

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550047

研究課題名(和文)生物の環境センシング機能を基盤とした高感度な環境汚染物質検出システムの構築

研究課題名(英文)Construction of sensing systems for environmental pollutions based on biological sensing function

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、高感度な環境汚染物質検出システム構築のために必須となる、環境汚染物質をセンシングするセンサータンパク質調製のための構造基盤解明を行った。具体的には、鉄錯体の一種であるヘム(鉄ポルフィリン錯体)をセンシングするための構造基盤を明らかにするため、ヘムセンシング能を有する二種のヘム輸送タンパク質(*Listeria monocytogenes*由来のHupDおよび*Corynebacterium glutamicum*由来のHmuT)を対象とし、X線結晶構造解析、および各種分光学的手法を用い、これらヘム輸送タンパク質によるヘム分子のセンシング、ならびにヘム結合反応の分子機構解明を行った。

研究成果の概要(英文): In this work, the structural basis of sensor proteins was elucidated for the construction of sensitive sensing systems of environmental pollutions. Especially, the structural and functional relationships of two heme transport proteins, HupD from *Listeria monocytogenes* and HmuT from *Corynebacterium glutamicum*, that have heme sensing ability was elucidated by X-ray crystallography and spectroscopic studies to understand the molecular mechanisms of heme sensing and binding.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：センサータンパク質 ヘムセンサー

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、外部環境シグナルを感知した後、そのシグナルに応答した遺伝子発現、細胞内代謝系、および運動性等制御に関与するセンサータンパク質に関する研究に取り組んできた。これらのセンサータンパク質が感知する外部環境シグナルとしては、酸素、一酸化炭素、一酸化窒素などの気体分子、重金属イオンなどの化学物質、光刺激などの物理的シグナルがある。申請者は、これらの中でも特に、気体分子をセンシングするためのセンサー活性中心としてヘムを利用している、ヘム含有型気体分子センサータンパク質を主な研究対象とし、それらの構造機能相関の解明を目指して研究を進めてきた。また、亜鉛イオン、ヘム(鉄ポルフィリン錯体)などをシグナル分子とする転写調節因子の構造機能相関解明に関する研究にも取り組んできた。これらの研究を進めるなかで、センサータンパク質を基盤として、重金属イオンや重金属含有化合物のような環境汚染物質を高感度に検出可能なシステムを構築できるのではないかとこの着想を得て、本研究を開始することとした。

2. 研究の目的

本研究では、高感度な環境汚染物質検出システム構築のために必須となる、環境汚染物質センサーの開発を目的とし、環境汚染物質をセンシングするセンサータンパク質調製のための構造基盤の解明を行う。

重金属イオンや重金属含有化合物のような環境汚染物質をセンシング可能なセンサータンパク質を調製するためには、それらセンサータンパク質の作動原理の解明が必要不可欠である。そこで本研究では、遷移金属イオン、あるいは遷移金属含有化合物のセンサーとして機能する可能性のあるタンパク質の幾つかを対象とし、これらセンサータンパク質の作動原理の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究で研究対象としたタンパク質はいずれも、大腸菌 BL21(DE3)株を発現用宿主、T7 プロモータを有する pET ベクターを発現用プラスミドとして使用して、組換えタンパク質として発現させた。等温滴定型カロリメトリー (ITC) 測定には、MicroCal iTC₂₀₀ を用いた。電子スピン共鳴 (EPR) スペクトルは、Bruker E680 を用いて測定した。

4. 研究成果

代表的な鉄錯体の一つであるヘム(鉄ポルフィリン錯体)をセンシングするための構造的基盤を明らかにするため、下記に示す二種のヘムセンシング(ヘム結合)能を有するヘム輸送タンパク質を対象とし、これらヘム輸送タンパク質によるヘム分子のセンシング、ならびにヘム結合反応の分子機構解明を行った。

(1) グラム陽性細菌 *Listeria monocytogenes* 由来 HupD は、本菌の細胞表層に存在し、ヘムトランスポーターである HupCG にヘム分子を輸送するヘム輸送タンパク質である。本研究では、大腸菌における HupD 発現系の構築を行った。HupD の N 末部分に存在するシグナルペプチドと推定される 20 残基を削除したもの (tHupD) を大腸菌で発現させたところ、tHupD は可溶性画分に発現し、均一な状態にまで精製することができた。精製した tHupD は、SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量測定の結果、モノマーとして精製されていることが分かった。

