

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05388

研究課題名(和文)細菌ペリプラズム空間における酸化損傷タンパク質の新規修復機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel mechanism for repairing oxidized proteins in the bacterial periplasmic space

研究代表者

小笠原 寛 (OGASAWARA, Hiroshi)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：30535232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌細胞の最外殻に近いペリプラズム空間に存在するタンパク質は、外部環境の活性酸素種に曝されやすく酸化損傷が高頻度で生じると考えられる。これまでに明らかとされてきた酸化損傷タンパク質修復機構は主に細胞質内で働くものが殆どであり、ペリプラズム空間における機構は未解明のままであった。本研究では、細菌のペリプラズム空間で活性酸素種感知センサーとして機能するHprSの活性化に関わる分子機構、およびグラム陰性細菌におけるHprSホモログの役割について明らかにすることを目的に研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細菌のペリプラズム空間における酸化損傷タンパク質の修復機構とその発現誘導の分子メカニズムの解明が主な目的である。これまで細菌ペリプラズム空間で機能するプロテアーゼやシャペロンタンパク質は知られているが、酸化損傷タンパク質の修復機構は、殆ど不明であった。本研究で機能解析を進めたセンサーキナーゼHprSとその制御下にあるメチオニンスルホキシド還元酵素MsrQPIは、グラム陰性細菌に広く保存され、これらは細胞外ROSに対する耐性能付与に重要な役割を果たしていると考えられるため、病原性大腸菌を始めとする多くのグラム陰性細菌の新たな創薬ターゲットとしての可能性も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Proteins located in the periplasmic space near by the outer membrane of bacteria are likely to be exposed to reactive oxygen species in the environment and frequently undergoing oxidative damage. Most of the repair mechanisms for oxidized proteins that have been identified and elucidated so far work mainly in the cytoplasm, and the mechanism in the periplasmic space has remained unclear. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanisms involved in the activation of HprS, which functions as a sensor for the reactive oxygen species in the periplasmic space of bacteria, and the role of HprS homologues in Gram-negative bacteria.

研究分野：農学

キーワード：Escherichia coli Two-component system HprS/HprR ROS Periplasmic space

## 1. 研究開始当初の背景

酸素は、地球上の生物の生命活動を担うエネルギー生産に重要な役割を果たしているが、一方で、一部は活性酸素となり、細胞内のタンパク質の変性や DNA 損傷の原因ともなりうる。単細胞生物である細菌は、外部環境の活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)に直接曝されやすく、特にマクロファージや好中球などによって取りこまれた場合、これら ROS による酸化的損傷を回避するために、カタラーゼやペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素群の発現や、バイオフィルム形成を誘導することが知られている。大腸菌を始め、多くの細菌種において、過酸化水素存在下で活性化する転写因子 OxyR が良く知られており、細胞内の酸化ストレスセンサーとして、抗酸化酵素群の発現誘導に重要な役割を果たしている(Hillion and Antelmann, 2015, *Biol. Chem.*)。これまでに明らかにされている活性酸素消去や、タンパク質や DNA など生体高分子の酸化的損傷修復機構は、主に細胞質内で機能するものが殆どであった。しかし、近年の研究において、細菌細胞内膜に存在するトランスポーターを介して、システインのペリプラズム空間への輸送により過酸化水素を還元するシステインシャトルシステムが見いだされ、ペリプラズム空間における ROS 防御機構の存在が新たにクローズアップされた(Ohtsu *et al.*, 2010, *J. Biol. Chem.*)

細胞の最外殻に近いペリプラズム領域に存在するタンパク質は、外部環境の活性酸素種による酸化的損傷を受け易いと考えられるが、これまでペリプラズム空間におけるタンパク質の酸化的損傷修復機構については殆ど不明のままであった。

