄イオウクラスター部位

はセンサーとして働き、スーパーオキシド(O₂⁻)を感知して、活性型に変換し、SoxS と呼ばれる別の転写因子を合成する。この SoxS が転写因子として働き、O₂分解酵素である

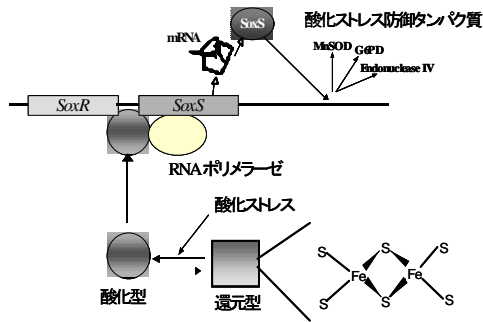


図1 大腸菌 SoxR の転写制御

SOD や酸化損傷した DNA を修復する酵素など一連の酸化ストレス防御蛋白質の合成が誘導されることが報告されている(図 1)。大腸菌の SoxR はこのように生物の酸化ストレス応答の一戦略として位置づけられている。

また、そのタンパク質の構造から SoxR は MerR family に属している。MerR family とは、バクテリアにおける外部からの毒物(水銀、亜鉛等の重金属イオンや薬物、抗生物質等)に応答し、一連の解毒過程に働く酵素が誘導するシステムに働く転写因子である。これら family には共通する活性化機構が存在することが分子生物学的手法により提唱された。すなわち、特異的な小分子の結合により、二重鎖 DNA が局部的に相補的塩基対が解離することにより、RNA ポリメラーゼを認識する2つの領域間の距離が縮まり、効率的な転写に適した構造になる。この説は薬物応答転写因子である BmrR の X 線構造解析により確かめられた。それに対して、申請者らは、大腸菌 SoxR-DNA 複合体の X 線構造解析の結晶化に成功した。2.8 Å 分解能を超える反射が確認でき現在解析中である。これにより、その詳細な原子レベルでの発現機構の議論が可能になった。

一方、同様な鉄イオウクラスターを持つ SoxR が種々のバクテリアにも存在する。しかしながら、大腸菌と異なり、酸化ストレス防御系に働くもう1つの転写因子 SoxS が存在せず、申請者らはこの点に着目し、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) や *Vibrio cholera* における SoxR がどのような役割を果たしているかを明らかにするために、*P.aeruginosa* および *Vibrio cholera* の SoxR を大量発現、精製を行い、その機能について調べた。その結果、以下の興味ある知見が得られた。

- 1) 大腸菌で見られた SoxR が酸化ストレス防御系に働かない
- 2) 大腸菌で見られた時と同様に O_2 に応答し、鉄イオウクラスターの酸化還元により転写制御されている。
- 3) 鉄イオウクラスターの分光学的性質や酸化還元電位は大腸菌と全く変わらない。

4) *soxR* の上流に大腸菌 SoxR タンパク質の結合領域と相同の配列と未知のタンパク質の ORF が存在する。また、同様の配列が他のバクテリアにも見られるが、この ORF のタンパク質は多様である。

この研究が口火となって SoxR が広くバクテリア界に存在し、外からのストレス応答の鍵のタンパク質である可能性が示された。

2. 研究の目的

SoxR は多くのバクテリアに存在し、鉄イオウクラスターをセンサー部位に持ち、その酸化還元により転写制御され、多様な機能制御を行っている。このような転写因子の鉄イオウクラスターの酸化還元によりどのようなメカニズムで分子全体へ連動して、DNA への結合や転写の活性化や抑制を実現しているかその発現機構を明らかにするために、X 線構造解析を行った。また、その得られた構造に基づいて SoxR のバクテリアの多様な生理機能の制御における鉄イオウクラスターの役割を解明する

3. 研究の方法

本研究ではバクテリアにおける SoxR の多様な生理機能を分子レベルで解明することを目的として、構造生物学的手法による研究として、X 線構造解析により大腸菌 SoxR の O_2 を感知するメカニズムや酸化還元によりおこる構造変化と、機能発現を原子レベルで解明し、これら転写因子の共通するメカニズムを明らかにした。また生化学的手法による研究として、*Paeruginosa* の SoxR に依存して転写制御するタンパク質の発現について検討した。

4. 研究成果

本研究ではバクテリアにおける SoxR の多様な生理機能を分子レベルで解明することを目的として、構造生物学的手法による研究として、X 線構造解析により大腸菌 SoxR の酸化ストレスを感知する機構や酸化還元によりおこる構造変化と、機能発現を原子レベルで解明した。SoxR-DNA の複合体では 2.8 Å、SoxR では 3.2 Å の分解能の結果が得られた。以下その結果を要約する。

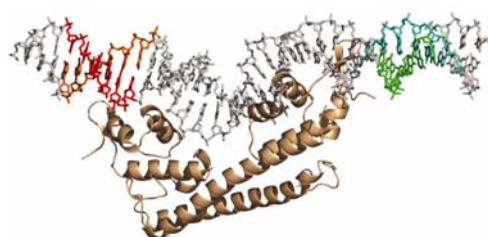
全体の構造はバクテリアの水銀解毒に働く



図2 DNA-SoxR の全体構造

転写因子であるMerR familyとよく似た構造を示し、センサー部位である鉄イオウクラスタードメイン、DNA結合ドメイン、ダイマー生成ドメインから成ることが分かった(図2)。他のMerR familyと異なる点は、鉄イオウクラスタードメインは直接DNA結合ドメインと相互作用しており、特にArg55およびTrp91はSoxRの鉄イオウクラスターと相互作用していることが分かった。