HupD によるヘムセンシング能を明らかにするため、アポ型 tHupD を用いたヘム滴定反応を行った。その結果、tHupD とヘム分子は、1:1 の結合比で複合体(ヘム結合型 tHupD)を形成することを明らかにした。ITC 測定の結果(図1)からも、tHupD とヘムの結合比が 1:1 であることが支持された。ITC 測定の結果、tHupD のヘム分子に対する解離平衡定数 (K_d) は、 6.45×10^{-9} M と、非常に高いヘム結合親和性を示し、tHupD が高感度なヘムセンシング能を有していることが分かった。酸化型 (Fe^{3+}) ヘム結合型 tHupD は、412、

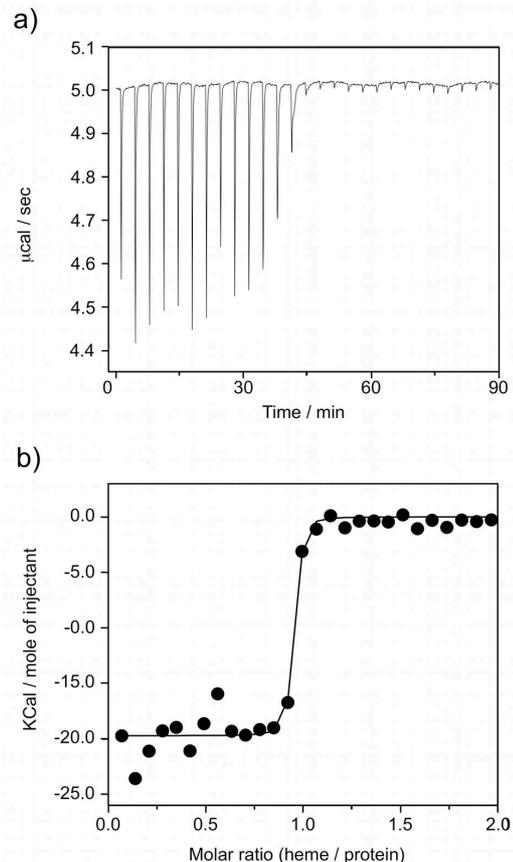


図1 (a) ヘム添加に伴う熱シグナル、(b) 解析データ

575、538 nm に、還元型 (Fe²⁺) ヘム結合型 tHupD は、425、530、561 nm に、それぞれ吸収極大をもつ uv/vis スペクトルを与えた。還元型 tHupD を CO ガスと反応させると、ヘム鉄に CO が結合した CO 結合型 tHupD (420、538、567 nm に吸収極大を示す) が生成した。酸化型 tHupD は、図 2 に示すような電子スピ

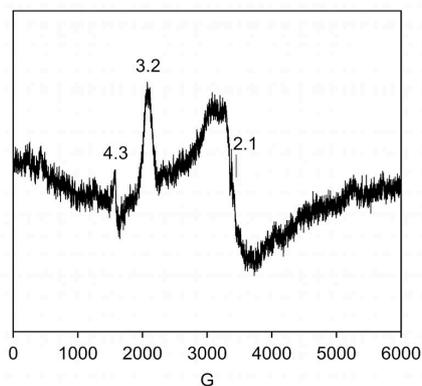


図 2 tHupD の EPR スペクトル

ン共鳴 (EPR) スペクトルを与えた。tHupD の EPR スペクトルは、二つのヒスチジン残基を軸配位子とするヘムタンパク質 (例えば、チトクローム b558) のものと類似していた。また、tHupD の共鳴ラマンスペクトル解析からも、ヘム結合型 tHupD 中のヘムは、二つのヒスチジンを軸配位子としていることを示

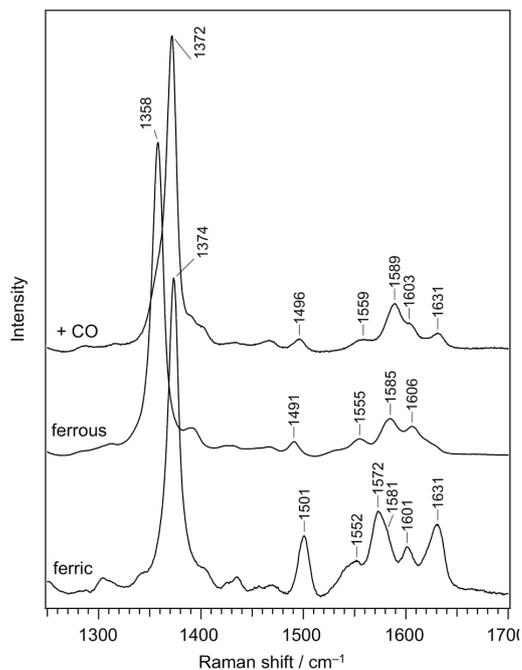


図 3 tHupD の共鳴ラマンスペクトル

(上段、中段、下段は、それぞれ CO 結合型、還元型、酸化型 tHupD のスペクトル)