しかし、近年我々は、細胞内膜上で機能するセンサーキナーゼ(HprS)が新規過酸化水素センサーであることを見出し、さらに、このセンサーを介して活性化される転写因子 HprR によって制御される機能未知遺伝子(*yedYZ*)が、ペリプラズム空間のタンパク質中の酸化されたメチオニン(メチオニンスルホキシド)を還元する新規メチオニンスルホキシド還元酵素(MsrQP に改名)であることが明らかとされた(Gennaris *et al.*, 2015, *Nature*)。MsrPQ ホモログは、グラム陰性細菌に広く保存され、構造上類似性のない広範囲のペリプラズムタンパク質を修復することから、グラム陰性細菌において主要なペリプラズム酸化的損傷タンパク質修復酵素であることが示唆された。本研究では、ペリプラズム空間で酸化的損傷タンパク質がどのように認識され、修復されるかについての詳細な分子機構を明らかにするために、ペリプラズム空間の酸化損傷タンパク質修復機構のモデルとして、大腸菌の新規過酸化水素センサーHprS による MsrQP 制御に関わる分子機構の詳細を明らかにし、さらに MsrQP 以外の新たな酸化的損傷タンパク質修復機能を持つペリプラズム酸化還元酵素の探索と機能解明を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では細菌のペリプラズム空間における酸化的損傷タンパク質の修復機構とその発現誘導の分子メカニズムの解明を目指し、1)ペリプラズム過酸化水素センサーHprS の活性化に関わる分子メカニズムの解明、2)HprS/HprR ホモログの進化と機能解明、3)ペリプラズム領域において機能する新規酸化的損傷タンパク質修復機構の探索と機能解明の三つの計画について研究を実施した。1)では HprS の部位特異的変異導入により、HprS 活性化に影響を与えるアミノ酸残基の決定を行い、HprS ダイマー形成、および HprS 活性に影響を与えるタンパク質について評価した。2)では HprS/HprR ホモログを過酸化水素応答に利用する細菌種の同定を目指し、HprS ホモログ共通の機能的モチーフの探索、およびサルモネラにおける HprS ホモログ(CopS)の解析を行った。3)については、HprR 結合共通配列をプロモーターに有する酸化還元酵素遺伝子の過酸化水素応答について調査した。

## 3. 研究の方法

### 1)ペリプラズム過酸化水素センサーHprS の活性化に関わる分子メカニズムの解明

#### 1)-1. HprS 活性化に影響を与えるアミノ酸残基の決定

センサーキナーゼ HprS の活性化に影響を与えるアミノ酸残基を決定するために、部位特異的変異導入法により各種 HprS 変異体の発現プラスミドの構築を行い、二成分制御系 HprS/HprR の標的遺伝子 *hiuH* のプロモーター-*lacZ*融合レポーター株に導入後、*hiuH*プロモーター活性に与える影響を調べた。His-tag 融合 HprS 変異体について、自己リン酸化能への影響を明らかにするために、Phos-tag SDS PAGE を用いた自己リン酸化実験を実施した。

#### 1)-2. HprS ダイマー形成に影響を与える機能部位の探索、および HprS 活性に影響を与えるタンパク質の同定

HprS ダイマー形成を確認するために、BACTH(Bacterial Adenylate Cyclase-based Two Hybrid)システムを用いた HprS 間相互作用解析を行った。Bordetella pertussis のアデニル酸シクラーゼ(CyaA)の触媒作用を持つドメインを二つに分離した T25, T18 をそれぞれ HprS の N

末端、C末端に融合したタンパク質を発現可能なプラスミドを構築し、アデニル酸シクラーゼ欠損株である大腸菌 DHM1 株に導入し、次亜塩素酸(0.05 mM)または過酸化水素(4 mM)存在下における *-galactosidase* 活性を測定した。また、HprS との相互作用が予想されたタンパク質をコードする遺伝子欠損株を用いて、*hiuH* 遺伝子発現をリアルタイム PCR により調査した。

## 2)HprS/HprR ホモログの進化と機能解明

### 2)-1. HprS/HprR ホモログを過酸化水素応答に利用する細菌種の同定、および HprS ホモログ共通のモチーフの探索

HprS/HprR ホモログを過酸化水素応答に利用する細菌種の同定を目指し、HprS の分子系統樹解析を行った。大腸菌と進化距離の近い HprS ホモログについてアミノ酸配列のマルチプルアラメントを実施した。

