

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350084

研究課題名(和文) ガス分子による生体機能制御に関するセンサータンパク質の構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of sensor proteins that regulate biological functions by gas molecules

研究代表者

青野 重利 (AONO, Shigetoshi)

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・教授

研究者番号：60183729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円、(間接経費) 3,840,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌由来の走化性シグナルトランスデューサーであるAer2が、ヘムをセンサー部位とする新規な酸素センサータンパク質であることを見出した。Aer2の結晶構造解析に成功し、センサードメイン中に存在するヘムに結合した酸素分子と遠位ヘムポケットに存在するTrp283との間で形成される水素結合が、Aer2による酸素分子センシング、ならびに分子内シグナル伝達に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、ヘム分子センサータンパク質として機能する、新規な転写調節因子HrtRを見出し、その結晶構造を明らかにするとともに、HrtRによるヘムセンシング、およびヘムによる機能制御の分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A chemotaxis signal transducer protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa* was found to be a novel heme-based oxygen sensor protein. The crystal structure of Aer2 was determined, which reveals that a hydrogen bonding interaction between heme-bound oxygen and Trp283 in the distal heme pocket plays an important role for oxygen sensing and signal transduction of Aer2. A novel heme sensor protein HrtR was also found in this work. The molecular mechanisms of heme sensing by HrtR and of the heme-responsive functional regulation of HrtR were elucidated by determining its crystal structure.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：センサータンパク質 ヘムタンパク質 転写調節因子 走化性制御系 シグナルトランスデューサー

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでの研究において、光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 中に含まれる転写調節因子 CooA が、一酸化炭素 (CO) により機能制御される、それまでに例の無い新規な転写調節因子であることを世界に先駆けて明らかにした。CO は呼吸毒としてよく知られているが、申請者の研究以前においては、CO がポジティブな生理作用を示すということは全く想定されていなかった。申請者の CooA に関する研究は、遺伝子発現の制御という生物にとって非常に重要なプロセスに CO が関与していること、すなわち CO がポジティブな生理作用を示すことを、分子レベルで明らかにした世界初の研究であった。CooA は、CO センサーとして機能するヘム (鉄ポルフィリン錯体) を活性中心として有していた。申請者は、ヘムが分光学的なプローブとして有効であることを最大限に活用し、共鳴ラマン分光、EPR、EXAFS 等の各種分光学的実験手法と、遺伝子工学、および分子生物学的な実験手法を駆使することにより、CooA による CO センシングならびに遺伝子発現制御の分子機構の解明を行った。

申請者の CooA に関する研究を契機とし、新規な気体分子センサータンパク質の探索と、その構造機能相関解明を目指した研究が、国内外において勢力的に展開され始めた。その結果、これまでに遺伝子発現制御、走化性制御、バイオフィーム形成制御に関与するセカンドメッセンジャー分子 (cyclic di-GMP) の合成・分解反応の制御など、様々な生理機能制御に関与する気体分子センサータンパク質の存在が報告され始めている。申請者も、走化性制御系において機能する新規な O<sub>2</sub> センサータンパク質 (Aer2)、酸素により機能制御される (すなわち、酸素センサーとしての機能を有する) cyclic di-GMP 合成酵素 (HemDGC) 等が、分子中に遷移金属イオンを含む新規な気体分子センサータンパク質であることを見出している。しかしながら、新たに見出されたセンサータンパク質についての研究は、世界的に見てもまだ始まったばかりの状況であり、これらの詳細な構造機能相関については不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

(1) バクテリアの走化性 (Chemotaxis) 制御系においては、走化性シグナルトランスドューサータンパク質 (MCP: Methyl-accepting Chemotaxis Protein と呼ばれる) が誘引物質や忌避物質などの外部シグナルに対するセンサーとして機能している。MCP の N 末領域には外部シグナルをセンシングするためのセンサードメインが、C 末領域には外部シグナルを感知した後の細胞内シグナル伝達に関与するシグナリングドメインが存在している。

