

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570102
 研究課題名（和文） 枯草菌ストレス応答系シグナル伝達機構の構造生物学
 研究課題名（英文） Structural Biology on Signal Transduction of Stress Response in *Bacillus subtilis*
 研究代表者
 熊坂 崇（KUMASAKA TAKASHI）
 財団法人 高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門 構造生物グループ・グループリーダー 副主席研究員
 研究者番号：30291066

研究成果の概要：

生命活動の維持に必須なストレスへの応答においては、そのシグナルを受け取って遺伝子の発現につなげる分子機構が働いている。微生物における機構の解明を目指し、関連する蛋白質群の構造と機能の解析を行った。栄養飢餓のストレスシグナルを受容する蛋白質 RsbP について結晶構造を解明した。これにより、分子中央部にある空間に結合するとされる未知のシグナル分子探索の基礎を確立した。環境ストレスシグナルの調節に関わる金属ホスファターゼである RsbX についても立体構造を解明した。これまでに類似の構造は明らかと成っておらず、触媒反応の機構解明につながる情報が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：構造生物学・蛋白質結晶学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：シグナル伝達、ストレス、枯草菌、結晶構造解析、分子認識

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレス応答

ストレスは生命の活動にとって脅威であるが、それらへの対処法はすでに遺伝情報の中に折り込まれている。微生物はストレスに遭遇すると、増殖と代謝を抑制して活発な活動を行わない定常期のフェーズに入り、熱や化学物質などへのストレスには迅速に対応することが明らかとなっている。しかしながら、栄養が多く、ストレスが少ない増殖期の生命メカニズムの研究に比べると、その分子

機構は十分に解明されているとは言いがたい。また、定常期には、抗生物質などの二次代謝が活発になることや、病原菌が病原性を発現することが明らかとなっている。微生物の利用や病原性の制御などとも関係が深く、その分子メカニズムの解明が待たれている。

(2) 枯草菌

代表的なグラム陽性菌である枯草菌は、グラム陰性の大腸菌と並んで多くの研究が進められている。芽胞形成など細胞分化に関す

る分子生物学的研究は活発に行われ、知見も多いが、それに比べて構造生物学的な知見は少なく、それらの研究によって、さらに分子機構が詳細に解明できる可能性を持っている。

(3) 枯草菌の一般ストレス応答系

この機構については、ストレス応答蛋白質の発現を制御する RNA polymerase の σ 因子である SigB と、その活性を制御する Rsb 蛋白質群について、分子生物学的な研究がなされ、図 1 のようなネットワークが明らかとなっている。Small GTPase などからのストレスシグナルの伝達経路は真核生物にも類似しており、その分子機構は興味深いものの、分子構造は明らかになっておらず、立体構造の解明が待たれている。

2. 研究の目的

(1) 未知のシグナル伝達経路の解明

微生物においても、ストレス応答の全貌は明らかとなっていない。枯草菌では、エネルギーストレスを伝達する低分子化合物の特定もできていない。これらの探索のために立体構造に基づいたバイオインフォマティクス的手法を援用できるように構造情報を解明する。

(2) 分子認識機構の構造生物学的な解明

Rsb 蛋白質群は主として 3 つの要素(キナーゼ、ホスファターゼ、STAS)の遺伝子重複からなっている。相同性の高いこれらの分子間での認識機構について、分子構造の観点から解明する。また、普遍的な経路でもあることから、他の種における分子機構の理解にもつなげることを期待して行う。

(3) シグナル伝達系の解明に向けた基本情報の確立

シグナル伝達に関わる分子機構について、詳細な分子構造と分子認識機構の観点から解明する。適切なストレス情報の伝達には解離会合反応の係数が重要な意味を持っている。これらを立体構造から推定するための基盤情報を収集し、情報伝達メカニズムのシミュレーションや、*in vivo* での検証実験につなげ、システム生物学の発展に寄与したい。

3. 研究の方法

(1) 試料の調製

RsbP, RsbQ, RsbX, RsbT, RsbR, RsbS について、大腸菌での蛋白質発現系を構築し、アフィニティークラムを用いた簡便かつ高純度な調製系を確立した。また、電気泳動法や分子ふるい法などを用いて、分子の会合状態の解明も進めた。

(2) 結晶解析法

蛋白質の立体構造を詳細に決定するために、結晶解析法を用いた。(1)で得られた高純度試料を高濃度に濃縮し、条件検討を行って、結晶を得る。得られた結晶は、放射光施設を用いて高精度のデータ収集を行い、異常分散法などを併用しながら、立体構造を決定した。

(3) X 線小角散乱法(SAXS)

一般に蛋白質の結晶化は必ずしも成功率は高くなく、本研究のように単一生物種に限定された蛋白質群を解析する際には、制約も大きいために困難が予想された。そこで、会合状態などの構造情報を解明するため、溶液条件で測定可能な手法として利用した。

(4) 酵素活性測定

関連する酵素反応はエステルの分解や脱リン酸化などの加水分解反応であり、合成基質による活性測定が容易に行える。構造と機能の相関を解明するために、活性発現に必要な条件を検討した。

4. 研究成果

図 1 に示すように、多くのタンパク質が関与する系であるが、本研究課題では 5 つのタンパク質について結果が得られている。以下それぞれについて述べる。

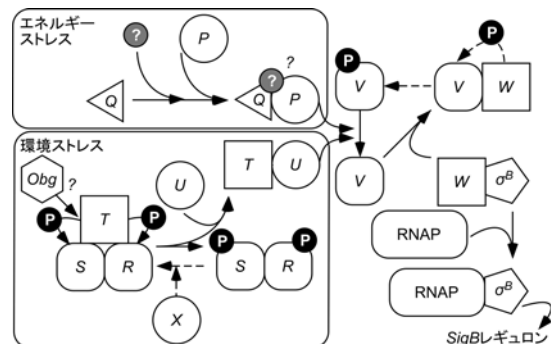


図 1 : 枯草菌一般ストレス応答系

(1) RsbQ の基質特定

α/β -hydrolase ファミリーに属するエステラーゼである RsbQ は、その基質が不明であった。ゲノム研究により明らかとなっているこの種のエステラーゼの多くは、基質や機能がはっきりしていない。得られた構造から機能を推定するため、種々の構造類似の蛋白質との比較を行なった。その結果、合成基質の分解反応に対して阻害能を有する分子を特定することに成功した。また、基質候補との複合体結晶の作成に成功している (図 2)。現在、その詳細について検討を進めている。

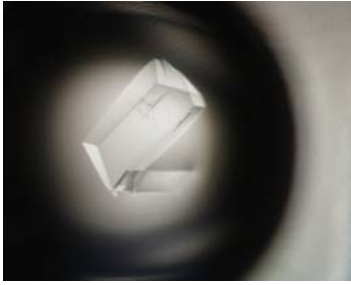


図 2 : RsbQ の結晶 (200 ミクロン程度)

(2) RsbP の立体構造解析

RsbP 蛋白質は高濃度に濃縮すると 8 量体以上となり、結晶化が困難であった。そこで、まず N 末端にある PAS ドメインのみを発現させ、SAXS により会合状態を調べた。分子ふるい法では 4-8 量体の会合を示唆したものの、SAXS 法では種々の溶液条件で、2 量体であることが明らかとなった。この結果を受けて、結晶化を進めたところ、良質な結晶を得ることが出来 (図 3)、解析に成功した (図 4)。得られた立体構造は、2 量体が機能単位であることを示しており、また、分子内部に疎水性の空間を有していた。これらの成果を現在報文としてまとめている。