### 2)-2. サルモネラにおける HprS ホモログ(CopS)の機能解明

大腸菌 HprS とサルモネラ HprS ホモログ(CopS)の Cys 残基に注目し、AlphaFold による立体構造予測から、サルモネラ CopS の Cys 残基を模倣した大腸菌 HprS 変異体発現プラスミドを構築し、次亜塩素酸存在下における *hiuH* 発現への影響を調査した。また、次亜塩素酸存在下におけるサルモネラ *hiuH*, *msrPQ* の発現制御を確認するためにリアルタイム PCR による発現解析を実施した。

### 3)ペリプラズム領域において機能する新規酸化的損傷タンパク質修復機構の探索と機能解明

大腸菌ゲノム上の HprR 結合共通配列(CATNACAANNNTTGTAAATG)をプロモーター領域に有する遺伝子群を明らかにするために、15 塩基中、5 塩基違いまでの遺伝子の探索を行った。中でも酸化還元酵素遺伝子をコードする遺伝子群に着目し、遺伝子発現解析を行った。

## 4 . 研究成果

### 1)ペリプラズム過酸化水素センサーHprS の活性化に関わる分子メカニズムの解明

HprS/HprR の制御下に存在する *msrPQ* がコードするメチオニンスルホキシド還元酵素は、主に次亜塩素酸によるペリプラズムタンパク質中のメチオニンの酸化によって生じるメチオニンスルホキシドを修復する。部位特異的変異導入により、HprS の 6 つのメチオニン残基をアラニンに置き換えた HprS 変異体発現プラスミドを構築し、*hprS* を欠損した *hiuH-lacZ* レポーター株に導入後、次亜塩素酸存在下における *hiuH* 発現への影響を比較したところ、ペリプラズム領域に位置する M72, M153 をアラニンに置換した変異体において、次亜塩素酸の存在の有無に関わらずその発現誘導が確認され、細胞質領域に位置する M225A 変異体についても同様の発現誘導が確認された。一方、ペリプラズム領域に位置する M73 をアラニンに置換した変異体については、次亜塩素酸存在下における発現誘導は観察されたが、野生株に比べ顕著ではないものの低下することが確認された。また、以前の研究において、HprS の 165 番目のシステイン残基(C165)が過酸化水素応答に必須であることから、C165 を含む、HprS の 4 つのシステイン残基をアラニンに置換した変異体について次亜塩素酸添加における *hiuH* 発現への影響を確認したところ、全ての株において著しい発現誘導が確認された。最近の研究で、*hiuH* の下流の *msrP* と *lacZ* を融合させたレポーター株を用いた解析において、C165A 変異体の次亜塩素酸添加時の発現誘導レベルが顕著に低下することが示されているが、*msrP* 発現誘導は確認されることから、HprS の C165 は次亜塩素酸応答ではなく、シグナル伝達に影響すると考えられている(Hajj *et al.*, 2022)。実際にリアルタイム PCR を用いた解析において、次亜塩素酸添加後 30 分の *hiuH* 発現は同様に、HprS の C165A 変異による低下が確認されたが、一方で *hiuH-lacZ* レポーター株を用いた解析では、次亜塩素酸添加後 30 分の *hiuH* プロモーター活性化レベルは、野生型 HprS と比較して殆ど影響がないことが示された。レポーター株の違いや、次亜塩素酸添加濃度や曝露時間の差による影響も考えられるが、これらの結果は、C165 は次亜塩素酸存在下における *hiuH* 活性化においても重要な役割を担っていることが確認された。HprS の C 末端に His-tag を付加し、Phos-tag SDS PAGE 後の His-tag 抗体を用いた Western blotting による検出により、次亜塩素酸(1 mM)添加による HprS リン酸化への影響を調べた結果、時間経過(0, 5, 10, 15, 30 分)に伴い、非リン酸化 HprS のバンドの減少とリン酸化 HprS の増加が確認された。HprS の 6 種類のメチオニン残基、および 245 番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異体についても C 末端に His-tag を付加し、同様に次亜塩素酸添加後 15 分におけるリン酸化への影響を比較したところ、野生型 HprS と異なるバンドのパターンを示す HprS 変異体が確認されたため、現在解析を継続して進めている。一方、次亜塩素酸(0.05 mM)および過酸化水素(4 mM)の有無における HprS の二量体形成への影響を確認するために、バクテリア Two-hybrid system を用いた HprS ホモ二量体形成の検出を試みたが、相互作用を示す *-galactosidase* 活性の検出には至らなかった。他の研究グループにおいて HprS はホモ二量体、および他のセンサーキナーゼとのヘテロ二量体を形成することが確認されていることから、HprS と T25, T18 との連結に用いるリンカー配列を見直し、再解析する予定である。また、HprS/HprR 系の制御下に存在する酸化損傷タンパク質修復酵素 MsrP/MsrQ はユビキノンから受容した電子を用いてタンパク質の酸化されたメチオニン残基(メチオニンスルホキシド)を還元する。ペリプラズム領域のタンパク質のジスルフィド結合形成に参与する DsbA, DsbB は、ユビキノンへ電子を受け渡す役割を果たすため、HprS 活性に影響を与える可能性