我々はこれまでに、枯草菌の酸素に対する

走化性制御系において酸素センサーとして機能する MCP である HemAT を対象として研究を行ってきた。HemAT はグロビンドメインをセンサードメインとする可溶性 MCP である。HemAT では、グロビンドメイン中に含まれるヘムが酸素センサーの本体として機能している。一方、大腸菌の酸素に対する走化性は、フラビン含有 PAS ドメインをセンサードメインとする膜結合型 MCP である Aer により制御されていることが報告されている。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中には、大腸菌 Aer のホモログと推定される MCP が 2 種類 (Aer および Aer2) 存在している。本研究では、新規に見出した酸素センサータンパク質である緑膿菌由来の Aer2 の分光学的解析と結晶構造解析を行い、得られた結果を基に、Aer2 による酸素センシング・シグナル伝達の分子機構解明を行う。

(2) 近年、気体分子等の小分子がシグナル分子として機能することにより、遺伝子発現制御を始めとする様々な生理機能制御に関与していることが報告され、研究者の大きな注目を集めている。本研究では、気体分子以外にも、有機小分子であるヘム (鉄ポルフィリン錯体) のセンサータンパク質を研究対象とし、これらセンサータンパク質によるエフェクター分子の選択的センシングと、それに引き続く分子内および分子間シグナル伝達、およびエフェクター分子による生理機能発現制御の分子機構解明を行う。特に、本研究で見出した、ヘム分子をエフェクターとする新規な転写調節因子 HrtR によるヘム分子センシング、ならびにヘムによる HrtR の機能制御の分子機構解明に重点をおいて研究を進める。

## 3. 研究の方法

(1) Aer2 が酸素をセンシングした後に起こる分子内シグナル伝達反応においては、「エフェクター分子の結合によりタンパク質のコンフォメーションが変化する」ことが重要な役割を果たしていると考えられる。このことを明らかにするためには、Aer2 の構造情報が不可欠であるので、本研究において Aer2 の X 線結晶構造解析を行うことにより上記仮説の検証を行う。

(2) HrtR の機能解析として、*in vitro* における標的 DNA との結合実験を、蛍光偏光解消度測定およびゲルシフト法により行う。一連の変異体についても同様な解析を行い、HrtR による標的 DNA の認識・結合能発現において、ヘムが果たす役割を明らかにする。

(3) HrtR の結晶構造解析においては、ヘムを結合していないアポ型 HrtR、ヘムを結合したホロ型 HrtR の結晶化条件の検討を行い、高分解能での結晶構造解析に適した結晶を取得し、構造解析を行う。得られたアポ型と

ホロ型の構造を詳細に比較し、HrtRによるヘムセンシングに関与しているアミノ酸の同定を行うとともに、ヘム結合によりどのような構造変化が誘起されるか、その構造変化がHrtRの機能制御にどのように関与しているか等についての知見を得る。

転写調節因子であるHrtRのDNA結合能が、どのような分子機構により制御されているかを明らかにするためには、標的DNAと複合体を形成したHrtRの構造解明が必要不可欠である。そこで本研究では、DNAとHrtRとの複合体の結晶構造解析も行う。

#### 4. 研究成果

(1) Aer2は、679アミノ酸残基よりなる可溶性タンパク質であり、N末端よりpoly HAMPドメイン、PASドメイン、di HAMPドメイン、MCPドメインの4つのドメインから構成されると考えられている。本研究では、poly HAMPドメイン、PASドメイン、di HAMPドメインからなるHPH-Aer2 (1 - 384残基)、およびPASドメイン、di HAMPドメインからなるPH-Aer2 (173 - 384残基)の結晶構造解析を試み、HPH-Aer2については分解能3.2 Åで、PH-Aer2については分解能2.4 Åで構造決定を行った。HPH-Aer2、PH-Aer2いずれの場合も、KCN存在下において酸化型Aer2を用いて結晶化を行った。

本研究で決定したPH-Aer2の構造を図1に示す。173~306残基目までの領域は、はっきりとした電子密度が観測されたものの、307残基目以降(di HAMPドメイン)は明瞭な電