唆する結果が得られた。(図 3)

ヘム結合型 tHupD におけるヘム軸配位子を同定するため、tHupD 中のヒスチジン (tHupD 中には、105、259、290 番目の位置に、三つのヒスチジンが存在している) をアラニンに置換した三種の変異体 (H105A-、H259A-、H290A-変異体) を調製し、それらの分光学的特性を野生型のものと比較検討した。その結果、H290A-変異体は野生型と同じ特性を示したのに対し、H105A-、および H259A-変異体は、下記に示すように、野生型とは異なる特性を示した。野生型 tHupD を大腸菌で発現させた際には、tHupD はヘム結合型とアポ型の混じりとして発現するのに対し、H105A-、および H259A-変異体は、完全なアポ型として発現した。このことは、H105A-、および H259A-変異体では、ヘム結合能が野生型に比べて低下していることを示唆している。H105A-変異体は、結合親和性は低下しているものの、ヘム結合型を形成した。その uv/vis スペクトル、および共鳴ラマンスペクトルを測定した結果、ヘム結合型 H105A-変異体中のヘムは、5 配位高スピン状態と 6 配位高スピン状態が混合した状態にあることが分かった。このことから、H105A-変異体中のヘムは、His259 が第 5 配位子として軸配位しており、第 6 配位座に水分子が配位した状態 (6 配位高スピン状態) と、第 6 配位座が空配位座となっている状態 (5 配位高スピン状態) の二つの状態を取っているものと推定される。一方、H259A-変異体は、特異的ヘム結合能を完全に失っていることが分かった。これらの結果より、tHupD によるヘム結合には、二つのヒスチジン (His105 と His259) が関与しているが、両者の役割は等価ではないことが分かった。すなわち、His105 が欠損しても、結合親和性は低下するものの、tHupD のヘム結合能は保持されているのに対して、His259 が欠損すると tHupD のヘム結合能は完全に失われてしまいます。したがって、tHupD によるヘムセンシング、ヘム結合には、His259 が必要不可欠であることが分かった。

(2) グラム陽性細菌 *Corynebacterium glutamicum* 中に存在する HmuTUV は、*Listeria monocytogenes* HupDGC と類似のヘム輸送システムである。HmuUV は、ヘムを輸送基質とする ABC トランスポーターとして、HmuT はトランスポーターである HmuUV へとヘムを輸送する基質 (ヘム) 結合タンパク質として機能する。本研究では、*Corynebacterium glutamicum* 由来の HmuT (CgHmuT) のシグナル配列を除き、その C 末端に 6xHistidine tag を付加したコンストラクトを作製し、大腸菌組換え系を用いて大量発現した。大腸菌で発現した HmuT は、ヘムを結合したホロ型 HmuT として精製することができた。精製した HmuT 中に含まれるヘムは、酸化型として存在していた。精製した酸化型 HmuT を用いて結晶化スクリーニングを行い、

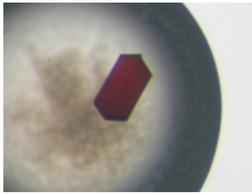


図4 CgHmuTの結晶

BL44XUを用いて、回折強度データを収集した。*Yersinia pestis*由来のHmuT (YpHmuT)の結晶構造を使って初期モデルを作成し、Phaser-MRを用いた分子置換法により位相決定した。AutoBuildとCootを用いて立体構造を構築・修正した後、phenix.refineによる構造の精密化を行った。

CgHmuT結晶は空間群 $P4_12_12$ に属し、格子定数は $a = b = 73.4$ 、 $c = 146.7$ 、非対称単位中にCgHmuTを1分子含んでいた。CgHmuTはN末端ドメインとC末端ドメインから構成されており、2つのドメイン間に形成されたクレフトにヘム1分子が結合していた(図5)。

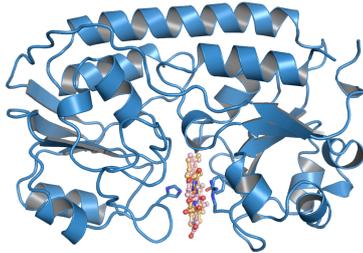


図5 CgHmuTの結晶構造

ヘムはN末端ドメイン中のHis141とC末端ドメイン中のTyr240を軸配位子とする6配位構造をとっていた。CgHmuTに結合したヘムは、ヘムの α - γ メソ炭素軸回りに互いに180度回転した二種類の配向が混在していた(図6)。CgHmuTのヘム結合クレフトには疎水性アミノ酸側鎖が存在しているが、いずれの結合様式においても、ヘムの側鎖と相互作用している残基は存在しない。また、ヘムプロピオン酸基と相互作用している残基も存在しなかった。これらの結果より、ヘム軸配

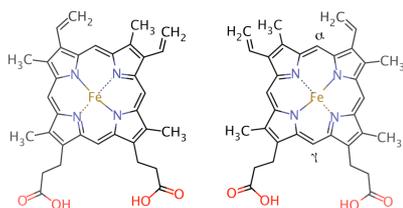


図6 ヘムの異なる配向

位子として機能するHis141とTyr240が、CgHmuTによるヘム分子の認識・捕捉に中心的な役割を果たしていると考えられる。

CgHmuTとYpHmuTのアミノ酸配列の相対性は低いにも関わらず、両者の結晶構造は類似していた。アミノ酸配列を比較すると、CgHmuTはYpHmuTに比較してN末端が50アミノ酸程度長い。CgHmuTのN末部分は、N末端ドメインからC末端ドメインへタンパク質全体を巻くように伸びていた。この点を除けば、両者の間に全体構造の大きな違いは見られなかった。しかしながら、ヘム結合部位には顕著な違いが見られた。YpHmuTがタンパク質1分子中に2分子のヘムを結合するのに対し、CgHmuTは1分子のみ結合している。

YpHmuTでは、クレフト中に2分子のヘムがスタックした状態で取込まれており、一方のヘムにはTyr70が、もう一方のヘムにはHis167が軸配位している。これに対して、CgHmuTは1分子のヘムを取込み、His140とTyr240がヘムに軸配位している。アミノ酸配列のアライメント上では、ヘムの軸配位子は保存されていないが、ヘムに配位するアミノ酸残基の種類としては保存されていた。CgHmuT中でヘム軸配位子として機能しているTyr240は、近傍に存在するArg242と水素結合を形成していると考えられる。YpHmuT中のTyr70とArg72との間にも、同様な水素結合が存在している。この水素結合が、HmuTのヘム結合親和性を制御している可能性が考えられるが、その詳細については現在検討中である。

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)

- (1) “Heme-binding properties of HupD functioning as a substrate-binding protein in a heme-uptake ABC-transporter system in *Listeria monocytogenes*” Y. Okamoto, H. Sawai, M. Ogura, T. Uchida, K. Ishimori, T. Hayashi, S. Aono, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2014**, 87(10), 1140-1146. 査読有り
doi: 10.1246/bcsj.20140166

[学会発表] (計 9件)

- (1) 村木則文、“コリネバクテリア由来HmuTの構造とヘム認識機構”、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年11月11日～11月13日、岡山大学(岡山県岡山市)
- (2) 村木則文、“ヘム取込み系で機能するHmuTのヘム認識機構”、日本結晶学会年会、2014年11月1日～11月3日、東京大学(東京都文京区)
- (3) 青野重利、“*Corynebacterium glutamicum*由来のヘム結合タンパク

- 質 HmuT の構造と機能”、第 1 1 4 回触媒討論会、2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日、広島大学（広島県東広島市）
- (4) 村木則文、“Structural basis for heme recognition by HmuT proteins in bacterial heme acquisition systems”、第 6 4 回錯体化学討論会、2014 年 9 月 18 日～9 月 20 日、中央大学（東京都文京区）
- (5) Shigetoshi Aono, “Structure and function of heme-uptake systems of Gram-positive bacteria”, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014 年 8 月 24 日～8 月 28 日, Zurich (Switzerland)
- (6) 村木則文、“Corynebacterium glutamicum 由来へム輸送タンパク質 HmuT の結晶構造解析”、第 1 4 回日本蛋白質化学会年会、2014 年 6 月 25 日～6 月 27 日、ワークピア横浜（神奈川県横浜市）
- (7) 村木則文、“Corynebacterium glutamicum のへム取込み系におけるへム結合タンパク質 HmuT の構造と機能”、第 4 1 回生体分子科学討論会、2014 年 6 月 6 日～6 月 8 日、九州大学（福岡県福岡市）
- (8) 青野重利、“Biological signal transduction using heme as a signaling molecule”、第 6 3 回錯体化学討論会、2013 年 11 月 2 日～11 月 4 日、琉球大学（沖縄県那覇市）
- (9) 岡本泰典、“Listeria monocytogenes のへム取込みに関与する HupD のへム結合挙動の解析”、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013 年 9 月 27 日～9 月 29 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

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