

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770161
 研究課題名（和文） 病原菌による生体鉄感知システムの解明
 研究課題名（英文） Heme-sensing ChrS/ChrA system from *Corynebacterium diphtheriae*

研究代表者
 伊藤 陽子 (ITO YOKO)
 独立行政法人理化学研究所・細胞極性統御研究チーム・特別研究員
 研究者番号：60584571

研究成果の概要（和文）：

ジフテリア菌の生体膜上に存在する二成分情報伝達系 *ChrS/ChrA* は、宿主に感染・増殖する際、宿主血液中のヘム濃度に応答する遺伝子として遺伝学的解析から発見されていた。しかし、その実体はわかっていなかった。

本研究では、この二成分情報伝達系のセンサー膜タンパク質 ChrS とレスポンスレギュレータータンパク質 ChrA を発現・精製し、より粒子径の小さい新規生体膜モデルのナノディスクに再構成することに成功した。それにより可能となった各種分光測定を行い、ChrS が第一膜貫通領域でヘムを配位結合することで認識して構造変化し、そのシグナルをリン酸基転移により ChrA へ伝達する「生体鉄感知システム」作用機構のモデルを立てた。

研究成果の概要（英文）：

To infect and proliferate in the host, pathogenic bacteria preferentially acquire iron derived from host Hb using iron-acquisition systems. *Corynebacterium diphtheriae*, a pathogen of diphtheria, conducts iron/heme-dependent regulatory ChrS/ChrA systems.

In the present study, the ChrS protein was solubilized and purified from the membranes of an *Escherichia coli* overproducer, and then incorporated into Nanodiscs. The reconstituted ChrS protein exhibited direct and specific heme recognition via His21 in its first transmembrane region, hemedependent autophosphorylation and phosphoryltransfer to ChrA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

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：ヘムセンサー 二成分情報伝達系 宿主-病原菌相互作用 ナノディスク

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原菌にとっても、鉄は重要

鉄は、ほぼすべての生物にとって必須の元素である。高等動物においては、好気呼吸や物質合成・

代謝酵素の活性中心として重要な働きを担っていることは周知であるが、病原菌においても鉄は必須元素である。病原菌は、宿主から鉄を獲得し、その鉄を用いて病原性因子を合成し、病原性を発

揮して増殖している。

(2) 病原菌のヘムから鉄を獲得する代謝機構 研究

病原菌の中では、ジフテリア菌による鉄源獲得機構の研究が進んでいる。ジフテリアは二種感染症（危険性が高い順に一類から五類）に指定される重篤な病気である。その原因菌であるジフテリア菌は、宿主のヘモグロビン等からヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を取込み、それを分解して病原性毒素合成のための鉄源としている。ジフテリア菌がヘムを細胞内に取り込むために必要なヘム輸送タンパク質の遺伝子、細胞内に取り込んだヘムを分解するタンパク質の遺伝子 *hmuO*、ヘムを細胞外へ排出するタンパク質の遺伝子 *hrtAB* はすでに同定されている。この *hmuO* プロモーター活性は、周囲の遊離鉄濃度が高い場合に鉄結合型ジフテリアトキシリンプレッサー（DtxR）存在下で抑制され、ヘムが存在する場合には促進される。最近、ヘム依存的に *hmuO* の転写を促進するトランスエレメントとして *chrS/chrA* 遺伝子が発見された。すなわち、*chrS/chrA* 遺伝子産物であるタンパク質 ChrS/ChrA は、宿主のヘム濃度を感知しヘム分解酵素遺伝子 *hmuO* 発現とヘム排出ポンプ遺伝子 *hrtAB* 発現を制御するタンパク質「生体鉄感知システム」と考える事ができる。しかし、その実態はわかっていなかった。