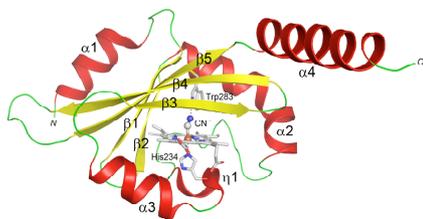


図1 PH-Aer2の結晶構造

子密度が観測されなかった。PH-Aer2中のPASドメインは、これまでに報告されているFixLおよびEcDos中のヘム含有PASドメインと類似の構造を有しているが、いくつかの点でFixL、EcDosとは異なる特徴を有している。すなわち、FixLおよびEcDosの場合は、ヘム軸配位子であるHisがヘム近位側に存在するα3ヘリックス上に存在しているのに対し、Aer2においてはα3ヘリックス上流に存在する3<sub>10</sub>ヘリックス(η1)上にヘム軸配位子として機能するHis234が存在していることが分かった。ヘム鉄上には、CNに帰属される電子密度が観測されたことから、本研究で得られた構造は、シアン結合型PH-Aer2の構造であると考えられる。

ヘムに結合したCNの窒素原子と、ヘム遠

位側ポケットに存在するTrp283側鎖中の窒素原子間の距離は3.0 Åであることから、ヘムに結合したCNとTrp283側鎖間で水素結合が形成されているものと推定される(図2)。現時点では、酸素結合型Aer2の構造は得られてはいないが、酸素結合型Aer2においてもシアン結合型の場合と同様、ヘムに結合した酸素分子とTrp283間で水素結合が形成されるものと推定される。

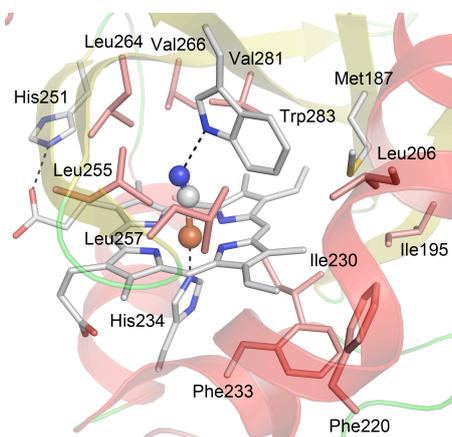


図2 Aer2ヘム周辺の構造

FixLおよびEcDosでは、FGループ上に存在するArg残基が、ヘムに結合した酸素分子と水素結合を形成すること、および、酸素が結合することによりFGループのコンフォメーション変化が誘起され、このコンフォメーション変化が酸素センシング後の分子内シグナル伝達に重要な役割を果たすと考えられることが報告されている。一方、Aer2においてヘムに結合した酸素と水素結合を形成すると考えられるTrp283は、PASドメインのC末端に存在するβ5ストランドに存在しており、FGループ(α3とβ3間のループ)上には酸素と水素結合を形成可能なアミノ酸残基は存在しない。β5ストランドは、PASドメインと隣接したdi HAMPドメイン(PH-Aer2の構造中で観測されているα4ヘリックスは、di HAMPドメインの一部である)に直接連結している。これらのことを総合すると、Aer2中のヘムに酸素が結合し、酸素とTrp283の水素結合が形成されることにより、Trp283付近のコンフォメーション変化が誘起され、そのコンフォメーション変化がdi HAMPならびにMCPドメインのコンフォメーション変化を引き起しているものと推定される。これまで、ヘム含有PASドメインのシグナル伝達機構としては、ヘムにリガンドが結合することにより誘起されるFGループのコンフォメーション変化が重要であると考えられていたが、Aer2における分子内シグナル伝達反応は、これまでのヘム含有PASドメインとは異なる分子機構で駆動されていることが分かった。