DNAが結合すると、DNA結合ドメイン約9°、鉄イオウクラスターが約6°外側に傾き、全体として大きく構造変化した。またSoxRに結合したDNAはワトソンクリック相互作用を保持したまま、20塩基の長さが3塩基分折れ曲がり、転写が活性化するのに適した17塩基のスペースを持つ配置となる(図3)。



SoxR + 19-bp spacer

図3 SoxR 結合による DNA 構造変化

酸化ストレスセンサー部位である鉄イオウクラスターは完全に溶媒に露出し、他の鉄イオウクラスター蛋白質であるフェレドキシンとは大きく異なり、また鉄イオウクラスターの一方はpositiveな電荷を持つ主鎖の3つのアミド基と他方はnegativeな電荷であるカルボニル酸素と相互作用し、非対称の環境にある。もう一方のサブユニットと相互作用し安定化している。鉄イオウクラスターの還元によりnegativeに荷電したイオウとの相互作用により、SoxRのC末領域が大きく構造変化し、プロモーターとの相互作用が変化すると考えられる。

以上のX線構造解析により大腸菌 SoxR の酸化ストレスを感知する機構および酸化還元によりおこる構造変化を解明した。

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 11 件)

- 1) K. Kobayashi, S. Tagawa, and T. Mogi, Electron transfer Processes in Subunit I Mutants of Cytochrome bo Quinol Oxidase from *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press 査読 有
- 2) K. Kobayashi, S. Tagawa, and T. Mogi,

Intramolecular electron transfer processes in Cu_B-deficient cytochrome bo studied by pulse radiolysis, *J. Biochem.* 145, 685-691 (2009) 査読 有

- 3) G. Mustafa, Y. Ichikawa, K. Kobayashi, C. T. Migita, S. Tagawa, and M. Yamada, Function of a bound ubiquinone in *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase, *BioFactors* 32, 23-29 (2008)
- 4) S. Suzuki, T. Maetani, M. Nojiri, K. Yamaguchi, K. Kobayashi, and S. Tagawa, Pulse Radiolysis of Hexameric Nitrite Reductase Containing the two Type 1 Cu Sites in a Monomer, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 81, 1525-1527 (2008) 査読 有
- 5) R. Yamagami, K. Kobayashi, and S. Tagawa, Formation of spectral intermediate G-C and A-T anion complex in duplex DNA studied by pulse radiolysis, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14772-14777 (2008) 査読 有
- 6) G. Mustafa, C. T. Migita, Y. Ishikawa, K. Kobayashi, S. Tagawa, and M. Yamada, Menaquinone as well as ubiquinone as a bound quinone crucial for catalytic activity and intramolecular electron transfer in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 283, 28169-28175 (2008) 査読 有
- 7) T. Ito, S. Morimoto, S. Fujita, K. Kobayashi, S. Tagawa, and S. Nishimoto, Carbon- and nitrogen-centered radicals produced from L-lysine by radiation-induced oxidation: *Chem. Phys. Lett.* 462, 116-120 (2008) 査読 有
- 8) K. Kobayashi, R. Yamagami, and S. Tagawa, Effect of Base Sequence and Deprotonation of Guanine Cation Radical in DNA, *J. Phys. Chem. B* 112, 10752-10757 (2008) 査読 有
- 9) G. Mustafa, Y. Ishikawa, K. Kobayashi, C. T. Migita, MD Elias, S. Nakamura, S. Tagawa, and M. Yamada, Amino Acid Residues Interacting with Both the Bound Quinone and Coenzyme, Pyrroloquinoline Quinone, in *Escherichia coli* Membrane-bound Glucose Dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 283, 22215-22221 (2008) 査読 有
- 10) S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, and K. Miki, Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4121-4126 (2008) 査読 有
- 11) F. Yamakura, K. Kobayashi, S. Furukawa, and Y. Suzuki, In vitro preparation of iron-substituted human manganese superoxide dismutase: Possible toxic properties for mitochondria, *Free Radical Biology and Medicine* 43, 423-430 (2007) 査読 有

[学会発表] (計 4 件)

- 1) R. Yamagami, K. Kobayashi, and S. Tagawa Dynamics of Excess Excess Electron in Duplex DNA Studied by Pulse Radiolysis,

July 6-11, 2008, Waterville, USA

- 2) K. Kobayashi, R. Yamagami, and S. Tagawa, Effect of Base Sequence and Deprtonation of Guanine Cation Radical in DNA, Gordon Conference, July 6-11, 2008, Waterville, USA
- 3) K. Kobayashi, R. Yamagami, and S. Tagawa、Dynamics of Guanine Radical Cations in Duplex DNA Studied by Pulse Radiolysis, 10th International Workshop Radiation Damage to DNA, June 8-12, 2008, Urabandai Japan
- 4) R. Yamagami, K. Kobayashi, and S. Tagawa, Dynamics of Excess Electron in Duplex DNA Studied by Pulse Radiolysis, 10th International Workshop Radiation Damage to DNA, June 8-12, 2008, Urabandai Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 一雄 (KOBAYASHI KAZUO)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30116032

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者