現在までに、ヘム輸送・分解・排出タンパク質群は、遺伝学的解析から、*Corynebacterium sp.* (ジフテリア菌), *Yersinia sp.*, *Neisseria sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) おいて同定されている。一方、宿主のヘム濃度を感知するタンパク質に関しては、ジフテリア菌由来 ChrS/ChrA [1999年 Schmitt.] と黄色ブドウ球菌由来 HssS/HssR [2007年 Skaar. ら] の2例のみが報告されているにすぎない。これは、両タンパク質ともに膜タンパク質であり、その単離精製、解析が困難であるためである。しかし、

両タンパク質ともに、病原菌による鉄獲得機構の第一段階、すなわち宿主のヘム(シグナル)感知という大事な事象を担っていることから、この機構を分子レベルで解明することは、生物学的に大いに意義がある。

2. 研究の目的

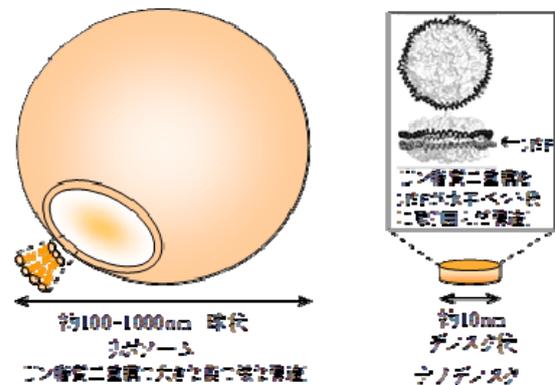
本研究では、このジフテリア菌の二成分情報伝達系 ChrS-ChrA システムをモデルとして「生体鉄感知システム」の作用機構を原子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) His10 タグ融合 ChrS 及び、GST タグ融合 ChrA において大腸菌を用いた大量発現・精製系を確立した。その際、界面活性剤の検討も行った。

(2) 新規生体膜モデルであるナノディスク

(下図) ヘ膜タンパク質ChrSを再構成した。



(3) (1)により、より粒子径が小さく、光散乱の少ない試料を得られたので、分光測定が可能となった。そこで、各種分光測定を行いChrS結合前後の鉄(ヘム)の状態を検出した。

(3) 構成的に高い自己リン酸化活性を示した ChrS変異体もナノディスクへ再構成して、ヘムの分光測定を行った。

(5) X線小角散乱によるChrSの構造変化の検出に取り組んだ。

(6) (5)と並行して、ChrS/A膜タンパク質複合体の結晶化に取り組んだ。しかし、本申請研究期間内に構造解析までには至らなかった。

(7)そこで更に、生体イメージングの手法を取り入れる方向で、研究を進め始めたところであった。

4. 研究成果

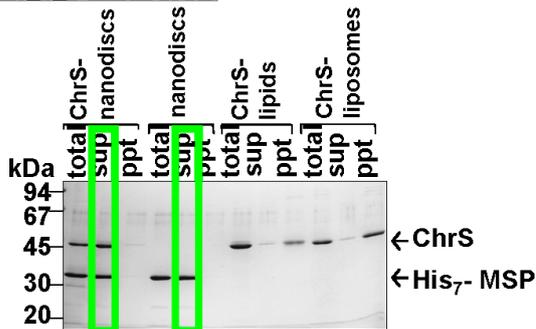
(1) ChrSは、SM, DM, DDMで可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィーで単分散のピークが得られる程の精度で精製出来た。ChrAも精製し、ヘム依存的なリン酸基転移も確認できた(下図C, D)。

(2) ChrSがナノディスクに再構成出来ていることを、超遠心による分画、アフィニティークロマトグラフィー、MALDI-TOF-MS測定により確認できた(下図A, B, E)。

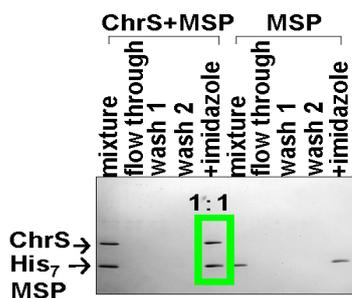
(3) ChrS-His21変異体も用いて、ヘムの各種分光測定が行えた(下図F, G, H)。