HPH-Aer2は、図3に示すようなホモダイマー構造を有していることが分かった。N末に存在するpoly HAMPドメインは、特徴的なヘ

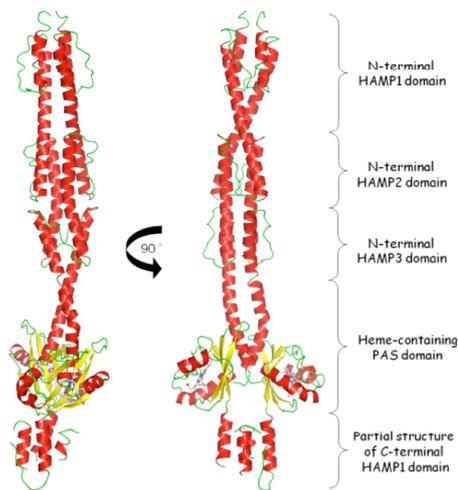


図3 HPH-Aer2の構造

リックスバンドル構造を有している。N 末 poly HAMP ドメインを欠損した PH-Aer2 は、モノマーとして存在することから、N 末 poly HAMP ドメインは、Aer2 の二量化に重要な役割を果たしているものと推定される。

(2) HrtR の DNA 結合能は、HrtR タンパク質へのヘム分子の結合解離により制御されていることが分かった。すなわち、ヘムを結合していないアポ型 HrtR が標的 DNA に対する特異的結合能を有しており、HrtR にヘムが結合することにより、その特異的 DNA 結合能が失われ、標的 DNA から解離する。本研究では、まず、蛍光偏光解消法によりアポ HrtR の DNA 結合親和性の解析を行った。その結果を図4に示す。アポ型 HrtR と蛍光標識した標的 DNA を混合した場合、アポ型 HrtR の濃度上昇に伴い、蛍光偏光解消度の増加が観測された。このことから確かに、アポ型 HrtR が標的 DNA と複合体を形成していることが分かる。この結果を解析した結果、標的 DNA ・

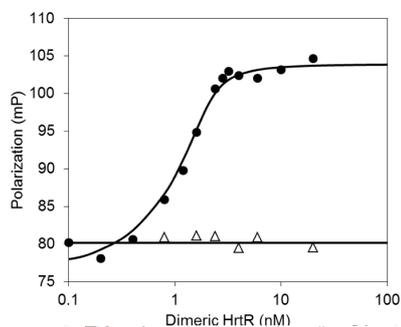


図4 アポ型 HrtR(●)、ホロ型 HrtR(△)による蛍光偏光解消

アポ型 HrtR 複合体の解離定数  $K_d$  は、0.2 nM であることが分かった。アポ型 HrtR の代わりにホロ型 HrtR を用いた場合には、蛍光偏

光解消度は全く変化しなかった。この結果は、ホロ型 HrtR が標的 DNA とは結合しないことを示しており、ゲルシフトアッセイの結果とも一致した。

(3) アポ型 HrtR による標的 DNA の認識機構を明らかにするため、標的 DNA・アポ型 HrtR 複合体の結晶構造解析を行い、その構造決定に成功した。本複合体の結晶には、15 塩基対の DNA 断片 (センス鎖の配列: 5' -ATGACACAGTGTCAT-3') を用いた。HrtR はホモダイマー構造を有しており、その全体構造は TetR ファミリーに属する転写調節因子の構造と類似していた。N 末領域が、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造を DNA 結合モチーフとする DNA 結合ドメインを構成している。HrtR と標的 DNA との相互作用を調べたところ、Tyr50 の側鎖とチミン 12 との間で、CH- $\pi$  相互作用が、Arg46 の側鎖とグアニン 11 の間で水素結合が観測された。DNA 中の塩基と相互作用しているのは、Tyr50 と Arg46 の二残基のみであった。また、これら二つの側鎖 (Arg46 と Tyr50) 間にも水素結合が観測された。His37、Arg46、および Tyr50 の側鎖、ならびに Ile35、Met36 の骨格アミド基は、DNA 骨格のリン酸基との間で水素結合を形成していることも分かった。Arg46 あるいは Tyr50 に変異を導入した R46A、Y50F、Y50A 変異体は、いずれも特異的な DNA 結合能を失っていることが分かった。これらの結果より、HrtR による標的 DNA 配列の認識、および特異的 DNA 結合能発現には、Arg46 と Tyr50 の存在が必須であることが分かった。