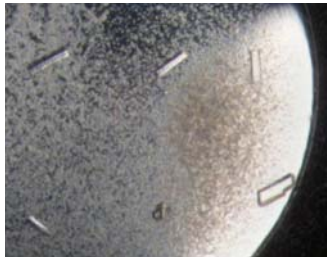


図 3 : RsbP-PAS の結晶



図 4 : RsbP-PAS のリボンモデル

一般に PAS ドメインは光や酸化還元、酸素などを受容して、分子の会合状態を変化させ、シグナルに応答して活性発現する機能単位である。従って、本蛋白質も何らかの分子結合により、C 末端部にあるホスファターゼ活性を発現すると考えられるものの、疎水性の空間はそのサイズからは直接的な相互作用を認めるのは難しい。これらと(1)の結果を踏まえ、現在は活性発現条件の検索を行っている。

(3) RsbX の立体構造解析

RsbX 蛋白質は PPM ホスファターゼであり、巨大分子を形成する Stressosome RsbRST 複合体の脱リン酸化によって、ストレスシグナルを解消する役割を担っていることが分かっていた。また、同じ Rsb 蛋白質群には相同性の高い RsbP, RsbU が存在し、それらの共通基質である RsbV とどのように基質を区別しているのかの機構が不明であったため、構造決定を進めた。結晶は PEG を沈殿剤とする条件で得られ、1.0Å 分解能に迫る高精度の回折強度データが収集できた (図 5)。得られた構造は、これまでに明らかとなっている同種の蛋白質(ヒト PP2C, 結核菌 PstP など)と基本的には類似であった (図 6)。しかし、RsbX はこれらより分子量が小さく、活性中心に程近い場所にあるモチーフの「フラップ領域」を欠いている一群の蛋白質とサブファミリーを形成している。PPM ファミリーの酵素は 2-3 核の Mn あるいは Mg イオンを活性中心に持つが、このフラップ領域は第三の金属イオンの配位と安定化に関与しており、細胞内金属イオン濃度の調節機構によって、活性制御がなされていると考えられている。RsbU では Mn の取り込みと活性制御の関係が他のグループにより示唆されているが、本酵素と同様にその機能部位を欠いており、それ以外の何らかの調節機構があるものと考えられる。現在は、その機構について、更なる検討を進めながら、報文を作成している。



図 5 : RsbX の結晶 (太さ 50 ミクロン程度)



図 6 : RsbX のリボンモデル

(4) RsbS の結晶化

環境ストレス応答に中心的な役割をもつ巨大分子 Stressosome を構成する RsbS は STAS ドメインからなる蛋白質である。この

蛋白質が RsbX によって脱リン酸化されると、ストレスシグナルは消滅することが分かっている。RsbX の構造が決定されたことを受けて、そのパートナーである RsbS の詳細な立体構造を解明するために、結晶解析を進めている。これまでの条件検討によって、図7のような結晶が得られている。現状では最大分解能が 6.5Å と低いために、解析には至っていないが、今後も継続して高分解能化を図り、分子認識の機構を解明することを目指す。



図7：RsbS の結晶（左端の結晶 50 ミクロン程度）

(5) RsbR の試料調製

RsbR は Stressosome の主要構成蛋白質で、多量体を形成した分子モデルが CryoEM で明らかとされた。しかし、詳細な分子モデルの解明には至っていない。

大腸菌で発現した試料を高純度に精製し、結晶化を試みている。20Å 分解能程度の回折点が得られているが、解析には不適當であるが、今後はより高分解能の結晶を得るべく、条件検討を進める。

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）

①Makino, M., Kondo, S., Kaneko, T., Baba, S., Hirata, K., Kumasaka, T. Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the PAS domain of RsbP, a stress-response phosphatase from *Bacillus subtilis* *Acta Cryst.* **F65**, 559-561 (2009) 査読有

〔学会発表〕（計2件）

①Makino, M., Kumasaka, T. Crystallographic analysis of the PAS domain of RsbP, a stress-response phosphatase in *Bacillus subtilis* ECM25, Istanbul, 2009

②近藤晋平, 熊坂崇 枯草菌由来ホスファターゼ RsbP の精製と結晶化, 日本結晶学会 2007 年度年会, PC-71, 東京, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊坂 崇 (KUMASAKA TAKASHI)

財団法人 高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門 構造生物グループ・グループリーダー 副主席研究員

研究者番号：30291066

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者