

## 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24年6月1日現在

機関番号：85202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770142

研究課題名（和文）枯草菌一般ストレス応答における情報伝達機構の解明

研究課題名（英文）Structural Studies on Signaling Mechanisms of General Stress Response in *Bacillus Subtilis*

研究代表者

牧野 正知 (MAKINO MASATOMO)

島根県産業技術センター・機能性食品産業化プロジェクトチーム・研究員

研究者番号：30529582

研究成果の概要（和文）：微生物は外界の急激な変化に応答する分子機構を有している。枯草菌では栄養飢餓や環境変化などの情報は転写因子 $\sigma^B$ に伝達され、200以上の遺伝子が発現し、ストレスの排除とダメージの修復に至る。本研究は栄養飢餓応答に関わる脱リン酸化酵素 RsbP の PAS ドメインと脱リン酸化ドメインの構造をX線結晶解析より明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Bacteria exploit signaling systems to respond to deleterious effects of stresses or sudden changes in the environment. In the case of *Bacillus subtilis*, stress information converges on and is transmitted to the general stress response transcription factor  $\sigma^B$ , leading to the expression of more than 200 general stress genes to exclude stresses or to repair the damage. In this study, I determined X-ray crystal structures of the N-terminal PAS domain and the C-terminal PPM-phosphatase domain of RsbP, an essential multi-domain protein required to activate  $\sigma^B$  in response to energy limitation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：シグナル伝達、X線結晶学、枯草菌、ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

## (1)微生物のストレス応答

微生物は熱、飢餓、乾燥といった様々なストレスに頻りに曝されており、速やかに、かつ適切に対応をとらなければ生存できない。そのため微生物はストレス応答と呼ばれる仕組みを有している。微生物はストレスに遭遇すると増殖と代謝を抑制した定常期に移行し、ストレス応答遺伝子の発現が誘導される。その結果として、抗生物質合成などの

二次代謝が活発になることや、病原性の発現などが知られている。従ってストレス応答は微生物の利用や病原性の制御などにも関係が深く、分子メカニズムの解明が待たれている。

## (2)枯草菌

枯草菌は、ストレス応答により過酷な条件下でも芽胞形成あるいは細胞活動自体を低下させることでそれを耐え抜く能力を有している。そのため古くから細胞分化に関する

研究が進んでおり、また全ゲノム解析も終了している。そのため枯草菌はグラム陽性菌のモデル生物と見なされているが、構造生物学的な知見は少ない。

### (3) 枯草菌の一般ストレス応答

ストレス応答遺伝子の発現は、RNA ポリメラーゼのシグマ因子の一つである $\sigma^B$  (SigB)によって調節されている。 $\sigma^B$ を活性化する経路はストレスの種類によって二つに分けられ、一つは環境ストレス応答、すなわち高温や高塩濃度、有機溶媒への暴露といった周辺環境への応答であり、もう一つは栄養飢餓状態に関わる応答である。ストレス応答に関与する遺伝子は、主に *sigB* オペロン上に存在し、それらの遺伝子産物は **Regulator of Sigma B (Rsb)** という一連の蛋白質群である。 $\sigma^B$ の活性化の最終段階は、2つの経路に共通な機構である RsbV の脱リン酸化に起因したパートナースイッチングによる $\sigma^B$ の遊離である。すなわち分子間の相互作用や可逆的リン酸化といった分子機構によりストレスシグナルが伝達されると考えられている(図1)。

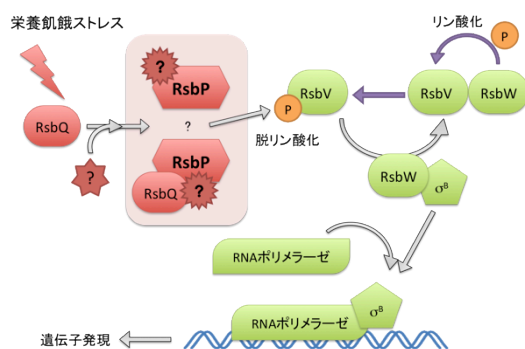


図1 枯草菌の栄養飢餓ストレス応答

### (4) 国内外の状況

ストレスシグナルの伝達を分子レベルで理解するためには、遺伝子レベルでの研究に加え、各々の蛋白質の立体構造情報が必要不可欠である。枯草菌の $\sigma^B$ 系とは異なるが、これまでに原核生物由来の RNA ポリメラーゼに関連する蛋白質の結晶構造が幾つか報告されており、特に富栄養な環境下で通常働く $\sigma^A$ について研究が最も進んでいる。これまでに *Thermus thermophilus* 由来 RNA ポリメラーゼホロ酵素(Vassilyev *et al.*, *Nature* 2002)と大腸菌 $\sigma^{70}$ の部分構造(Malhotra *et al.*, *Cell* 1996)およびその DNA 複合体(Lane *et al.*, *PLoS Biol.* 2006)が報告されている。また RsbW と RsbV に相当する蛋白質については  $\sigma^{28}$ -FlgM (Sorenson *et al.*, *Mol. Cell* 2004),  $\sigma^A$ -RseA

(Campbell *et al.*, *Mol. Cell* 2003)、胞子形成因子  $\sigma^F$ -SpoIIAB(Campbell *et al.*, *Cell* 2002)、SpoIIAA-SpoIIAB(Masuda *et al.*, *J.Mol. Biol.* 2004)などの構造が得られている。これらは分解能がやや低く詳細な構造が不明であるか、部分構造であった。

### 2. 研究の目的

枯草菌のストレス応答を分子レベルで理解するためには、個々の立体構造やリン酸化状態・複合体形成状態といった一連の構造情報が必要である。Rsb 蛋白質はそれぞれ共通する3つのドメイン(蛋白質間相互作用ドメイン、リン酸化ドメイン、脱リン酸化ドメイン)のいずれかを有するという特徴があるため、それらのドメインのいずれかを有する RsbP、RsbV、RsbW、 $\sigma^B$  という4つの蛋白質に焦点を当てることにした。これらから枯草菌一般ストレス応答に共通する構造基盤の提唱を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料の調製

RsbP、RsbV、RsbW、 $\sigma^B$  について、大腸菌を用いた大量発現系を構築し、アフィニティークラムによる簡便かつ高純度な調製系を確立することにした。RsbP に関しては PAS ドメインと脱リン酸化ドメインに関しては調製を進めた。また得られた精製試料については動的光散乱法により、結晶化や溶液散乱測定に適した溶液条件の最適化を図った。

#### (2) 構造解析

蛋白質の立体構造を決定するための手法として、X線結晶解析法を用いた。そのため高純度試料を高濃度に濃縮し、条件検討を行って、結晶化を行った。結晶化に成功した試料については、放射光施設において高精度な回折強度データの収集を行い、異常分散法や分子置換法などを併用しながら立体構造を決定した。

#### (3) 微小結晶測定方法の開発

本研究対象とする蛋白質の中にはマルチドメイン蛋白質も含まれており、結晶成長が難しく微小な結晶しか得られないことも想定された。微小結晶から解析可能な回折強度データを収集するためには、結晶以外の散乱体から発生するバックグラウンドノイズを極限まで低減させる必要がある。そこで新たに微小結晶をマウントする器具の開発も行った。

#### (4) X線小角散乱(SAXS)法

一般に蛋白質の結晶化の成功率は高くな

く、本研究のように単一生物種に由来する蛋白質群を解析する際には、制約も大きいため困難が予想された。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 SAXS 法を利用した。

#### 4. 研究成果

本研究課題は4種類の蛋白質を対象とする研究であるが、特に RsbP について結果が得られたので以下、詳細を述べる。

RsbP は全長 403 残基、分子量 46 KDa の蛋白質で、N 末端から PAS ドメイン (1-109, RsbP-PAS)、coiled-coil ドメイン (110-183, RsbP-CC)、脱リン酸化ドメイン (184-403, RsbP-PPM) を有するマルチドメイン蛋白質である。PAS ドメインは、酸素濃度や酸化還元電位などをセンスする機能単位として知られており、多くの生物種においてその存在が確認されている。それゆえ RsbP では RsbQ の発する未知のストレスシグナルを PAS ドメインで認識していると考えられている。