標的 DNA・アポ型 HrtR 複合体の結晶構造に加え、ヘムを結合したホロ型 HrtR の結晶構造決定にも成功した。HrtR はいずれの場合もホモダイマー構造を有しており、その構造は TetR ファミリー転写調節因子と類似していた。HrtR では、N 末領域が、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造を DNA 結合モチーフとする DNA 結合ドメインを構成している。エフェクター分子であるヘムの結合サイトは、C 末領域に存在する疎水性キャビティー中に存在しており、His72 と His149 が軸配位子としてヘムに配位することが分かった。また、ヘム結合に伴って HrtR 中の  $\alpha 4$  ヘリックス部分にコイル・ヘリックス転移が誘起され、その結果 DNA 結合ドメインの相対配置が変化することにより DNA 結合能を失うことが明らかとなった。

## 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 7 件)

1. "The Dos family of globin-related sensors using PAS domains to accommodate haem acting as the active site for sensing external signals" S.

- Aono, **2013**, *Adv. Microbial Physiol.*, **63**, 273-327. 査読有  
DOI:10.1016/B978-0-12-407693-8.00007-8
2. "A model theoretical study on ligand exchange reactions of CoaA" T. Ishida, S. Aono, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, **15**, 6139 - 6148. 査読有  
DOI: 10.1039/c3cp43253j
  3. "Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*" H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, *J. Biol. Chem.*, **2012**, **287**, 30755-30768 査読有  
DOI:10.1074/jbc.M113.370916
  4. "Structural dynamics of proximal heme pocket in HemAT-Bs associated with O<sub>2</sub> dissociation" Y. Yoshida, H. Ishikawa, S. Aono, Y. Mizutani, *Biochem. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, **2012**, 1824, 866-872 査読有  
DOI:10.1016/j.bbapap.2012.04.007
  5. "Site-specific protein dynamics in communication pathway from sensor to signaling domain of oxygen sensor protein, HemAT-Bs: time-resolved ultraviolet resonance Raman study" S. El-Mashtoly, M. Kubo, Y. Gu, H. Sawai, S. Nakashima, T. Ogura, S. Aono, T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, **2012**, **287**, 19973-19984 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M112.357855
  6. "Structural basis for oxygen sensing and signal transduction of the heme-based sensor protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*" H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Ishikawa, Y. Mizutani, S. Aono, *Chem. Commun.*, **2012**, **48**, 6523-6525 査読有  
DOI:10.1039/C2CC32549G
  7. "Novel bacterial gas sensor proteins with transition-metal-containing prosthetic groups as active sites" S. Aono, *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, **16**, 678-686 査読有  
DOI:10.1089/ars.2011.4248
- [学会発表] (計 26 件)
1. S. Aono, "Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*" 6th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, (Okazaki, Japan, November 25-27, 2013)
  2. "Biological signal transduction using heme as a signaling molecule", 青野重利, 錯体化学会第 6 3 回討論会 (琉球大学・沖縄、2013 年 11 月 2 日～4 日)
  3. "へム含有センサータンパク質 Aer2 による選択的酸素センシングの分子機構" 澤井仁美、杉本宏、城宜嗣、青野重利、第 1 1 2 回触媒討論会 (秋田大学・秋田、2013 年 9 月 18 日～20 日)
  4. H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, "Molecular mechanisms of the transcriptional regulation by heme sensing" 16th International Biological Inorganic Chemistry, (Grenoble, France, July 22 - 26, 2013)
  5. A. Pavlou, E. Pinakoulaki, H. Yoshimura, S. Aono, "Protein conformational dynamics and kinetic properties of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT as revealed by time-resolved step-scan FTIR spectroscopy" 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France, July 22 - 26, 2013)
  6. A. Otomo, H. Ishikawa, M. Mizuno, Y. Mizutani, S. Aono, "Structural changes in the heme and heme pocket upon CO dissociation of CoaA observed by time-resolved resonance Raman spectroscopy" 16th International Biological Inorganic Chemistry (Grenoble, France, July 22 - 26, 2013)
  7. S. Aono, H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, "Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis" 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain, July 8-11, 2013)
  8. "走化性シグナルトランスデューサータンパク質 Aer2 の構造と機能" 澤井仁美、杉本宏、城宜嗣、青野重利、第 4 0 回生体分子科学討論会 (大阪大学・大阪、2013 年 6 月 7 日～8 日)
  9. S. Aono, "Signal sensing and signal transduction in heme sensor proteins" 223rd The Electrochemical Society Meeting, (Toronto, Canada, May 12 - 17, 2013)
  10. S. Aono, H. Sawai, M. Yamanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro "Transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*" International Bio-iron Meeting 2013, (London, UK, April 14-18, 2013)
  11. "時間分解共鳴ラマン分光法を用いた酸素センサータンパク質 HemAT の酸素脱離に伴う構造変化観測" 石川春人、吉田祐、青野重利、水谷泰久、日本化学会第 9 3 春季年会 (立命館大学・滋賀、2013 年 3 月 22 日～25 日)

