

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370059
 研究課題名 (和文) 気体分子を生理的エフェクターとする金属含有センサータンパク質の構造と機能
 研究課題名 (英文) Structure and function of metal-containing sensor proteins that use gas molecules as physiological effectors
 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

研究成果の概要 (和文)：酸素や一酸化炭素のような気体分子のセンサーとして機能し、さまざまな生理機能制御に関与する新規なセンサータンパク質を研究対象とし、これら気体分子センサータンパク質の構造機能相関の解明を行った。本研究では、気体分子がシグナル分子として機能するという、これまでにほとんど例の無い、気体分子の新規な生理機能を明らかにするとともに、その作用メカニズムを分子レベルで解明することにも成功した。

研究成果の概要 (英文)：I have studied gas sensor proteins using oxygen or carbon monoxide as their physiological effector molecules to elucidate their structure and function relationships. This study has revealed a novel biological function of gas molecules as signal molecules and the molecular mechanism of gas sensor proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：センサータンパク質、ヘムタンパク質、構造機能相関、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達タンパク質に関する研究はこれまでも行われてきたが、研究対象となっているのは大部分が単純タンパク質である。ところが近年になり、単純タンパク質では応答不可能なシグナルに対する応答系の存在が報告され始め、多くの研究者の注目を集めている。代表的な例として、酸素 (O₂)、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) など

の気体分子が生理的なシグナル分子 (リガンド) として機能するシグナル応答系が報告されている。気体分子が酵素反応の基質あるいは生成物となる系はこれまでに多数報告され、詳細な研究が展開されている。しかしながら、気体分子がシグナル分子として機能するこれらの系においては、気体分子が果たす機能は、これまでの系とは全く異なったものである。さらに、CO、NO などは生体毒とな

ることは知られていたが、これらがポジティブな生理機能を示すとは考えられてはいなかった。したがって、上記システムは、気体分子が示す新たな生理機能といった観点からも大きな注目を集めている。

気体分子がシグナル分子として機能するためには、気体分子とそのセンサーシステムとの間で特異的な相互作用が必要である。アミノ酸のみから構成される単純タンパク質は、基本的には気体分子と相互作用することはなく、そのため単純タンパク質が気体分子のセンサーとして機能することはできない。これまでに報告されている生体系における気体分子センシングシステムにおいては、気体分子と相互作用可能な遷移金属イオンを含む金属タンパク質をセンサー分子として利用している場合が多い。しかしながら、金属イオン含有型気体分子センサータンパク質の詳細な性質、構造機能相関等には不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) HemAT は、酸素に対する走化性制御系において酸素センサーとして機能するシグナルトランスデューサータンパク質である。本研究では、HemAT による選択的酸素センシングならびにシグナル伝達機構の解明を目的として研究を行う。

(2) HemAT は、グロビンドメインを酸素センサードメインとして利用している。本研究では、グロビンドメインをセンサードメインとして利用している新規な酸素センサータンパク質の探索を行い、見出した新規酸素センサータンパク質の構造機能相関の解明を行う。

(3) 鉄硫黄クラスターをセンサー活性中心として利用しているセンサータンパク質 VnfA を対象とし、VnfA によるエフェクター分子センシング、ならびにエフェクター分子による VnfA 活性制御の分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 各種細菌および古細菌中に存在する HemAT ホモログのうち、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、光合成細菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、高度好塩性古細菌 (*Halobacterium salinarum*) 由来 HemAT の発現系構築および、それらの精製法の確立を行う。

(2) HemAT による酸素の選択的センシングの分子機構を解明するためには、ヘム周辺構造、およびヘムに配位した酸素分子とヘム周辺アミノ酸残基間の特異的相互作用様式の解明が必要不可欠である。そこで本研究では、

(1) で調製した各種 HemAT ホモログを対象とし、共鳴ラマン分光法を用いてヘム周辺構造の詳細な解析を行う。

(3) HemAT による酸素のセンシングから、一連のシグナル伝達が進行する分子機構を明らかにするため、シグナル伝達に関与すると考えられる一連のタンパク質をすべて精製し、*in vitro*における再構成センシング・シグナル伝達システムの構築を行う。シグナルトランスデューサーとして機能する HemAT の他、CheA、CheV、CheW、CheY から成る再構成シグナル伝達系を構築する。本研究では、野生型および一連のアミノ酸変異を導入した変異型 HemAT、CheA、CheD、CheV、CheW タンパク質を用い、上記の再構成活性測定系による機能解析を行い、シグナル伝達機構解明のための知見を得る。

