

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570136

研究課題名(和文) 環境にตอบสนองして働く転写因子のDNA結合様式の変化

研究課題名(英文) Conformational change of DNA bound to transcription factor response to environmental change

研究代表者

小林 一雄 (KOBAYASHI, Kazuo)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30116032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：SoxRはセンサー部位に[2Fe-2S]を持つ酸化ストレスにตอบสนองする転写因子である。活性な酸化状態ではプロモーター領域のDNAがひずんだ構造を持ち、転写活性を持つが、それに対して還元型については不明である。本研究では、蛍光プローブとしてアデニン を2-Aminopurine(2Ap)に置き換えたプロモーターDNAに組み込み、SoxRの酸化還元による構造変化を検討した。プロモーター配列の中心部に2Apを導入したDNAにおいて、還元剤を加えると蛍光強度は減少した。[2Fe-2S]の酸化還元されることにより、SoxRの構造が変化し、それに伴って結合したDNAの構造が変化していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The [2Fe-2S] transcriptional factor SoxR functions as a sensor of oxidative stress in *Escherichia coli*. In the oxidized state, transcription is activated by distorting the target DNA promoter region to initiate transcription by RNA polymerase, while the inactive reduced state of the protein remains uncharacterized. The redox-dependent conformational change of the promoter DNA was directly observed by site-specifically replacing the adenine and cytosine bases of the promoter oligonucleotide with the fluorescent probes 2-aminopurine (2Ap) and pyrrolo-dC, respectively. Reduction of the [2Fe-2S] cluster in SoxR-DNA complex dramatically weakened the fluorescence intensity of the 2Ap moieties incorporated into the central part of the DNA. These results strongly suggested that the redox change caused a large conformational change within the region confined to the central A-T base pairs in the promoter region of the DNA.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：転写因子 活性酸素 鉄イオウクラスター プロモーター DNA パルスラジオリシス 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

バクテリアには、外部からの環境にตอบสนองして一連の解毒過程に働くシステムを誘導する鍵となるセンサー蛋白質が存在する。水銀耐性のバクテリアにおいて、水銀イオンにตอบสนองする転写因子として MerR が発見され、その後ゲノムプロジェクトの進行にともなう、同様の機能を持つタンパク質が次々見つかった。MerR と同様の機能・構造を持つタンパク質(MerR family)には、重金属イオン解毒の際に働く MerR(水銀)、CueR(銅)、ZntR(亜鉛)、薬物や抗生物質にตอบสนองし、薬物を細胞外に輸送するトランスポーター等、薬物を解毒化に働くタンパク質を誘導する BmrR、BltR、Mta、TipA、そして酸素ストレスにตอบสนองする転写因子である SoxR が存在する。これら MerR family である BmrR、MtaN、CueR の立体構造が明らかにされた。また我々は SoxR およびその DNA 複合体の構造を明らかにし(図1)(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008)、その詳細な原子レベルでの SoxR の転写制御機構の議論が可能になった。これらの構造解析の結果より、共通する機構で活性化されることが

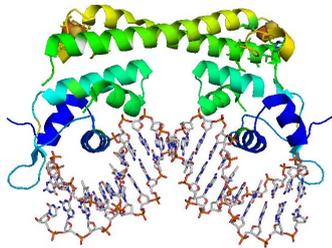


図1 *E. coli* SoxR-soxS 複合体のX線構造解析(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4121-4126 (2008))

分かった。すなわち、重金属イオンや薬物が制御部位に結合することにより、タンパク質の構造が変化し、転写因子に結合していたプロモーター領域の DNA が構造変化を引き起こす。その結果、局部的に相補的塩基対が解離し、19塩基離れていたプロモーター領域が接近し、RNA ポリメラーゼが認識できる17塩基離れている効率的な転写に適した位置になることが分かった。一方それに対して、転写活性 off 状態である、重金属イオンや薬物が結合していない状態、あるいは SoxR 鉄イオウクラスター還元状態において、いずれも X 線結晶構造解析はいまだに成功していない。これまでの研究によると、タンパク質が不活性状態においてもプロモーター領域に結合しており、単なる DNA 結合・解離では説明できない。この off 状態における DNA は結合様式は相補的塩基対が解離しているのかどうかについては全く不明である。