(4) X線小角散乱測定を行った(下図I)。

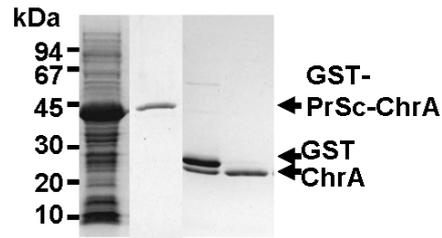
A. 超遠心による分画



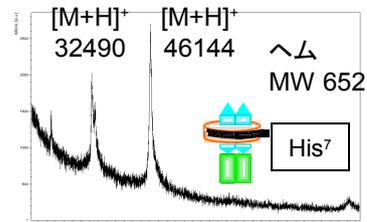
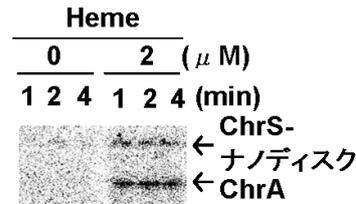
B. Niカラムによる分画



C. ChrAの発現・精製

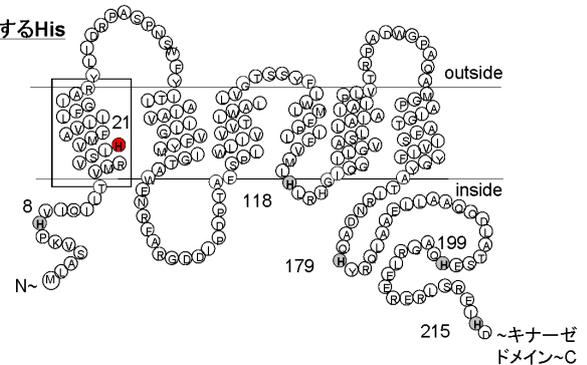


D. ChrS-ChrAのヘム依存的リン酸基転移

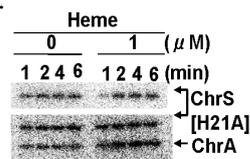


E. ChrS-ナノディスクのMALDI-TOF MSスペクトル

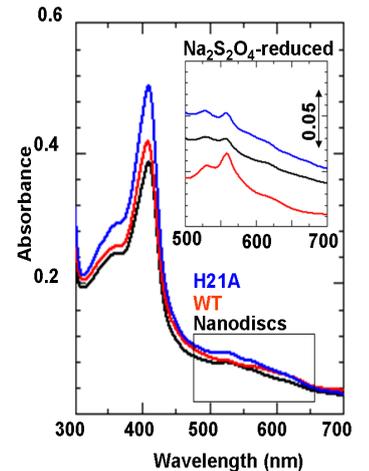
F. ChrSに存在するHis



G. リン酸基転移

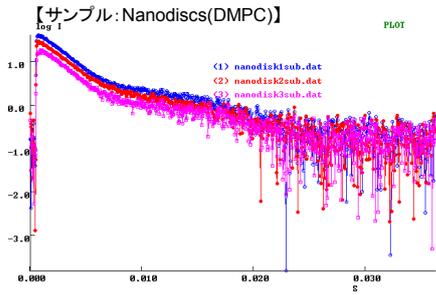


H. ヘムのUV-VIS吸収スペクトル



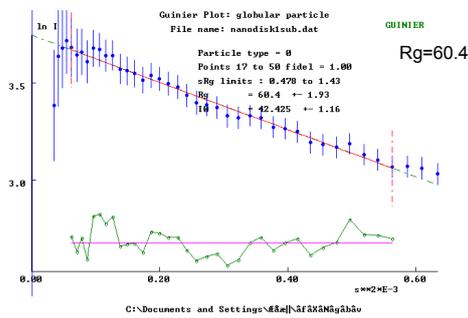
I.