が考えられた。そこで、*dsbB* 遺伝子欠損株、およびコピキノン生合成遺伝子のうち非必須遺伝子の一つである *ubiE* の欠損株において、次亜塩素酸(0.05 mM)の有無における *hiuH* 発現への影響を調べた。その結果、次亜塩素酸添加時において、野生株に比べて、*ubiF* 欠損株で 5.6 倍、*dsbB* 欠損株で 36 倍の転写量の増加が確認された。

## 2) HprS/HprR ホモログの進化と機能解明

HprS/HprR ホモログを有する細菌種のうち、これらを過酸化水素や次亜塩素酸に対するセンサーとして機能するものを探索するために、HprS の分子系統樹解析およびアミノ酸配列のマルチプルアライメント解析を行った。大腸菌 HprS にはメチオニン残基が 6 箇所(M72, M73, M100, M153, M225, M352)存在し、HprS ホモログ間において M72, M153, M225 の保存性が高く、これらの結果は、次亜塩素酸応答における重要なアミノ酸配列と一致した。一方、C165 については、保存性が低く、多くの細菌種でセリン残基であったが、一方、それらの多くが 22 番目のアミノ酸が Cys であることを見出した。これらの細菌種は、大腸菌と進化距離が近く、HprS ホモログの活性制御に重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、サルモネラ菌を始めとする C22 を有し、S165 を有する HprS ホモログを模倣した大腸菌 HprS 変異体(G22C/C165S)を作製し、*hprS* 欠損株に導入後、次亜塩素酸存在下における生育への影響、および *hiuH* 発現への影響を調べた。その結果、G22、C165 のどちらか一方を置換した HprS 変異体(HprS G22C, HprS C165S)を導入した *hprS* 株において G22C/C165S は、次亜塩素酸添加における *hiuH* 発現の著しい減少が確認されたが、G22C/C165S 変異体については、野生株と同等レベルまで *hiuH* 発現の回復が確認された。AlphaFold による立体構造予測において、大腸菌 HprS の G22 と C165 は隣接しており、G22C 変異体において応答が著しく低下したことは、この HprS 変異体の 2 つの Cys(C22 と C165)間でジスルフィド結合が生じた可能性が示唆された。そこで G22 の前後の 4 つのアミノ酸(V20, A21, A23, G24)についてそれぞれ Cys に置換した 4 つの HprS 変異体(V20C/C165S, A21C/C165S, A23C/C165S, G24C/C165S)を構築し、次亜塩素酸添加後 30 分における *hiuH* 発現誘導への影響を調べたところ、G22C/C165S 変異体で確認された *hiuH* 発現誘導が確認されなくなった。よってこれらの結果は HprS ホモログの次亜塩素酸による活性化において、22 番目および 165 番目のアミノ酸に対応する位置のどちらか一方に Cys が存在することが重要であることを示唆した。また、大腸菌の野生型 HprS の C165 は、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸残基に囲まれたポケット付近に位置しており、他因子の Cys 残基とのジスルフィド結合を介した複合体形成の可能性が示唆された。現在、*Salmonella Typhimurium* について、大腸菌と同様に HprS ホモログである CopS 依存的に *hiuH* 発現、および *msrPQ* 発現が次亜塩素酸添加により誘導されるかについて解析を進めている。

## 3) ペリプラズム領域において機能する新規酸化損傷タンパク質修復機構の探索と機能解明

過去の精製 HprR を用いた Genomic SELEX 解析において、我々は、レスポンスレギュレーターである HprR が少なくともゲノム上の 3 カ所(*hiuH*, *cusC*, *cyoA*)に結合し、そのうち、*hiuH*-*msrPQ*, *cusCFBA* の遺伝子発現については、その制御下にあることを確認している。大腸菌ゲノム上に存在する HprR の結合共通配列 CATNACAANNNTGTAATG を探索したところ、推定上のオキシドレダクターゼをコードする *ydeP* 遺伝子上流に 15 塩基中 10 塩基の共通配列を有する配列を見出した。また、NAD(P)H オキシドレダクターゼをコードする *kefG* の上流に 15 塩基中 12 塩基の共通配列を有する配列を見出した。精製 HprR を用いた Genomic SELEX 解析において、*ydeP*, *kefG* 上流の HprR 結合共通配列を含む領域に対する HprR の結合は確認できておらず、現在、これらの遺伝子に対する HprS/HprR 依存的な発現制御について解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogasawara H., Ishizuka T., Hotta S., Aoki M., Shimada T., Ishihama A.	4. 巻 166
2. 論文標題 Novel regulators of the csgD gene encoding the master regulator of biofilm formation in Escherichia coli K-12	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 880-890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogasawara H., Ishizuka T., Yamaji K., Kato Y., Shimada T., Ishihama A.	4. 巻 366
2. 論文標題 Regulatory Role of Pyruvate-Sensing BtsSR in Biofilm Formation by Escherichia Coli K-12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS microbiology letters	6. 最初と最後の頁 fnz251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnz251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T.Shimada, H.Ogasawara, A.Ishihama	4. 巻 1837
2. 論文標題 Genomic SELEX Screening of Regulatory Targets of Escherichia coli Transcription Factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 49-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8675-0_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T.Shimada, H.Ogasawara, A.Ishihama	4. 巻 46
2. 論文標題 Single-target regulators form a minor group of transcription factors in Escherichia coli K-12.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 3921-3936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Yamaji, R. Taniguchi, H. Urano, H. Ogasawara	4. 巻 597
2. 論文標題 Roles of methionine and cysteine residues of the Escherichia coli sensor kinase HprS in reactive chlorine species sensing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 573-584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷口瑠美音、山路幸太郎、浦野浩行、小笠原寛
2. 発表標題 グラム陰性細菌酸化ストレスセンサーHprSの膜貫通領域に位置するCysの機能的役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山路幸太郎、谷口瑠美音、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌二成分制御系HprS/HprRの次亜塩素酸応答における作用機序
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山路幸太郎、浦野浩行、小笠原寛
2. 発表標題 細菌ペリプラズム空間における過酸化水素感知センサーHprSの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田友裕、小笠原寛、石浜明
2. 発表標題 大腸菌K-12株のゲノム転写制御ネットワークにおけるSingle-target regulatorsの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口瑠美音、山路幸太郎、浦野浩行、小笠原寛
2. 発表標題 大腸菌ROS/RCS感知センサーHprSの機能解析
3. 学会等名 第1回総合微生物学研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------