(4) 遺伝子データベースを検索することにより、新規な酸素センサータンパク質の探索を行う。その際、HemAT がグロビンドメインを酸素センサードメインとして利用していることを参考に、グロビンドメインを有する新規タンパク質の探索を行うことで、新規酸素センサータンパク質を探索する。得られた候補タンパク質の発現系を構築し、組換えタンパク質として精製し、HemAT の場合と同様な分光学的解析、機能解析を行うことで、得られた新規センサータンパク質の詳細な解析を行う。

(5) 鉄硫黄クラスターを活性中心とする新規なセンサータンパク質として *Azotobacter vinelandii* 由来の転写調節因子 VnfA を対象として研究を行う。各種条件下において電子スピン共鳴 (EPR) スペクトル、電子吸収スペクトルの測定を行い、VnfA 中に含まれる鉄硫黄クラスターの骨格構造を決定する。また、鉄硫黄クラスターの配位子として機能していると推定されるアミノ酸残基に系統的な変異を導入した変異体の分光学的測定と機能解析を行い、鉄硫黄クラスターの配位構造を決定する。さらに、*lacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子とする VnfA の *in vivo* 活性測定系の構築を行う。構築した活性測定系を用い、各種条件下で活性測定を行うことにより VnfA の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究では、気体分子を生理的なエフェクター分子とする金属含有型センサータンパク質の構造と機能の解明を目的とし研究を行った。HemAT は、プロトヘムをセンサーの本体として利用している酸素センサータンパク質であり、バクテリア、古細菌の酸素に対する走化性制御系におけるシグナル

トランスデューサーとして機能している。本研究では、高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* および光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来の HemAT を単離精製し、共鳴ラマン分光法によりヘム周辺構造の詳細な解析を行った。その結果、これら HemAT ホモログに結合した酸素と周辺アミノ酸残基との間で形成される水素結合ネットワークは、ホモログ毎に異なったパターンを示すことが分かった。得られた結果を、先に詳細な性質を解明した枯草菌由来の HemAT の場合と比較検討することにより、HemAT ホモログにおける選択的酸素センシング機構の解明を行った。

さらに本研究では、枯草菌由来の HemAT 中のセンサードメインと、大腸菌中に含まれるシグナルトランスデューサー Tsr のシグナリングドメインを融合したキメラタンパク質を作成し、その性質を詳細に検討した。HemAT による酸素センシング、ならびに酸素をセンシングした後の分子内シグナル伝達反応の分子機構解明を試みた。調製したキメラタンパク質、CheA タンパク質および CheW タンパク質より構成される *in vitro* アッセイ系を用い、CheA タンパク質のリン酸化反応を指標として調製したキメラタンパク質の活性を観測した結果、ヘムに酸素が結合した場合のみ、CheA のリン酸化反応が進行することが分かった。

(2) 本研究では、グロビンドメインを酸素センサードメインとして利用する新規な酸素センサータンパク質の探索を行った。その結果、新規な酸素センサータンパク質候補として、好冷性硫酸還元菌 *Desulfotalea psychrophila* ゲノム中にグロビンドメインとジグアニル酸シクラーゼドメインから構成される *hemDGC* 遺伝子を見出した。HemDGC 発現系を構築し、HemDGC を精製したところ、ドメイン構造から予想された通り、HemDGC はヘムタンパク質であり (図 1)、下記で述べ

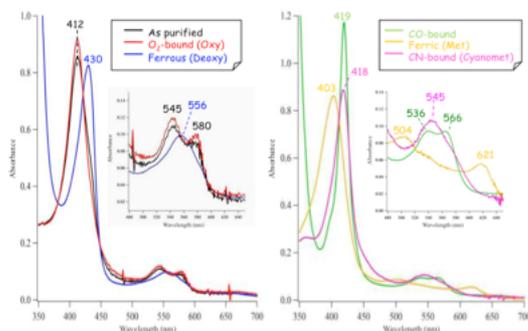


図1 HemDGCの電子吸収スペクトル

るように新規な酸素センサータンパク質であることが分かった。

部位特異的アミノ酸変異導入により調製した各種変異型 HemDGC を用い、共鳴ラマン分光法によるヘム近傍構造の解析と酵素活性を指標として機能解析を行い、HemDGC による酸素の選択的センシングの分子機構、ならびに酸素による HemDGC の機能制御機構の解明を行った。その結果、遠位側ヘムポケットに存在する Tyr55 と Gln81 がヘムに結合した酸素分子と特徴的な水素結合ネットワークを形成することが、HemDGC による選択的酸素センシングに必須であることを明らかにした。HemDGC 中のヘムに一酸化炭素が結合した場合には、酸素の場合に形成される特徴的な水素結合ネットワークは形成されず、Gln81 のみがヘムに結合した一酸化炭素と相互作用する。このような気体分子の種類に依存して、遠位側ヘムポケットに存在するアミノ酸残基が関与する水素結合ネットワークが組換わることにより、遠位側ヘムポケットのコンフォメーション変化が誘起されるものと推定される。

HemDGC は、2分子の GTP から1分子の cyclic di-GMP を生成する反応を触媒する酵素活性を有していることも分かった。また、図2に示すように、分子中のセンサードメイン中に存在するヘムに酸素が結合した場合のみ、HemDGC は酵素活性を示すことが分かった。この結果は、HemDGC がグロビンドメインをセンサードメインとして利用している新規な酸素センサータンパク質であることを示している。

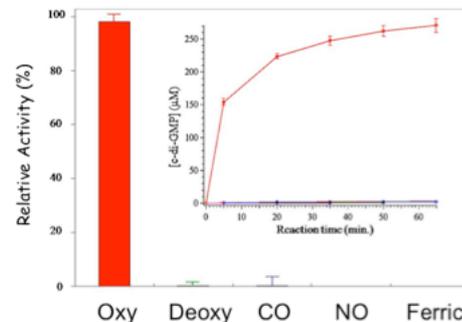


図2 HemDGCの酵素活性

HemDGC は、酸素の有無によらずホモダイマー構造を有している。酸素による HemDGC 酵素活性の制御には、酸素の結合に依存したサブユニット間のコンフォメーション変化が重要な役割を果たしていることが分かった。

(3) 本研究では、鉄硫黄クラスターを含むセンサータンパク質 VnfA に関する研究も行った。VnfA は *Azotobacter vinelandii* 中に含まれる転写調節因子であり、バナジウム含有型ニトロゲナーゼの発現制御に関与して

いる。EPR スペクトル、および電子吸収スペクトルの解析から VnfA は、サブユニット分子あたり一分子の $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ クラスタを含んでいることが分かった。部位特異的変異導入法により、VnfA 中に含まれる鉄硫黄クラスタに配位しているシステイン残基を特定した。

lacZ 遺伝子をレポーター遺伝子とする VnfA の *in vivo* 活性測定系を構築し、各種条件下で活性測定を行うことにより、VnfA の生理的エフェクターの同定を試みた。VnfA 中の鉄硫黄クラスタは酸素に対して非常に不安定であり、嫌気条件下でのみクラスタの骨格構造を保ち得る。この結果は酸素分子が VnfA の生理的エフェクターとして機能していることを示唆する。しかしながら、*in vivo* 活性測定系を用いた検討の結果、VnfA は酸素分子ではなく、活性酸素種を生理的エフェクターとしている可能性が高いことが分かった。

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)

論文はすべて査読あり。

- "The role of the Fe-S cluster in the sensory domain of nitrogenase transcriptional activator VnfA from *Azotobacter vinelandii*" H. Nakajima, N. Takatani, K. Yoshimitsu, M. Ito, S. Aono, Y. Takahashi, Y. Watanabe, *FEBS J.*, **2010**, 277, 817-832
- "Molecular Oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP" H. Sawai, S. Yoshioka, T. Uchida, M. Hyodo, Y. Hayakawa, K. Ishimori, S. Aono, *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics*, **2010**, 1804, 166-172
- "X-ray crystal structure of Michaelis complex of aldoxime dehydratase" H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Asano, Y. Kato, Y. Shiro, S. Aono, *J. Biol. Chem.*, **2009** 284, 32089-32096
- "Metal-containing sensor proteins sensing diatomic gas molecules" S. Aono, *Dalton Trans.*, (24) **2008**, 3137-3146
- "Hydrogen bonding interaction on the heme-bound ligand in the heme-based O_2 sensor protein" M. Nishimura, H. Yoshimura, K. Ozawa, S. Yoshioka, M. Kubo, T. Kitagawa, S. Aono, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2008**, 12, 142-148
- "Protein conformation changes of HemAT-Bs upon ligand binding probed by ultraviolet resonance Raman spectroscopy" Samir F. El-Mashtoly, Y. Gu, H. Yoshimura, S. Yoshioka, S. Aono, T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, **2008** 283, 6942-6949
- "The formation of hydrogen bond in the proximal heme pocket of HemAT-Bs upon ligand binding" H. Yoshimura, S. Yoshioka, Y. Mizutani, S. Aono, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, 357(4), 1053-1057

[学会発表] (計 23 件)

- S. Aono "Molecular oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase, HemDGC" 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-14), (名古屋国際会議場 (愛知), July 30, 2009)
- K. Yoshimitsu "Nitrogenase transcriptional activator, VnfA – Identification of signal molecule by using *in vivo* activity assay system" 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-14), (名古屋国際会議場 (愛知), July 26, 2009)
- H. Nakajima "Functional analysis of vanadium nitrogenase regulating protein in *Azotobacter vinelandii*" 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-14), (名古屋国際会議場 (愛知), July 26, 2009)
- S. Aono "Physiological role of thiolate coordination to the heme in *CooA* from *R. rubrum*" 16th International Conference on Cytochrome P450, (万国津梁館 (沖縄), June 24, 2009)
- 時間分解共鳴ラマン分光法によるガスセンサータンパク質 HemAT の酸素脱離に伴うダイナミクスの観測
吉田祐
日本化学会第 8 9 春季年会 (日本大学 (千葉)、2009 年 3 月 29 日)
- Fe-S クラスタを有するニトロゲナーゼ転写調節因子 VnfA におけるクラスタの役割
中島洋
日本化学会第 8 9 春季年会 (日本大学

- (千葉)、2009年3月27日)
7. ニトロゲナーゼ転写調節因子 VnfA- in vivo アッセイによる環境因子の同定
吉満匡平
日本化学会第89春季年会(日本大学(千葉)、2009年3月27日)
 8. S. Aono "Heme-based gas sensor proteins as a possible material for a bioinorganic device" The IUMRS International Conference in Asia 2008 (IUMRS-ICA 2008), (名古屋国際会議場(愛知), Dec. 10, 2008)
 9. S. Aono "A novel globin-coupled oxygen sensor protein responsible for the synthesis of a bacterial second messenger, cyclic di-GMP"
4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-4), (Jeju, Korea, Nov. 13, 2008)
 10. H. Nakajima "Functional analyses of Fe₃S₄ cluster involved in VnfA, vanadium nitrogenase regulation protein" 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-4), (Jeju, Korea, Nov. 13, 2008)
 11. ニトロゲナーゼ転写調節因子 VnfA に含まれる鉄イオウの役割
中島洋 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(東京工業大学(神奈川)、2008年9月19日)
 12. H. Sawai "HemDGC, a novel globin-coupled O₂ sensor, regulates synthesis of a bacterial second messenger (c-di-GMP)" 4th International Conference on Metals and Genetics (ICMG-13), (Paris, France, July, 22, 2008)
 13. S. Aono "The molecular mechanism of functional regulation of the heme-based sensor proteins" 5th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-5), (Moscow, Russia, July 11, 2008)
 14. S. Aono "Sensing of gas molecules and signal transduction in coordination space of sensor proteins" 3rd International Symposium on Chemistry of Coordination Space (ISCCS 2007) (淡路夢舞台国際会議場(兵庫), Dec. 10, 2007)
 15. セカンドメッセンジャー(c-di-GMP)合成を制御する新規な酸素センサータンパク質の構造と性質
吉岡資郎
第40回酸化反応討論会
(奈良女子大学(奈良)、2007年11月17日)
 16. S. Aono "Molecular mechanism by which heme-based sensor proteins sense their effector gas molecules" 67th Okazaki Conference 「Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function」, (岡崎コンファレンスセンター(愛知), Nov. 11, 2007)
 17. 酸素センサータンパク質 HemAT による CheA リン酸化反応の制御
西村宗十
第22回生体機能関連化学シンポジウム
(東北大学(宮城)、2007年9月28日)
 18. ニトロゲナーゼ転写調節因子 VnfA がある Fe-S クラスタによる転写調節の仕組み
中島洋
第57回錯体化学討論会
(名古屋工業大学(愛知)、2007年9月25日)
 19. 酸素センサータンパク質 HemAT による特異的酸素認識とシグナル伝達
青野重利
第100回触媒化学討論会 A
(北海道大学(北海道)、2007年9月19日)
 20. S. Aono "The mechanism of CO sensing in the heme-based CO sensor CooA revealed by the crystal structure of the exogenous ligand bound form" 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-13)
(Vienna, Austria, July 17, 2007)
 21. M. Nishimura "Oxygen sensing mechanism of signal transducer protein HemAT" 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-13) (Vienna, Austria, July 17, 2007)
 22. グロビン型センサードメインを有するセカンドメッセンジャー(c-di-GMP)合成酵素の酸素による活性制御
澤井仁美
第34回生体分子科学討論会(東北大学(宮城)、2007年6月22日)

23. 気体分子により駆動される生体内シグナル伝達の分子機構
青野重利
第7回日本蛋白質科学会年会(仙台国際センター(宮城)、2007年5月26日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.oib.orion.ac.jp/Lab/aono.html>

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