SoxR は、センサー部位に [2Fe-2S] クラスターを持ち、その可逆的な酸化還元によって転写制御されている。SoxR は種々のグラム陰性菌に存在するが、その生理的役割は菌種によって大きく異なる。例えば *E. coli* 内では、

酸化ストレスにตอบสนองして転写活性を持ち、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を含む酸化ストレス防御タンパクの発現を制御している。それに対して *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) においてはピオシアニンにตอบสนองし、抗生物質輸送タンパクやモノオキシゲナーゼの発現に関わると報告されている。それぞれはアミノ配列が 62% identity とよく保存されているが、生体内での役割はこのように大きく異なる。

SoxR の興味あるもうひとつの生理機能として、一酸化窒素(NO)にตอบสนองすることである。NO は血管弛緩作用、脳における情報伝達、免疫応答等、多様な生理機能を持つことが知られている。一方 NO は生体にとって有毒であり、NO の産生にตอบสนองして解毒化するシステムが存在しており、NO センサータンパク質が注目されている。そのセンサーの多くが鉄イオウクラスターと NO との反応によりตอบสนองしている。*E. coli* において、酸化ストレスのセンサーとして働く転写因子 SoxR が *in vivo* で NO により SoxR が活性化されており、その際[2Fe-2S]クラスターの鉄に NO が配位して生成するジニトロシル鉄錯体 (DNICs) の存在が ESR により確認されている。しかしながら DNIC の生成過程についてはモデル分子で検討されているが、いまだその全貌は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では MerR family である SoxR をとりあげ、以下に述べる点を明らかにした。

- (1) *E. coli* SoxR において O₂ が酸化ストレスのシグナルとなっているのかどうか、また *P. aeruginosa* SoxR との生理的役割の違いによって O₂ との反応性に違いが見られるかをパルスラジオリシス法により検討した。また、その反応性の違いを決める因子について、変異体を用いた実験を行った。
- (2) パルスラジオリシス法を用いて、NO と SoxR との反応を観察した。さらに反応性の差を代表的な鉄イオウタンパク質であるフェレドキシン(Fd)と比較検討した。
- (3) SoxR の[2Fe-2S]の酸化還元にとまなうプロモーター領域の構造変化を蛍光プローブ法を用いて明らかにした。

3. 研究の方法

(1) SoxR の発現と精製

E. coli および *P. aeruginosa* SoxR は発現プラスミドを、鉄イオウクラスター合成オペロンを含むプラスミドと共に 鉄コハク酸を含む培地にて *E. coli* C41 (DE3) 中で大量発現を行い、P-セルロースカラムとゲルろ過カラムにより精製した。

(2)パルスラジオリシス法

1 O₂ の反応

KCl (0.5 M) , 酒石酸ナトリウム (10 mM) , OH ラジカルスカベンジャーとしてギ酸ナトリウム 0.1 M を含むリン酸緩衝液 (10

mM pH7.0) を用いた。酸素飽和の緩衝液に SoxR (70 μM) を加え、サンプルを調製した。2 亜硝酸イオンは水和電子(e_{aq}^-)との反応で NO が生成する。この手法を用いて、50 mM 亜硝酸ナトリウム存在下、ナノ秒~秒時間領域で測定した。電子線照射は阪大産研 L-band ライナックで行った。

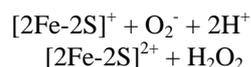
(3) 蛍光プローブを用いた研究

相補鎖との水素結合により蛍光消光される蛍光プローブとしてアデニン (A) を 2-Aminopurine (2AP)、シトシン (C) を Pyrrolo-C とそれぞれ置き換えたプロモーター DNA に組み込み、SoxR の酸化還元による蛍光スペクトルの変化により DNA プロモーター領域の構造変化を検討した。

4. 研究成果

1) O_2^- と SoxR との反応

E. coli SoxR を含むサンプルへパルス照射すると、420 nm における吸収がナノ秒領域で減少し、その後ミリ秒領域で再び増加することが分かった。この初期に見られる吸収変化は SoxR の酸化型と還元型の差スペクトルとほぼ一致しており、SoxR は e_{aq}^- により還元され、その後再酸化することが分かった。この系に O_2^- スカベンジャーであるヒト SOD を 11 μM 加えると還元過程には変化がないが、再酸化の過程が完全に消失した。このことから再酸化は以下の式で示すように O_2^- によって起こっていることがわかった。