ゼロ外挿濃度での散乱曲線



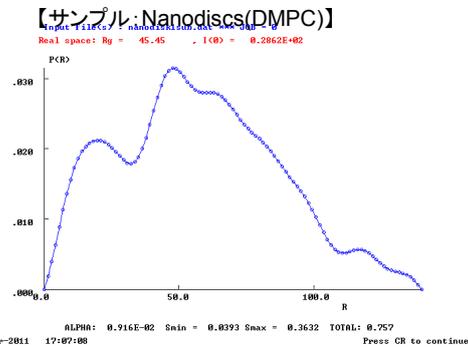
27-Apr-2011 13:59:53

guinier プロット



27-Apr-2011 14:34:26

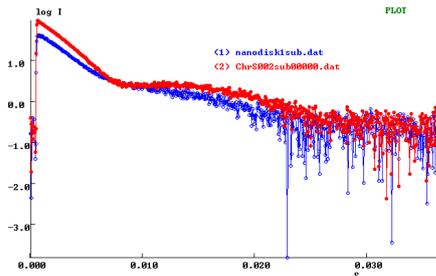
P(r) 関数



27-Apr-2011 17:07:08

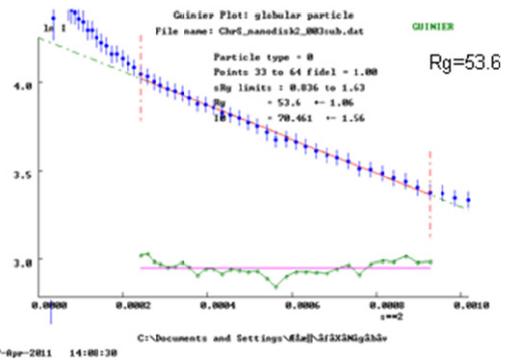
ゼロ外挿濃度での散乱曲線

【サンプル: ChrS-nanodiscs(DMPC)】



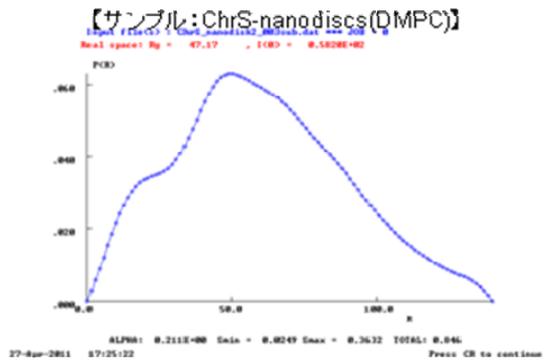
27-Apr-2011 13:58:37

guinier プロット



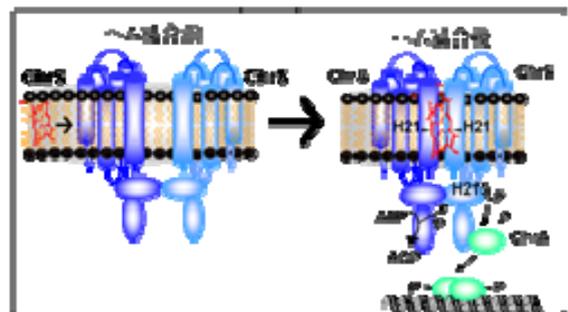
27-Apr-2011 14:00:30

P(r) 関数



27-Apr-2011 17:25:22

(5) 以上の結果より、膜タンパク質 ChrS が第一膜貫通領域に存在する His21 を軸配位子としてヘムを配位結合することで認識して構造変化し、そのシグナルをリン酸基転移により ChrA へ伝達する「生体鉄感知システム」作用機構のモデル(下図)を立てた。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 陽子 (ITO YOKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞極性統御研究チーム・特別研究員

研究者番号：60584571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし