

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510234

研究課題名（和文） 藍色細菌における必須重金属イオンの細胞内濃度制御機構解明と環境改善への応用

研究課題名（英文） Studies on the regulatory systems for the concentrations of cytosolic heavy-metal ions those are indispensable to cyanobacterial physiology, and application of this systems to the phytoremediation.

研究代表者

森田 勇人（MORITA HAYATO）

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：50274303

研究成果の概要（和文）：藍色細菌の細胞内重金属イオン濃度センサーならびにメタロチオネン様タンパク質等の発現制御因子としての2つの機能を併せ持った SmtB ファミリーの構造機能相関を解明するとともに、藍色細菌の重金属耐性を調節するための変異導入 SmtB の設計法を開発した。

研究成果の概要（英文） Interrelationships between the structures and the functions of SmtB family proteins, those are bifunctional proteins as the sensor for cytosolic heavy metal ion concentration and as the transcriptional factors, are cleared, and the way to design the genetically modified SmtB family proteins to adjust the tolerance of cyanobacterial cells to the heavy metal ion stress is developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質、細胞内重金属イオン濃度制御

## 1. 研究開始当初の背景

重金属イオンは蛋白質の機能発現（＝細胞の生命活動）にとって必須の微量元素であるとともに、環境ストレスの一つであり、その細胞内濃度維持機構は、ホメオスタシスと環境耐性の観点から重要な問題の一つである。本研究では、ジンクフィンガータンパク質の機能発現などにその存在が必須である、亜鉛イオンに着目し、その細胞内濃度調節機構のホメオスタシスと環境耐性との両面からの構造生物学的解明と、遺伝子組換えによる細胞

内亜鉛イオン蓄積能の強化による環境浄化生物としての応用の可能性を模索することを計画した。細胞内亜鉛イオン濃度センサーの機能と、細胞内の過剰亜鉛イオン濃度を低下させる機能を持つタンパク質（メタロチオネンや亜鉛イオンのトランスポーター等）の発現誘導機能を併せ持つ SmtB は当初、藍色細菌 *Synechococcus* PCC. 7942 において発見されたが、その後のゲノム解析の結果、他の藍色細菌においてもその存在が明らかになったことから、SmtB による細胞内亜鉛イオン濃度

調節機構は藍色細菌にとって、普遍的な、恒常性維持・環境耐性の分子機構の一つであると考えらるに至った。

一方、ストレスとなる亜鉛イオン濃度は、藍色細菌の種類により異なっており、その相違が SmtB ファミリーの亜鉛イオンに対する親和性の違いに由来するか、細胞膜表面に存在するトランスポーター活性の相違に由来するかは未だ明らかにされていなかった。

一方で、環境耐性の分子機構の中でも特に重金属イオン耐性については、フリーのメタルイオンの寿命金属結合タンパク質との結合による無毒化という極めて化学的な側面が強い。そのような生理学的現象を理解するにはタンパク質の物理化学的解析手法による化学的解明が最短の方法であり、研究代表者はタンパク質の構造機能相関解析の専門家であることから、金属イオンとタンパク質との親和性をタンパク質の立体構造の観点から明らかにすることで、タンパク質工学的手法でより多種類の金属イオンへの親和性が高いタンパク質を作製するとともに、それらのタンパク質を細胞中で発現させることで、環境中の有害金属の効率的回収や、より感度の高い環境汚染マーカーとなる生物の作出が可能であると判断した。

## 2. 研究の目的

重金属イオンは生命活動にとって必須の微量元素であるとともに過剰に存在すると環境ストレスの1つとなり、その細胞内濃度調節機構は、ホメオスタシスと環境耐性の観点から重要である。本研究では、藍色細菌中に幅広く見出されてきている、重金属濃度センサーと転写因子の機能を併せ持つ SmtB による細胞中の重金属イオン濃度制御機構解明を目指した。本研究により、藍色細菌の細胞内重金属イオン濃度調節機構を「セルセンサーの環境適応と生存応答」という観点から構造化学的に理解するとともに、新たな環境改善生物資材としての応用を目指した。