ヒト SOD の濃度変えて酸化過程の阻害の割合を調べた (図 2)。その結果 SOD 1 μM で半

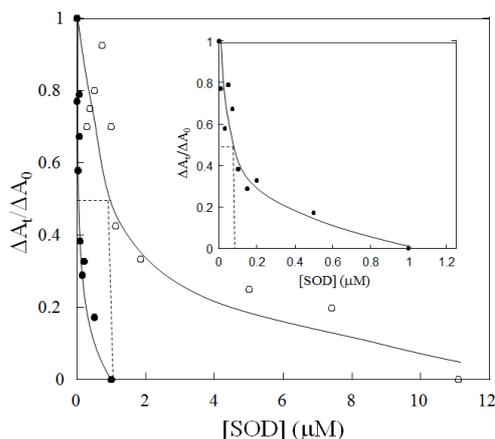


図 2 パルスラジオリシス法により観測される酸化過程の *E. coli* (○)、および *P. aeruginosa* SoxR (□) の SOD 添加効果 J. Biol. Chem. 287, 35702-35708 (2012)

分阻害され、この値より O_2^- と *E. coli* SoxR との反応速度を $5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ 求めることができた。この値は *E. coli* SOD と同程度であり、この反応が SoxR の酸化ストレスシグナルになっている可能性を示唆している。

同様の実験を *P. aeruginosa* SoxR で比較した。その結果、SOD 0.5 μM で完全に阻害され (図 2)、*P. aeruginosa* SoxR が $3.5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ と大きく異なる結果となった。この差異は SoxR による遺伝子制御と直接関係しており、*E. coli* では O_2^- が SoxR の酸化ストレス応答の直接のシグナルになっているのに対して、*P. aeruginosa* では別の分子がことを示している。

さらにこの *E. coli* と *P. aeruginosa* SoxR の O_2^- の違いを検討するため、*P. aeruginosa* と *E. coli* とで異なるアミノ酸をそれぞれに対応するアミノ酸に置換した変異体を作製し、 O_2^- との反応速度を検討した。*E. coli* SoxR における鉄イオウクラスター周辺のアミノ酸残基であるリジン、アスパラギン酸に注目し、変異体 K89A、K92A、D129A を作成し実験を行った結果、K89A、D129A では差が見られなかったのに対して、K92A において、 O_2^- との反応速度が $2.7 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ と速度が小さくなっていることが分かった。

2) SoxR と NO との反応

SoxR に NO 発生剤として 1-hydroxyl-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-triazene NOC7 を加えた際の吸収変化を調べた。嫌気下 SoxR の非ヘム鉄は NO と反応して DNIC を与え、その生成は ESR スペクトルからも確かめることができた。なおこの反応の結果、 $[2Fe-2S]$ 1 当量あたり 2 当量の S_0 の生成を確認した。それに対して、ホウレンソウの Fd では 5-8% しか DNIC 生成せず、SoxR と NO の反応が効率良く進行することが確かめられた。

亜硝酸イオンは e_{aq}^- との反応で NO が生成する。この手法を用いて、SoxR と NO との反応を調べた。亜硝酸ナトリウム 50 mM と SoxR を含むサンプルにパルス照射すると、ミリ秒領域での吸収変化が得られた。420 nm における吸収変化は速い一相性の変化に対して、480 nm の変化は速い成分と遅い成分からなることが分かった。このことは少なくとも 2 種以上の反応が起こっていることが示された。さらに NO の濃度を 52 μM の条件で SoxR の濃度を変えて 480 nm における 2 相変化を調べた。 $[SoxR]$ の濃度の増加とともに遅い相の割合が減少し、 $[NO]/[SoxR]$ の値が 2 で一定になることが分かった。このことは $[2Fe-2S]$ 1 当量あたり 2 当量の NO が反応していることを示しており、NO と SoxR の反応はまず $[2Fe-2S]$ クラスターと一分子の NO が反応し、続く 2 つ以上の過程を経て最終的に DNICs が形成されていることが確かめられた。このことは、パルスラジオリシス法で観測される中間体は DNIC とは異なっていることと矛盾しない。

以上の結果に基づいて、図 2 の反応機構を提唱した。すなわちモノニトロシル錯体を經由してジニトロシル錯体を生成し、NO 付加にもなって S_0 が生成する。一方 Fd も同様にパルスラジオリシスの実験を行った。その結

