

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：63903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20750

研究課題名（和文）酸素ガスをシグナル分子とする走化性シグナル伝達系の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis of the chemotaxis regulatory system using oxygen gas as a signaling molecule

研究代表者

東田 怜 (Tohda, Rei)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・IMSフェロー

研究者番号：10908122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：HemATは酸素をシグナル分子として認識するヘム含有シグナルトランスデューサータンパク質である。HemATはCheA、CheWと複合体を形成することで、バクテリアの走化性を制御している。この時、酸素をどのようにしてセンシングし、シグナル伝達を行っているのかその詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、HemATセンサードメインのシグナルオン状態（酸素結合型）とシグナルオフ状態（酸素非結合型）構造を決定した。得られた構造を基に、シグナル伝達に寄与していると示唆される残基を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリアは、周辺に存在する誘引物質や忌避物質の濃度勾配に応じてその運動性を制御している。本研究課題により、代表的な生体内シグナル伝達システムの1つである走化性制御系の詳細な構造機能相関が明らかになることによって、生物が持つ外部環境に対する応答機能の理解に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：HemAT is a heme-containing signal transducer protein that recognizes oxygen molecules as signal molecules. HemAT regulates bacterial chemotaxis by forming a complex with CheA and CheW. However, the mechanisms of how oxygen is sensed and signaled during this process are not clear yet.

In this study, signal-on (oxygen-bound form) and signal-off (oxygen-unbound form) structures of the HemAT sensor domain were determined. By comparing these structures, I found that some amino acid residues around the heme are responsible for signal transduction.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 センサータンパク質 生命金属

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気体分子は生体内でシグナル分子として機能し、細胞の走化性をはじめとする生理機能制御を担っていることが知られている。シグナル分子が機能するためには、対象となる分子を特異的に認識することができるレセプタータンパク質 (センサータンパク質) が不可欠となる。気体分子がシグナル分子として機能する代表例として、バクテリアの酸素に対する走化性制御系が挙げられる。この制御系では、ヘム含有シグナルトランスデューサータンパク質 HemAT (Heme Aerotaxis Transducer protein) が酸素センサータンパク質として機能している。HemAT は主に 2 つのドメイン (N 末端側に酸素運搬・貯蔵タンパク質にみられるグロビン構造と類似性のあるセンサードメイン、C 末端側に走化性レセプター MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein) と類似性のあるシグナリングドメイン) から構成されている。さらに走化性シグナル伝達に寄与している CheA, CheW と三者複合体を形成することによって、走化性における制御を担っている。

この時、HemAT が酸素をセンシングするメカニズムや、HemAT 分子内や HemAT/CheA/CheW の各分子間におけるシグナル伝達のメカニズムは明らかとなっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、酸素センシングを初発反応とする走化性シグナル伝達反応の分子機構解明を目的とした。本研究目的を達成するため、HemAT および HemAT/CheA/CheW 複合体を対象とし、シグナルオン状態 (酸素結合型) およびシグナルオフ状態 (デオキシ型) の構造解析を行う。得られた構造情報を基盤として、HemAT による酸素センシング、および HemAT/CheA/CheW 複合体における走化性シグナル伝達の詳細な分子機構の解明を行う。

### 3. 研究の方法

本研究は大きく 3 段階に分けて実施した。

(1) 大量発現系・精製法の構築: 本研究では、タンパク質自体の熱安定性が高く結晶化に適していると考えられる好熱性細菌由来 HemAT や CheA, CheW を研究対象とした。

タンパク質の結晶化を行うためには、高純度かつ大量に目的タンパク質を精製する必要がある。そのため目的タンパク質の発現系と精製法の構築を行う。

(2) 結晶構造解析: HemAT, CheA, CheW、および HemAT/CheA/CheW 複合体の結晶化を行う。得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折実験を行い、回折データを収集し、それぞれの構造解析を行う。

(3) クライオ電子顕微鏡測定: シグナルオン状態とシグナルオフ状態にした HemAT を使って HemAT/CheA/CheW 複合体を調製する。それぞれについてクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行い、HemAT および HemAT/CheA/CheW 複合体の構造を決定する。

### 4. 研究成果

(1) 先行研究では、HemAT 全長型と HemAT (センサードメイン) において精製過程での夾雑タンパク質が十分に除去できない問題が生じていた。そこで本研究では、精製法の改良を行い、純度の高いサンプルを得ることに成功した。

(2) HemAT 全長型の結晶化を行ったところ、結晶と思われるものを得ることができた。しかし、回折データを得ることはできなかった。そこで、HemAT センサードメインの結晶構造解析を行った。HemAT (センサードメイン) のシグナルオン状態 (酸素化型) とシグナルオフ状態 (還元型) の結晶化を行ったところ、それぞれ結晶を得ることに成功した。これらの結晶を大型放射光施設 SPring-8 で回折実験を行った結果、それぞれ 2.09 Å、2.36 Å 分解能の結晶構造を得ることに成功した (図 1)。酸素化型の結晶の顕微分光においては、酸素化型特有のスペクトルを示しているが、結晶構造中では酸素分子の電子密度が不鮮明であった。これは、これは X 線損傷により、酸素化型の一部が酸化型に変化したことによるものだと考えている。(本測定は理化学研究所 河野能顕博士のご協力のもと行った結果である。)

さらに CheW についても結晶化に成功し、回折実験を行ったところ 2.8 Å 分解能のデータを得ることに成功した。しかし構造解析を行う中で、一部モデルを置くことができない領域があった。CheA は全長型、一部ドメイン欠損型を作成しそれぞれ精製することには成功した。全長型は結晶を得ることはできず、一部ドメイン欠損型については一度結晶を得ることはできたがその後再現性を得られなくなった。

最後に、HemAT/CheA/CheW 三者複合体の結晶化も試みた。しかし、現時点では結晶を得ることはできなかった。

(3) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を利用した HemAT/CheA/CheW 三者複合体の構造解析に向けて、グリッドへのサンプルロードの条件検討を行った。その結果、サンプルの粒子像を観測可能なグリッド調製条件を見出し、低分解能ではあるが HemAT/CheA/CheW 三者複合体のクーロンマップを得ることができた。

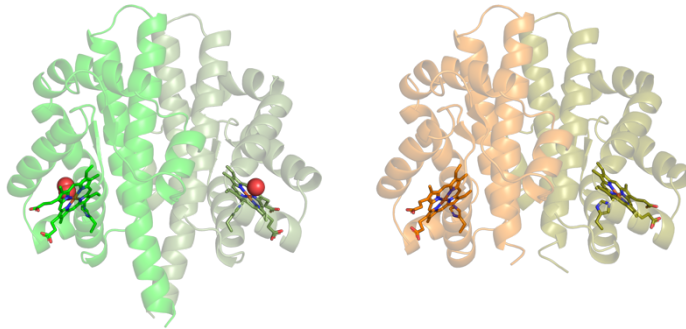


図1 HemAT（センサードメイン）のシグナルオン状態（酸化型）（左）とシグナルオフ状態（還元型）（右）のリボンモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rei Tohda, Norifumi Muraki, Takeshi Yokoyama, Shigetoshi Aono
2. 発表標題 Structural analysis of a heme-containing oxygen sensor protein, HemAT
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Tohda, Norifumi Muraki, Takeshi Yokoyama, Shigetoshi Aono
2. 発表標題 構造を基盤とした酸素センサータンパク質HemATのセンシング・シグナル伝達機構解明
3. 学会等名 第5回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	青野 重利  (Aono Shigetoshi)		
研究協力者	村木 則文  (Muraki Norifumi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	横山 武司  (Yokoyama Takeshi)		

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