

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570143
 研究課題名（和文） ジフテリア菌ヘムセンサーのリガンド受容とリン酸化シグナリング
 研究課題名（英文） Heme-dependent phosphorylation of ChrSA from
 Corynebacterium diphtheriae.
 研究代表者
 中村 寛夫（NAKAMURA HIROO）
 独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・専任研究員
 研究者番号：80270594

研究成果の概要：ジフテリア病原菌が宿主であるヒト血液のヘム濃度を感知するためのセンサーの候補遺伝子と考えられているのが **chrSA** である。本研究では **chrS** 遺伝子がコードする膜タンパク質 **ChrS** を組み換え大腸菌細胞膜から界面活性剤で可溶化、精製し、脂質膜リポソームに再構成した。再構成した **ChrS** タンパク質はヘム依存的に自己リン酸化されることが示され、このタンパク質がヘムを感知するセンサー機能を持つことを世界で初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

鉄は生物にとって必須の元素であり、病原菌は主にヒトをはじめとする宿主の血液に含まれるヘモグロビンのヘム鉄を摂取している。病原菌の鉄利用にはヘム輸送系のほかに、ヘム感知機構が重要な役割を演じているが、ジフテリア菌でのみヘムセンサーの存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究ではヘムセンサーのタンパク質としての実体を明らかにするとともに、センサー機能としてのヘム受容のメカニズムを分

子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

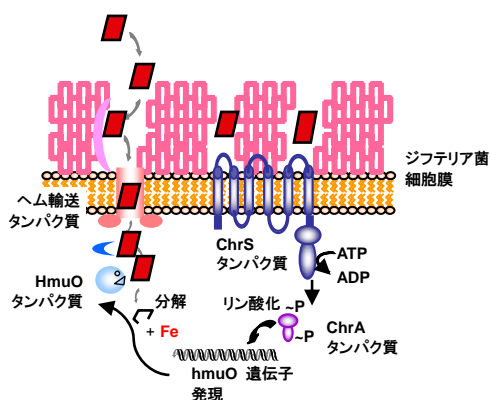
ジフテリア菌由来のヘムセンサー候補遺伝子 **chrS** を大腸菌で発現させる組み換え遺伝子発現系を構築した。つぎに、その組み換え遺伝子をもつ大腸菌の細胞膜から **ChrS** タンパク質を界面活性剤で可溶化、精製した。そして、精製した **ChrS** タンパク質を再び、リン脂質からなる人工的な脂質膜（リポソーム）に埋め込んだ（再構成）。このようにして再構成した **ChrS** タンパク質のヘムセンサーの機能をヘミン（ヘム）や他の金属ポルフ

イリンを用いて、結合や自己リン酸化活性を指標にして、試験管内で調べた。

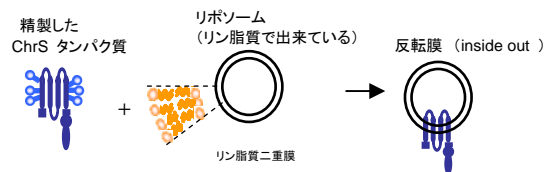
4. 研究成果

大腸菌細胞膜の ChrS はヘム依存的にリン酸化したが、可溶化、精製した ChrS はリン酸化活性がなかった。しかし、リン脂質リポソームに再構成した ChrS はヘム依存的に自己リン酸化した。また、他の金属ポルフィリンでは効果がなかった。以上の結果から、ChrS がヘムを特異的に認識するセンサーであることを世界で初めて明らかにした。

細菌のヘムセンサーと鉄利用



ChrS タンパク質をリポソームに再構成する



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)

- (1) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Yamada, S.,

Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., and Koike, T. (2008)

Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE.

Proteomics 8, 2994-3003. 査読有

- (2) Takahashi, R., Okajima, K., Suzuki, H., Nakamura, H., Ikeuchi, M., and Noguchi, T. (2007)

FTIR study on the hydrogen bond structure of a key tyrosine residue in the flavin-binding blue light sensor TePixD from *Thermosynechococcus elongatus*.

Biochemistry 46, 6459-6467. 査読有

- (3) Yamada, S., Nakamura, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., and Shiro, Y. (2007)

Separation of a phosphorylated-His protein using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem. 360, 160-162.

査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

- (1) 中村 寛夫: “ジフテリア菌のヘムセンシングの分子基盤” 分子研研究会ヘム代謝に関わる酵素の分子科学 岡崎 日本 3月 (2007)

- (2) 小林 美紀, 山田 斉爾, 杉本 宏, 中村

寛夫, 城 宜嗣: “ヒスチジンキナーゼThkA触媒ドメイン-ヌクレオチド結合型の結晶構造解析”, 第7回日本蛋白質科学会年会 仙台 日本 5月 (2007)

(3)城 宜嗣, 山田 齊爾, 菊地 晶裕, 城 宜嗣, 山田 齊爾, 菊地 晶裕, 中村 寛夫: “二成分系酸素センサー蛋白質の分子内, 分子間情報伝達機構” 第7回日本蛋白質科学会年会 仙台 日本 5月 (2007)

(4)中村 寛夫: “ジフテリア菌細胞膜にあるヘムセンサータンパク質の機能的再構成” 第34回 生体分子科学討論会 仙台 日本 6月 (2007)

(5)小林 美紀, 山田 齊爾, 杉本 宏, 中村 寛夫, 城 宜嗣: “ヒスチジンキナーゼThkAにおけるATP結合サイトの構造変化”, 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会 横浜 日本 12月 (2007)

(6)小林 ゆき野, 齊藤正男, 城 宜嗣, 中村 寛夫: “ジフテリア菌のヘム感知系レスポンスレギュレーターのリン酸基受容とDNA結合”, 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会 横浜 日本 12月 (2007)

(7)駒形文子, 齊藤正男, 城 宜嗣, 中村 寛夫: “ジフテリア菌ヘムセンサーキナーゼのリポソームへの機能的再構成”, 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会 横浜 日本 12月 (2007)

(8)伊藤陽子, 中村 寛夫: “リポソームに機能的再構成したジフテリア菌ヘムセンサーキナーゼChrSのヘム結合と自己リン酸化”, 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸 日本 12月 (2008) (口頭、ポスター)

(9)中村 寛夫: “ジフテリア病原菌の細胞膜にあるヘムセンサーと鉄利用”, 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸 日本 12月 (2008) (シンポジウム細菌情報伝達ネットワークとドラッグターゲットにて口頭)

(10)Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita, Mamoru Matsubara, Seiji Yamada, Hiro Nakamura, Yoshitsugu Shiro, Yuri Aoki, Kouki Okita. ‘Separation of phosphoprotein isotype with the same phosphate stoichiometry using phosphate affinity SDS-PAGE’ 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸 日本 12月 (2008) (口頭、ポスター)

(11)Yamada S, Kobayashi M, Sugimoto H, Nakamura H, Shiro Y: “Crystal structure of histidine kinase and response regulator complex: insight into regulatory mechanism of oxygen sensor FixL”, 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry Vienna Austria 7 2007

(12)Nakamura H: “Characterization of a membrane bound heme sensor kinase, ChrS, from *Corynebacterium diphtheriae*”, *Gordon Research Conferences on Sensory*

Transduction in Microorganisms, Ventura,
USA, Jan. 13-18 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛夫 (NAKAMURA HIROO)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学

研究室・専任研究員

研究者番号：80270594