果、速い過程は見られるものの、その吸収変化が小さかった。さらに興味あることに SoxR で見られた遅い過程が観測されず、図 3 で示す式(ii)の反応が Fd では起こりにくいことが分かった。

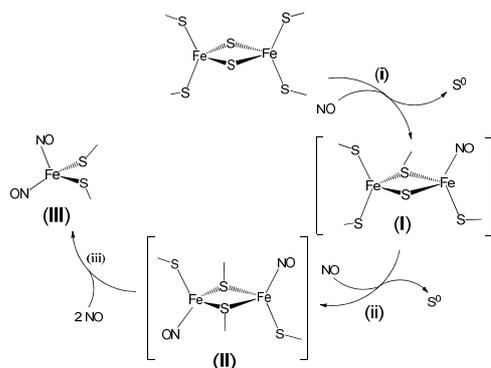


図 3 SoxR と NO との反応機構

3) 蛍光プローブ法を用いた DNA の構造変化プロモーター

として 20 塩基のオリゴヌクレオチドを用い、蛍光プローブとしてアデニンを 2Ap にシトシンを pyrrolo-dC に導入した(図 4)。配列の中心部 (Ade1, Ade1') に 2AP を導入した DNA において実験を行ったところ、還元剤であるジチオナイトを加えると蛍光強度は大きく減少し、さらに 362 nm から 370 nm へピークシフトが見られた。同サンプルを空気にさらすと蛍光強度は徐々に戻り、最終的にほぼ最初と同じスペクトルを示した。それに対して [2Fe-2S] クラスター結合ドメインを持たずプロモーター DNA への結合能は変わらない SoxR の変異体 ($\Delta 37$) を用いて同様の実験を行ったところ、ジチオナイトを添加しても蛍光スペクトルには変化が見られなかった。このことより、蛍光スペクトルの変化は、SoxR の鉄イオウクラスターの酸化還元されることにより、SoxR の構造が変化し、それに伴って結合した DNA の構造が大きく変化していることが示された。一方プロモーター配列中の、外側に位置する Ade5, Ade5' に 2AP を導入した DNA、あるいは Cyt3, Cyt3' に Pyrrolo-C を導入した DNA 用いたところ、ジチオナイトを添加しても蛍光スペクトルには変化が見られなかった。以上の結果より、SoxR の鉄イオウクラスターの酸化還元によって、プロモーター DNA の中心部のみの大きな構造変化が、SoxR の転写活性の制御において重要であるということが示唆された。

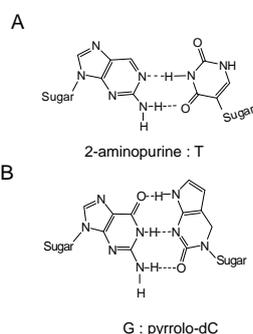


図 4 2-Ap-T および pyrrolo dC-G

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 9 件)

藤川 麻由、小林 一雄、古澤 孝弘、
Mechanistic Studies on Formation of the
Dinitrosyl Iron Complex of the [2Fe-2S]
Cluster of SoxR Protein, J. Biochem. 査
読有 in press,
DOI: 10.1093/jb/mvu029

小林 一雄、藤川 麻由、古澤 孝弘
Oxidative Stress Sensing by the Iron-Sulfur
Cluster in the Transcription Factor, SoxR,
J. Inorganic Biochem. 査読有 133, 2014,
87-91,
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.11.008

Recuenca, Mariam, Rahman, Md, 武内 総子,
小林 一雄、鏑木 基成、Electron transfer
reactions of candidate tumor suppressor 101F6
protein, a cytochrome b561 homologue, with
ascorbate and monodehydroascorbate
radical, Biochemistry 査読有 52, 2013, 3660-
3668,
DOI: 10.1021/bi301607s

津田 愛子、石川 良助、小手石 博康、
丹下 幸助、福田 楊太、小林 一雄、
井上 豪、野尻 正樹、
Structural and mechanistic insights
into the electron-flow through protein for
cytochrome c-tethering copper nitrite reductase,
J. Biochem. 査読有 154, 2013, 51-60,
DOI: 10.1093/jb/mvt023

藤川 麻由、小林 一雄、古澤 孝弘、
Direct Oxidation of the [2Fe-2S] Cluster in
SoxR by Superoxide: Distinct Differential
Sensitivity to Superoxide-mediated
Signal Transduction, J. Biol. Chem. 査読有 287,
2012, 35702-35708,
DOI: 10.1074/jbc.M112.395079

