

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570153

研究課題名（和文） ジフテリア菌ヘムセンサーのヘム受容の分子機序

研究課題名（英文） Heme sensing of the ChrS histidine kinase 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（和文）：

ジフテリア病原菌がもつ chrS 遺伝子が大腸菌で発現させ、その細胞膜から ChrS タンパク質を可溶化、精製した。次に、組み換え ChrS を人工リン脂質膜であるリポソームとナノディスクに再構成した。再構成 ChrS はヘム依存的に自己リン酸化活性を亢進することを見出し、細菌がもつヘムセンサーの機能を世界で初めて直接的に立証した。

研究成果の概要（英文）：

It has been hitherto believed that *Corynebacterium diphtheriae* conducts the sensor kinase, ChrS, and the response regulator, ChrA, of a two-component signal transduction system to utilize host heme iron. Although ChrS is predicted to encode a heme sensor, the sensing mechanism remains uncharacterized. ChrS expressed in *Escherichia coli* membranes was solubilized and purified in the presence of a non-ionic detergent. ChrS protein incorporated into proteoliposomes and nanodiscs catalyzed heme-dependent autophosphorylation by ATP. Other metalloporphyrins and iron did not stimulate kinase activity, suggesting that ChrS is a specific heme sensor. This is the first functional reconstitution of a bacterial heme-sensing protein.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,420,000 |
| | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：病原菌、ヘム、センサー、膜タンパク質、情報伝達系、リポソーム、ナノディスク、リン酸化

に存在しており、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で全膜タンパク質の 10-15% を占める主要成分となっていることが確認された。ChrS タンパク質は非イオン性界面活性剤であるデシルマルトシド、ドデシルマルトシドでは可溶化できたが、オクチルグルコシドでは不溶性画分に分画された。可溶化した ChrS タンパク質はヒスタグ特異的吸着カラム樹脂を用いて高純度に精製された。ChrA タンパク質は水溶性なので界面活性剤を用いずに、細胞質画分から精製した。

ChrS は既知の情報伝達系タンパク質のアミノ酸配列との比較により、ヒスチジンキナーゼであることが推定されていたが、界面活性剤を含む精製標品には ATP を基質とした自己リン酸化活性はなかった。

【人工リン脂質膜に再構成した ChrS のへむに依存した自己リン酸化】

ChrS は本来細胞膜に存在し、へむを感知し自己リン酸化するセンサーである推定される。界面活性剤は膜タンパク質からリン脂質を剥離させるとともに、タンパク質自身にも結合するため、ChrS のリン酸化能を阻害したと考えた。そこで、試験管内で大腸菌リン脂質を用いた人工リン脂質膜であるリポソーム、ナノディスクに ChrS を埋め戻した。これらの再構成した ChrS はへむに依存した自己リン酸化活性を有していた (図 4)。この自己リン酸化の亢進はへむに特有であり、コバルトポルフィリンなど他の金属ポルフィリンでは効果がなかった。また、ChrS から ChrA へのへむ依存的リン酸基転移反応も確認された。これらの結果は ChrS がへむを感知するリン酸化酵素であることを直接証明するものである。

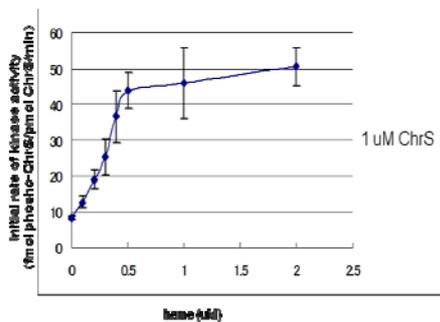


図4. ナノディスクに再構成したChrSのへむに依存した自己リン酸化活性

【大腸菌 K-12 株への ChrS-ChrA によるへむ感知の機能賦与】

ChrS-ChrA のへむ感知を細胞レベルで評価

するために外膜へむチャンネルである ChuA、レポーターである hmuO-lacZ、ChrS-ChrA の発現プラスミドを作製し、大腸菌 K-12 株に移入した。培地にへむを加えた場合、3 つのプラスミドを持つ菌体のみがベータガラクトシダーゼ活性の亢進が認められた (図 5)。

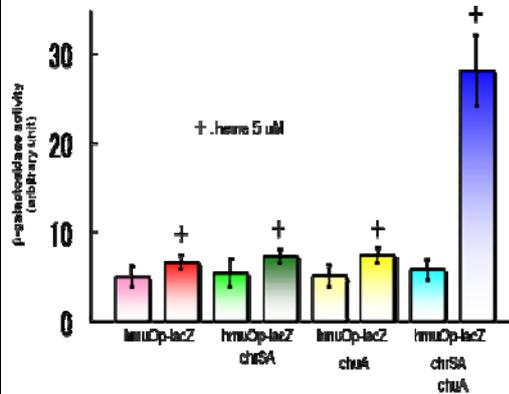


図5. 大腸菌K-12株細胞にChrSAによるへむ感知を賦与する

これらの結果は増殖中の大腸菌が外界のへむを感知し、細胞内リン酸化情報伝達によって遺伝子発現を行っていることを示している。したがって、細胞レベルでの ChrS-ChrA のへむ感知の追跡を容易とし、これらのタンパク質の変異体の機能解析を可能とする。

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 2 件)

Yamada, S., Sugimoto, H., Kobayashi, M., Ohno, A., Nakamura, H., and Shiro, Y. (2009) Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure* 17, 1333-1344. (査読あり)

Ito, Y., Nakagawa, S., Komagata, A., Ikeda-Saito, M., Shiro, Y., and Nakamura, H. (2009) Heme-dependent autophosphorylation of a heme sensor kinase, ChrS, from *Corynebacterium diphtheriae* reconstituted in proteoliposomes. *FEBS Lett.* 583, 2244-2248. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

①伊藤陽子、當舎武彦、中村寛夫、城 宜嗣 “ナノディスクを用いた病原菌の生体鉄感知システムの解析” 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、日本、2010 年、12 月 4-10 日 (口頭、ポスター 10 日発表)

② Nakamura H.: “Heme signal transduction system, ChrS-ChrA, in *Corynebacterium diphtheriae*: Mutational analysis using the hmuO reporter assay in *E. coli*.”, Gordon Research Conferences on Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura, California, USA, Jan.24-29 (2010)(ポスター発表)

③ 益田準一、大柳明日香、城 宜嗣、中村寛夫 “ジフテリア菌ヘムセンシングの大腸菌での再構築と機能変異体スクリーニング” 第32回日本分子生物学会年会、横浜、日本、2009年、12月9-12日(ポスター12日発表)

④ 伊藤陽子、中村寛夫、城 宜嗣 “脂質ナノディスクに再構成したジフテリア菌 ChrS のヘム結合とリン酸基転移” 第82回日本生化学会大会、神戸、日本、2009年、10月21-24日(口頭、ポスター22日発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛夫 (NAKAMURA HIRO)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし