

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840027

研究課題名(和文) ビタミンB12を感光色素とする新規光センサーの構造機能研究

研究課題名(英文) Structure-function studies of B12-containing photosensor proteins

研究代表者

村木 則文 (Muraki, Norifumi)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：20723828

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、ビタミンB12を利用する新規な光受容体CarHとAerRにおける光応答の分子機構を解明するために、これらの構造機能解析を行なった。暗所において、アデノシルコバラミン(補酵素型ビタミンB12)が結合したCarHを調製、結晶化することで、光応答前のCarHの結晶構造解析に成功した。CarHはN末端側のDNA結合ドメインとC末端側のセンサードメインから構成されていた。センサードメインに結合したアデノシルコバラミンの光分解がCarHの高次構造の変化をもたらすという仮説を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Recently, a novel transcription regulator CarH has been characterized as a cobalamin-dependent photosensor. Though it is reported that CarH regulates the biosynthesis of carotenoids in response to light, the detail molecular mechanisms of light sensing and functional regulation of CarH in response to light were unclear. We determined the crystal structure of adenosylcobalamin-bound CarH from *Thermus thermophilus*. CarH consists of the N-terminal DNA binding domain and the C-terminal sensor domain. The adenosyl group of adenosylcobalamin stabilizes the conformation of the sensor domain. We assumed that loss of adenosyl group upon photosensing results in change of the quaternary structure from tetramer to monomer.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析 光センサー

### 1. 研究開始当初の背景

ビタミンB12 (コバラミン) は、異性化反応、メチル基転移反応、あるいは脱ハロゲン化反応を触媒する酵素の補欠分子族として機能することがよく知られている。一方で、補酵素型ビタミン B12 (アデノシルコバラミン) が高い光感受性を持ち、光分解することが 50 年以上前から知られていた。しかし、生物がビタミン B12 の光感受性を利用することは知られておらず、ビタミン B12 を感光色素とするセンサータンパク質の存在は近年まで明らかでなかった。

2011 年にビタミン B12 依存型転写因子 CarH/LitR が光受容体として機能することが報告された。非光合成細菌の中には光障害を防ぐためにカロテノイド色素を合成することがよく知られており、CarH は光依存的にカロテノイド合成酵素系の発現を調整する因子として見出された。さらに、2014 年にはビタミン B12 結合タンパク質 AerR が転写因子 CrtJ と光依存的に相互作用することが報告された。CrtJ は光合成タンパク質の発現に関与しており、AerR はその制御に関わっていることがわかった。いずれの系もアデノシルコバラミンが感光色素として転写調節に寄与しているが、アデノシルコバラミンの光依存的な構造変化が転写制御をもたらすシグナル伝達メカニズムについては不明な点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ビタミン B12 の新規機能である光センシングの分子機構を明らかにすることを目的とした。CarH と AerR について光応答の前後の立体構造を解析し、光応答に伴う動的な構造変化を捉えることが構造機能解明に不可欠であると考えた。

### 3. 研究の方法

本研究では、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* と粘性細菌 *Myxococcus xanthus* 由来の CarH、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* 由来の AerR を研究対象とした。

初めに、大腸菌発現系を用いて各タンパク質の大量調製を試みた。好熱性細菌由来 CarH (以下、TtCarH と略す) において、結晶化に適した高純度・高濃度の試料調製を確立した。その試料を用いて、光センサーとして機能する CarH の基本的な性質を調べた。

大腸菌から精製した TtCarH は単量体で存在していた。そこで、精製した TtCarH に暗所でアデノシルコバラミンを加えたアデノシルコバラミン結合型 CarH (AdoCbl-CarH) を調製したところ、AdoCbl-CarH は四量体構造を有していた (図 1)。これに可視光を照射すると単量体へと解離することも判明した。また、シアノコバラミン結合型 CarH (CNCbl-CarH) は、光照射の有無によらず単量体として存在することが分かった。

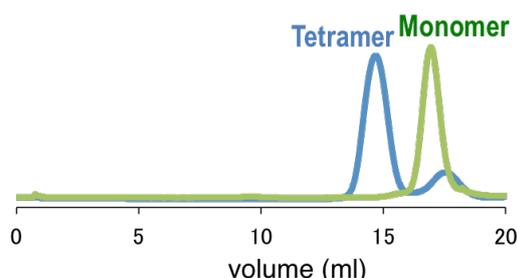


図 1. AdoCbl-TtCarH のゲルろ過クロマトグラフィの溶出チャート (光照射前を青色、光照射後を緑色で示した)

光照射による四量体から単量体への高次構造変化は不可逆的な変化であり、光照射後のサンプルを暗所に戻しても四量体へと戻ることにはなかった。CarH による DNA 結合反応の予備的な検討実験の結果、四量体構造を有している AdoCbl-CarH が DNA 結合能を有している一方で、単量体構造の CarH は DNA 結合能を示さないことが分かった。

そこで、DNA 結合能を有する TtCarH の結晶構造解析に取り組んだ。実験には暗所で赤色光 (660 nm) を用いることによって、AdoCbl の光分解を防ぐことで TtCarH 四量体を安定に保った。結晶化条件のスクリーニングの結果、PEG を沈殿剤とする条件で晶系の異なる 2 種類の結晶を得た (図 2)。これらの結晶を用いて、放射光施設 SPring-8 と NSRRC において回折データをそれぞれ収集し、構造計算を行なった。

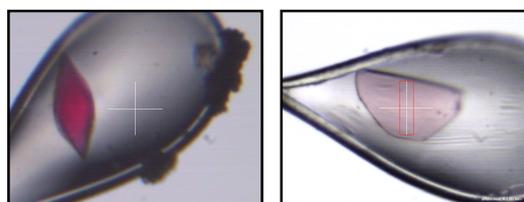


図 2. TtCarH の 2 種類の結晶

一方、粘性細菌由来の CarH は非常に沈殿しやすく、大腸菌破碎後に不溶化画分として得られた。AerR も同様に沈殿しやすかった。そこで、これら 2 者については、可溶性を高めるためにタグとなるタンパク質を付加した融合タンパク質を検討して、可溶性画分への移行を検討した。

### 4. 研究成果

暗所型 TtCarH は 2 種類の結晶から異なる 2 つのデータが得られた。一方の結晶 (図 2 左) から、N 末端 81 アミノ酸が切れた TtCarH の構造を 2.5 Å 分解能で決定した。もう一方の結晶 (図 2 右) から、TtCarH 全長の構造を 3.0 Å 分解能で決定した (図 3)。いずれも四量体を形成しており、光感知前の状態にある TtCarH の構造を反映していると考えられる。TtCarH プロトマーは 3 つのドメイン (N 末端側から順に DNA 結合ドメイン、helix-bundle ドメイン、Rossmann-fold ドメイン) から構成

されていた (図 4)。

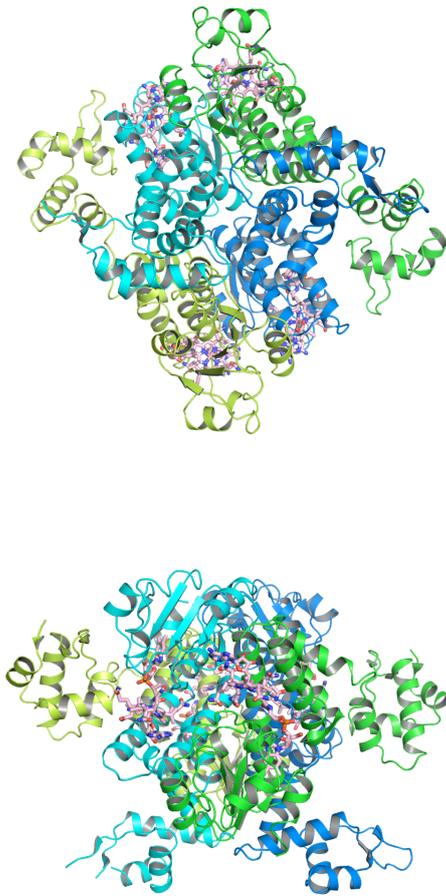


図 3. AdoCbl-TtCarH の全長構造  
四量体を構成する分子をリボンモデルで示した。緑系色と青系色の 2 分子を単位とする dimeric-dimer 構造を形成していた。AdoCbl はピンク色の stick モデルで示した。

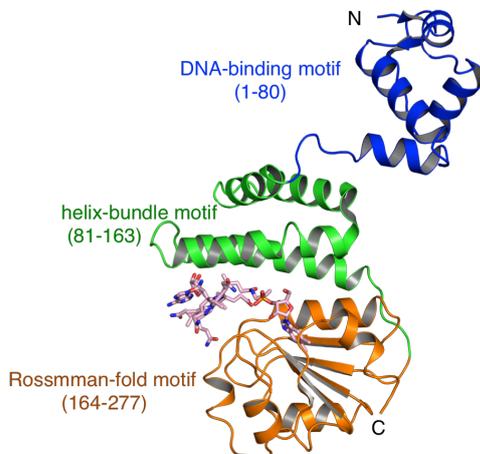


図 4. TtCarH のドメイン構造  
図中に示すように各モチーフを色分けして示している。

DNA 結合ドメインは 4 本の  $\alpha$ ヘリックスと 2 本の短い  $\beta$ シートから構成され、代表的な DNA 結合モチーフの一つであるヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) モチーフが存在していた。helix-bundle ドメインは 4 本の  $\alpha$ ヘリックス、Rossmann-fold ドメインは 5 本の  $\alpha$ ヘリックスと 5 本の  $\beta$ シートから構成されており、この二つのドメインが合わさってセンサードメインとして機能していると考えられる。TtCarH センサードメインの立体構造は、コバラミンを補酵素とする B12 酵素 (例えばメチオニン合成酵素 MetH など) に類似していた。AdoCbl は、helix-bundle ドメインと Rossmann-fold ドメインに挟まれる形で TtCarH に結合していた (図 4)。一部の B12 酵素で見られるようなコバラミン分子中の dimethylbenzimidazole 基のコバルトイオンへの配位は見られず、代わりに His177 がコバルトイオンに軸配位していた。His177 のトランス位に存在するアデノシル基が、第 6 配位子としてコバラミン分子のコバルトイオンに軸配位していた。

AdoCbl-CarH が四量体として存在するのに対し、CNCbl-CarH は単量体として存在する。このことから、アデノシル基とシアノ基の大きさの違いが CarH の高次構造の違いをもたらしている可能性が考えられる。これまでの研究で、AdoCbl 溶液に光照射すると、アデノシル基が Cbl から解離し、水酸基が Cbl に配位したヒドロキソコバラミンが生成することが報告されている。これらの知見から、AdoCbl-CarH が光感知すると、アデノシル基に代わって水酸基が配位したヒドロキソコバラミン結合型 CarH が生成することで、光依存的な CarH 高次構造変化が誘起されるという仮説を提唱した。今後は光照射後の AdoCbl-TtCarH あるいは AdoCbl 以外のコバラミン誘導体が結合した TtCarH の結晶構造を決定して、光照射に伴う構造変化を捉え、仮説を立証したいと考えている。

粘性細菌由来の CarH は大腸菌発現系では不溶性画分に得られた。可溶性を高めるために Flag-Acidic-Target-tag を付加したコンストラクトを試したが、凝集する傾向にあり、結晶化は困難だと判断した。

AerR は Flag-Acidic-Target-tag や SUMO-tag を利用することで不溶性画分への移行を促すことに成功した。しかし、いずれも収量が著しく低いことや高濃度に濃縮すると凝集・沈殿することから、結晶化には至らなかった。今後は凝集・沈殿対策として、グリセロールやアルギニンなどの凝集防止効果のある試薬の検討を進めたい。

#### 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 3 件)

- ① Muraki N, Kitatsuji C, Ogura M, Uchida T, Ishimori K, Aono S., "Structural

Characterization of Heme Environmental Mutants of CgHmuT that Shuttles Heme Molecules to Heme Transporters.” Int J Mol Sci., 査読あり, 17(6), 2016  
doi: 10.3390/ijms17060829.

- ② Muraki N and Aono S., “Structural Basis for Heme Recognition by HmuT Responsible for Heme Transport to the Heme Transporter in *Corynebacterium glutamicum*” Chem. Lett., 査読あり, 45(1), 24-26, 2015  
doi: 10.1246/cl.150894
- ③ Mutoh R, Muraki N, Shinmura K, Kubota-Kawai H, Lee YH, Nowaczyk MM, Rögner M, Hase T, Ikegami T, Kurisu G., “X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin.” Biochemistry, 査読あり, 54(39), 6052-61., 2015  
doi: 10.1021/jbc.M113.477612.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Norifumi Muraki, “Crystal structure of a photosensor CarH using adenosylcobalamin as a photosensing unit”, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2016 年 12 月 4 日～12 月 9 日, The University of Auckland (New Zealand)  
Best Poster Award 受賞
- ② 村木 則文, “新規な光受容体型転写因子 CarH の結晶構造解析”, 平成 28 年度日本結晶学会年会, 2016 年 11 月 17 日～11 月 18 日, 茨城県立県民文化センター (茨城県水戸市)
- ③ 村木 則文, “ビタミン B12 を光センサーとして用いる転写調節因子の構造基盤”, 2016 年 9 月 7 日～9 月 9 日, もてなしドーム (石川県金沢市), 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム  
ポスター賞受賞
- ④ 村木 則文, “光センサーとして機能するコバラミン含有型転写因子 CarH の構造と機能”, 第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2016 年 6 月 17 日～6 月 18 日, 北海道大学 (北海道札幌市)
- ⑤ 村木 則文, “ビタミン B12 を利用した光受容体型転写因子 CarH の構造解析”, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年 6 月 7 日～6 月 9 日, 福岡国際会議場

(福岡県福岡市)

- ⑥ 村木 則文, “コバラミンを有する新規な光受容体 CarH の構造と機能”, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 24 日～3 月 27 日, 同志社大学 (京都府京田辺市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村木 則文 (Muraki, Norifumi)  
分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究  
領域・助教  
研究者番号 : 20723828

(4) 研究協力者

青野 重利 (Aono, Shigetoshi)