清水 透、中島 恭介、北西 健一、
小林 一雄、小林 長夫、Leu65 in the Heme
Distal Side is Critical for the Stability of the
Fe(II)-O₂ Complex of YddV, a
Globin-coupled Oxygen Sensor Diguanylate
Cyclase
J. Inorg. Biochem., 査読有 108, 2012,
163-170,
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.019

五十嵐 丈太郎、小林 一雄、松岡 有木、
A hydrogen-bonding network formed by the
B10-E7-E11 residues of a truncated
hemoglobin from *Tetrahymena pyriformis* is
critical for stability of bound oxygen and nitric
oxide detoxification,
J. Biol. Inorg. Chem., 査読有 16, 2011,
599-609,
DOI: 10.1007/s00775-011-0761-3

北西 健一、小林 一雄、内田 隆志、

石森 浩一郎、五十嵐 丈太郎、
Identification and functional and spectral
characterization of a globin-coupled histidine
kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5
J. Biol. Chem. 査読有 286, 2011,
35522-35534,

DOI: 10.1074/jbc.M111.274811

小林 一雄、水野 操、藤川 麻由、
水谷 泰雄、Protein Conformational
Changes in the Oxidative-Stress Sensor,
SoxR, upon Redox Change of the
[2Fe-2S] Cluster Probed with Ultraviolet
Resonance Raman Spectroscopy,
Biochemistry, 査読有、50, 2011,
9468-9474、

DOI: 10.1021/bi201526y

[学会発表](計 11 件)

- 1 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、鉄イオウタンパク質 (SoxR) におけるジニトロシル鉄錯体の生成初期過程、日本化学会、2014年3月28日、名古屋大(名古屋市)
- 2 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、パルスラジオリシス法で見る一酸化窒素と金属タンパク質との反応、第56回放射線化学討論会、2013年9月27日、広島大学(東広島市)
- 3 Kazuo Kobayashi, Mayu Fujikawa, and Takahiro Kozawa, Activation Mechanism in the [2Fe-2S] Oxidative-Stress Sensor SoxR ICBIC, 2013.7.23, Alpexpo center (Grenoble, France)
- 4 Mayu Fujikawa, Kazuo Kobayashi, and Takahiro Kozawa, Mechanism of Transcription Activation by SoxR Protein upon Redox Changes of the [2Fe-2S] Cluster Probed with Fluorescent Base, ICBIC, 2013.7.23, Alpexpo center (Grenoble, France)
- 5 Mayu Fujikawa, Kazuo Kobayashi, Takahiro Kozawa, The Initial Events in the Reaction of NO with [2Fe-2S] Cluster of SoxR Protein, Medical Redox Inorganic Chemistry, , 2013, 7, 21, Erlangen (Germany)
- 6 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、蛍光プローブ法で観る[2Fe-2S] クラスタを持つ転写因子に結合したDNAの構造変化、生体分子科学討論会、2013年6月7日、大阪大学(吹田)
- 7 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、一酸化窒素に反応する転写因子 SoxR の[2Fe-2S]クラスタにおけるジニトロシル鉄錯体の生成過程、日本化学会春季年会、2013年3月22日、立命館大学(滋賀県草津)
- 8 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、パルスラジオリシス法を用いたスーパーオキシドおよび一酸化窒素に反応する転写因子に関する研究、第55回放射線化学討論会、2012年9月27日、モンタナリゾート岩沼(宮城県岩沼市)
- 9 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、

[2Fe-2S]クラスタを持つ転写因子 SoxR のスーパーオキシドとの反応性とその生理的意義、日本生化学会近畿支部例会、2012年5月19日、京都大学(宇治市)

10 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、[2Fe-2S]クラスタを持つ酸化ストレスに反応する転写因子 SoxR とスーパーオキシドとの反応、日本化学会、2012年3月27日、慶応大(横浜)

11 藤川麻由、小林一雄、古澤孝弘、パルスラジオリシス法を用いた活性酸素に反応する転写因子(SoxR)の酸化還元挙動、第54回放射線化学討論会、2011年9月29日、大阪大学産業科学研究所(吹田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 一雄 (KOBAYASHI Kazuo)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 30116032