12. H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 5th Korea-Japan Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, (Seoul, Korea, February 24-26, 2013)
  13. S. Aono, “Molecular mechanism of heme-responsive transcriptional regulation” 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, (Hong Kong, China, November 5-8, 2012)
  14. “細胞内ヘム濃度の恒常性維持に関わる転写制御の分子機構” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、日本結晶学会年会 (東北大学・宮城、2012年10月25日～26日)
  15. “ヘムをエフェクター分子とする転写調節因子 HrtR の構造と機能” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、錯体化学会第62回討論会 (富山大学・富山、2012年9月21日～23日)
  16. H. Sawai, M. Namanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, “Crystal structures of heme-sensing transcriptional regulator responsible for heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, (Granada, Spain, September 12-16, 2012)
  17. “ヘム濃度の恒常性維持に関わる転写調節因子 HrtR の分子機構” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、第6回バイオ関連化学シンポジウム(北海道大学・北海道、2012年9月6日～8日)
  18. S. Aono, H. Sawai, M. Namanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacteria” 8th International Biometals Symposium, (Brussels, Belgium, July 15-19, 2012)
  19. S. Aono, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis*” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, (Jeju, Korea, July 1-6, 2012)
  20. “ヘム濃度の恒常性維持に関わる転写調節因子の構造と機能” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、第12回日本蛋白質科学会年会(名古屋国際会議場・愛知、2012年6月20日～22日)
  21. “ヘム分子により機能制御される転写調節因子 HrtR の構造と機能” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、第39回生体分子科学討論会(東北大学・宮城、2012年6月8日～9日)
  22. S. Aono, “Transcriptional regulation by heme acting as a signaling molecule” 221st The Electrochemical Society Meeting, (Seattle, USA, May 6 - 11, 2012)
  23. “ヘムをセンシングする転写調節因子 HrtR の機能制御機構” 山中 優、澤井仁美、青野重利、日本化学会第92春季年会(慶応義塾大学・神奈川、2012年3月25日～28日)
  24. “新規な転写調節因子 HrtR のヘムによる機能制御の分子機構” 澤井仁美、杉本宏、山中 優、城宜嗣、青野重利、日本化学会第92春季年会(慶応義塾大学・神奈川、2012年3月25日～28日)
  25. H. Sawai, M. Namanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, (Nara, Japan, January 9-11, 2012)
  26. H. Sawai, M. Namanaka, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Aono, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacteria” 11th International Symposium on Applied Biological Inorganic Chemistry, (Barcelona, Spain, December 2-5, 2011)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
 青野 重利 (AONO, Shigetoshi)  
 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・教授  
 研究者番号：60183729