

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 6 月 1 日現在

機関番号：82648

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870043

研究課題名（和文）ヘム含有 PAS ドメインをセンサーとする新規なシグナル伝達タンパク質の構造と機能

研究課題名（英文）Structure and function of a novel signal transducer protein that employs heme-PAS domain as a sensor

研究代表者

澤井 仁美 (SAWAI HITOMI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：50584851

研究成果の概要（和文）：酸素呼吸を行う細菌が、生育に適した酸素濃度の環境へ移動する性質（酸素に対する走化性）を制御する新規なシグナル伝達タンパク質 Aer2 の構造機能研究を行った。分光測定や変異体解析により、Aer2 はヘム鉄を酸素分子のセンサーとして用いる新規な酸素センサータンパク質であることを明らかにした。さらに X 線結晶構造解析や共鳴ラマン分光法により、Aer2 における酸素分子の識別感知機構や分子内シグナル伝達機構を検討した。

研究成果の概要（英文）：I studied the structure and function of Aer2, a novel signal transducer protein for bacterial aerotaxis control. Spectroscopy and site-directed mutagenesis revealed that Aer2 was a new type of oxygen sensor protein employing a heme as a sensor. To elucidate the molecular mechanisms of oxygen sensing and signal transduction, I characterized Aer2 by X-ray crystallography and resonance Raman spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：ヘムタンパク質・センサータンパク質・シグナル伝達タンパク質・走化性制御・ヘム含有 PAS ドメイン・共鳴ラマン分光法・X 線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、酸素・一酸化炭素・一酸化窒素などの気体分子のセンサーとして機能するヘムタンパク質の存在が報告され、ヘムタンパク質の新規な機能、ならびに気体分子の新規な生理機能として大きな注目を集めている。ヘム含有型センサータンパク質による生理的エフェクター分子の選択的センシングや分子内・分子間シグナル伝達の制御においては、ヘムおよびその近傍にあるア

ミノ酸側鎖がエフェクター分子を選択的に認識し、エフェクター分子が結合した場合にのみ特異的な構造変化が生じなければならない。しかし、ヘム含有型センサータンパク質によるエフェクター分子の識別感知や、それに続くシグナル伝達の分子機構については、未解明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

緑膿菌の酸素に対する走化性制御におい

て、ヘム含有 PAS ドメインをセンサーとして用いる新規なシグナル伝達タンパク質 Aer2 を研究対象として、を目指した。

3. 研究の方法

(1) 組換え Aer2 の調製とヘム近傍構造解析

大腸菌による組換え Aer2 の大量発現法と精製法を確立した。次に、Aer2 の生理的エフェクター分子である酸素分子がヘム鉄に結合した酸素化型と、酸素分子以外のリガンドが結合した状態の Aer2 について各種分光測定を行い、各状態でのヘム近傍構造を解析した。さらに、これまでに報告されている PAS ドメインの構造を参考して、Aer2 のヘムの近傍に位置すると推定されるアミノ酸残基に系統的な変異を導入した変異体についても、同様の解析を行った。これらの結果より、Aer2 による酸素分子の選択的センシングならびにシグナル伝達に重要な役割を果たすアミノ酸残基の同定を行った。そして、リガンド結合にともなうヘムの近傍構造変化、およびヘムに結合したリガンドと周辺アミノ酸残基との相互作用について考察した。

(2) Aer2 の立体構造決定と酸素分子の識別感知機構の検討

全長の Aer2 では、結晶化に適した試料調製が困難であったため、シグナリングドメインを欠損させてヘム含有 PAS ドメインとその周辺領域のみにした試料を調製し、結晶化に成功した。その結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線データを収集し、Aer2 の立体構造を決定した。また、その構造情報に基づき、ヘム鉄に結合した酸素分子と相互作用するアミノ酸側鎖の変異体を調製した。その変異体の共鳴ラマン測定により、酸素分子の識別感知機構について検討した。

4. 研究成果

共鳴ラマン分光法によるヘム近傍構造解析と X 線結晶構造解析による立体構造決定により、Aer2 ではヘム鉄の近傍に存在するトリプトファン側鎖が酸素分子と水素結合を形成していることを明らかにした (図1)。Aer2 の構造は、ヘム鉄に結合するリガンドがトリプトフ

アン側鎖と相互作用する初めての例となった。このトリプトファン側鎖とヘム鉄に結合するリガンドの相互作用が引き金となって、分子内の構造変化が誘起されることにより、酸素分子の識別感知やそれに伴うシグナル伝達が進行することを明らかにした。

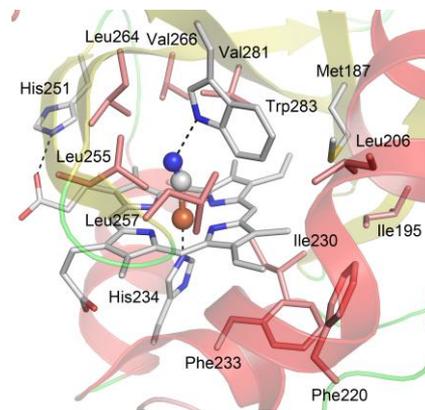


図 1. Aer2 のヘム近傍構造

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 1 件)

Hitomi Sawai, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani, Shigetoshi Aono

“Structural basis for oxygen sensing and signal transduction of the heme-based sensor protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*.”

Chemical Communications (2012) 48, pp. 6523-6525. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① Hitomi Sawai, Hiroshi Sugimoto, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani, Yoshitsugu Shiro, Shigetoshi Aono

“Structural characterization of Aer2 that employs a heme as an oxygen sensor for aerotaxis control.”

4th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, January 9-11, 2012, Todaiji Cultural Center (Japan)

② Hitomi Sawai, Hiroshi Sugimoto, Haruto Ishikawa, Yoshitsugu Shiro, Yasuhisa Mizutani, Shigetoshi Aono

“Structural characterization of Aer2 that adopts a heme-containing PAS domain as an oxygen sensor for aerotaxis control.”

15th International Conference on Biological

Inorganic Chemistry (ICBIC15), August 7-12, 2011, University of British Columbia (Canada)

③ 澤井仁美、石川春人、水谷泰久、青野重利

“ヘム含有 PAS ドメインを有する新規な走化性制御蛋白質 Aer2 の酸素感知機構”

第 4 回 バイオ関連化学合同シンポジウム、2010 年 9 月 24-26 日、大阪大学 (大阪府)

④ 澤井仁美、青野重利

“ガス分子により駆動される新規なセンサータンパク質の機能発現機構”

平成 22 年度 特定領域「細胞感覚」夏の班会議、2010 年 7 月 5-6 日、札幌市教育文化会館 (北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 仁美 (SAWAI HITOMI)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号: 50584851