## 3. 研究の方法

以上の目的を達成するために、本研究では以下の解析を行った。

### (1) SmtBファミリーの重金属イオンならびに認識DNA配列との結合親和性の評価 (森田、林)

SmtB ファミリーの重金属イオンや認識塩基配列への結合活性をゲルシフトアッセイ法などにより解析することで、亜鉛イオンを初めとする重金属イオンとの結合親和性やDNA結合活性に関与すると考えられる変異を選び出すとともに、SmtBファミリーとの結合活性に重要な認識塩基配列上の構造要因を同定した。

### (2) DNAや重金属イオンへの異なる親和性を

### 示す SmtB ファミリーの構造機能相関 (森田)

安定同位体標識法を併用した多次元 NMR 分光法やゲルシフト法を用いて SmtB ファミリーの構造機能相関を解析することで、*Synechococcus* sp. PCC. 7942 と *Synechocystis* sp. PCC. 7002 由来の SmtB の構造上の差異と機能の差異との相関を解析した。

### (3) 変異導入SmtB の作製と重金属親和性ならびにDNA 結合活性の評価 (森田、林)

亜鉛イオンを初めとする重金属イオンとの結合親和性やDNA 結合活性に重要なアミノ酸残基に対し変異を導入することで、SmtB の亜鉛イオン検知感度や亜鉛イオン以外の金属イオン検知活性を改変した変異 SmtB を設計するとともに、作製した変異 SmtB の重金属イオンや、認識塩基配列への結合活性についてゲルシフトアッセイ法などにより解析した。

### (4) 変位導入SmtBを発現する藍色細菌

#### *Synechococcus* PCC 7942 の作製とその重金属ストレス耐性の解析 (森田、林)

(3) までの研究で設計した、異なる亜鉛イオン濃度親和性や幅広い金属イオンに対し高い親和性を持つ変異導入 SmtB を発現する淡水性藍色細菌 *Synechococcus* PCC. 7942 を、遺伝子組換え技術により作製した。作製した組換え体の細胞内重金属イオン蓄積量についての評価を現在も継続して実施している。

## 4. 研究成果

3年間にわたり、3. で述べた観点から研究を行うことで以下の事を明らかにした。

(1) センサー部位のみに亜鉛イオンが結合する SmtB のモデル系として、第IVヘリクス (SmtB 二量体形成部位) のヒスチジン残基に点変位を導入した変位 SmtB を作製し、亜鉛イオンによる SmtB の認識塩基配列への結合活性の阻害効果をゲルシフトアッセイ法により評価した。その結果、亜鉛イオンのリガンドとして機能しているヒスチジン残基に点変位を導入した変位 SmtB では、亜鉛イオンによる SmtB-DNA 複合体形成阻害効果が著しく減少することがわかった。また、亜鉛イオン添加に伴う変位 SmtB の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル変化の観測においても、変位を導入していない SmtB より高濃度の亜鉛イオンの添加が必須であった。これらの結果から、SmtB の二カ所の亜鉛イオン結合部位への亜鉛イオンの同時結合が、DNA 結合活性の低下に必須であることがわかった。

(2) SmtBファミリーと認識塩基配列を含むオペレーター/プロモーター領域との複合体形成において、構成される複合体のサイズの種類は、SmtBファミリーのDNA結合ヘリックスのアミノ酸配列だけでなく、オペレーター/プロ

モーター領域の塩基配列が重要であることを明らかにした。なお、この解析結果を得る過程で、認識塩基配列に対するSmtBファミリーの結合親和性を制御するアミノ酸残基を特定した。

(3) 亜鉛イオンによるSmtBファミリーと認識塩基配列との複合体形成阻害効果の大きさは、SmtBファミリーの亜鉛イオン結合部位の構造により決定されることを明らかにした。なお、この解析結果を得る過程で、亜鉛イオンの配位子となるアミノ酸残基を特定すると共に、亜鉛イオンとの結合に伴う構造変化の情報を、DNA結ヘリックスを含む領域へ伝達する役割を果たすアミノ酸残基も特定するとともに、分子内情報伝達機構を推定した。

(4) 藍色細菌 *Synechococcus* sp. PCC 7942 由来の SmtB のアミド末端領域のCys14 に変位を導入したSmtBならびに、アミド末端を異なる長さ欠失させた変異 SmtB を作製し、*smtA* のコード領域に対するオペレータ/プロモータ領域への結合親和性並びに、亜鉛イオンによる結合活性阻害をゲルシフト電気泳動法により解析した。その結果、亜鉛イオンによる結合活性阻害効果には、Cys14の存在が重要であり、Cys14よりアミド末端側のアミノ酸残基の長さは、殆ど影響が無いことがわかった。このことから、*Synechocystis* sp. PCC 7002 由来の SmtB との重金属による認識 DNA 結合活性阻害効果の差異は、7942由来の SmtB の Cys14 に相当する部位のアミノ酸が 7002 由来の SmtB では欠損していることに起因することがわかった。さらに、Cys61, His97 に相当するアミノ酸もそれぞれ R, N に置換されており、SmtB 二量体分子の両サイドに存在する重金属イオン結合サイトへの重金属結合親和性は 7942 由来の SmtB に比べ、7002 由来の SmtB では著しく低いと考えられる。一方、二量体を構成する分子間の重金属結合部位を構成するアミノ酸は完全に保存されており、これは、7002が7942より高い濃度で重金属ストレス応答を示すための構造要因であると結論した。

(5) これらの研究成果をもとに、異なるSmtBファミリー由来のアミド末端領域とそれに続くコア領域とを組み合わせることで亜鉛イオン濃度の検出感度や亜鉛イオン以外の金属イオン検知能を調節したキメラSmtBの大量発現系を作製した。さらに、これらキメラSmtBを発現する*Synechococcus* sp. PCC 7942を作製した。現在ゲルシフト法やNMRタイトレーション法などにより、キメラSmtBの亜鉛イオンを初めとする重金属イオンとの結合親和性やDNA結合親和性の定量的解析を行うとともに、重金属ストレス耐性との相関解析を進めている。

## 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 7 件)

① Morita EH, Kawamoto S, Abe S, Nishiyama Y, Ikegami T, Hayashi H., Comparative study of the different mechanisms for zinc ion stress sensing in two cyanobacterial strains, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Biophysics, 査読有, 8, 2012, pp. 103-109, DOI:10.2142/ biophysics.8.103

② Nagano T, Kojima K, Hisabori T, Hayashi H, Morita EH, Kanamori T, Miyagi T, Ueda T, Nishiyama Y., Elongation factor G Is a critical target during oxidative damage to the translation system of *Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.*, **287** (34), 2012, pp. 28697-28704, DOI: 10.1074 /jbc.M112.378067

[学会発表] (計 14 件)

① E.H. Morita, MS. Rahul, H. Hayashi, T. Ikegami, S. Abe, Structural analysis of the molecular mechanism for the resistance to heavy-metal ion stresses in cyanobacteria.. 第54回植物生理学会年会、平成25年3月21日、岡山大学

② 9 M.S. Rahul, H. Hayashi, S. Abe, E.H. Morita, Molecular insights into the different mechanisms of heavy-metal ion sensing in cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942. 第 54 回植物生理学会年会、平成 25 年 3 月 21 日、岡山大学

③ Morita EH, Abe S, Ikegami T, Hayashi H., Molecular mechanism of cytosolic Zn<sup>2+</sup> concentration sensing by a cyanobacterial transcription factor SmtB from *Synechococcus* sp. PCC 7942., 第 53 回植物生理学会年会、平成 24 年 3 月 17 日、京都産業大学

④ Rahul MS, Hayashi H, Abe S, Morita EH, Functional Analysis of the N-terminal Sequence of SmtB, the Transcription Repressor for the Heavy-Metal Ion Stress Induced Metallo- thionein Like Protein Expression, in cyano- bacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, 第 53 回植物生理学会年会、平成 24 年 3 月 16 日、京都産業大学

⑤ 森田 勇人、阿部俊之助、池上貴久、林秀則, Spectroscopic and biochemical analyses for the molecular mechanism of cytosolic zinc ion concentration sensing by cyanobacterial transcriptional factors, SmtB family., 第 33 回日本分子生物学会年会、平成 22 年 9 月 21 日、東北大学

[その他]

ホームページ等

現在専用ホームページの作成中（平成 25  
年 10 月に公開予定）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 勇人 (MORITA HAYATO)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：50274303

(2) 研究分担者

林 秀則 (HAYASHI HIDENORI)

愛媛大学・無細胞生命工学研究センター・  
教授

研究者番号：60124682

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：