##### (1)RsbP 蛋白質

###### ①結晶化

RsbP 蛋白質を高純度に精製し結晶化スクリーニングを行ったところ、図2のような針状結晶が得られた。X線を照射し回折像を撮影したところ、低分解能の領域に蛋白質由来と考えられる回折斑点が確認できた。しかし格子定数、空間群の決定には至らなかった。現在、結晶性を向上させるべく検討を進めている。

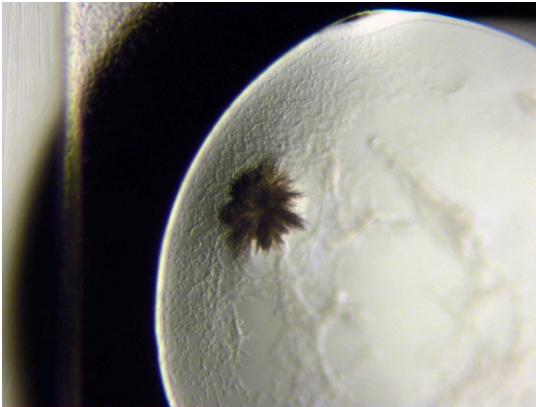


図2 RsbP の針状結晶

###### ②RsbP 蛋白質の SAXS 測定

RsbP 蛋白質の構造解析は困難であったため、SAXS により溶液状態での会合状態を調べた。ギニエ領域の解析から、溶液中で RsbP は2量体を形成していると推測された。この結果はゲル濾過クロマトグラフィーによる溶出プロファイルから推測されるものとも一致した。また慣性半径は分子量から推測されるものよりも大きく見積もられた。ダミー

アトムモデル計算から RsbP の溶液構造は、コンパクトに折りたたまれた構造と言うよりも、むしろ細長い構造を形成している可能性が示唆された。

##### (2)RsbP-PAS の構造

###### ①結晶構造

RsbP-PAS に関しては結晶化に成功し (Makino, M. *et al.*, *Acta Cryst.* **F65**, 559-561 (2009))、セレノメチオニン誘導体の異常分散効果を利用して構造を決定した (図3)。RsbP-PAS は5つの $\alpha$ ヘリックス、5つの $\beta$ シートから構成される構造で、他の生物種にも見られる典型的な PAS フォールドを保持していた。また互いの $\beta$ シートが疎水的に相互作用する二量体構造を形成していた。蛋白質内部には小さな疎水性の空洞が2つ隣り合って存在することも分かった。一般に PAS ドメインは光、酸素、基質分子などを認識し、会合状態を変化させることでセンサーとしての機能を果たす。RsbP-PAS の場合、基質結合部位と推定される蛋白質内の空間は嵩高い疎水残基で構成され比較的狭いため、認識する分子は疎水性の低分子と推定された。

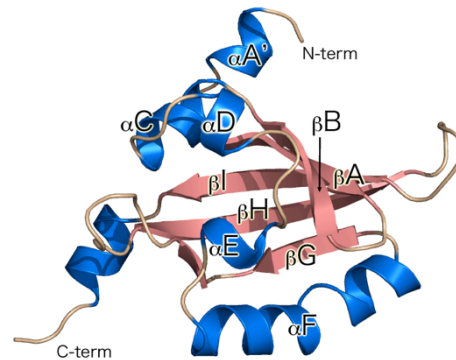


図3 RsbP-PAS の構造

###### ②RsbP-PAS の SAXS 測定

SAXS 法により、RsbP-PAS の溶液中における会合状態を調べた。ギニエ領域の解析から RsbP は溶液中で2量体を形成していると推測された。次に RsbQ との会合状態を調べた。RsbP の活性化には、RsbQ 蛋白質の RsbP-PAS への蛋白質-蛋白質間の相互作用が関与しているとの報告もある。解析の結果、複合体は観測できなかった。従って複合体形成は一時的なものか、あるいは何らかのシグナル分子が関与すると想像される。これらの結果を踏まえ、活性発現条件の探索を行っている。

##### (3) RsbP-PPM の構造

RsbP-PPM は、PPM 脱リン酸化酵素ファミ

リーに分類される機能単位である。RsbP-PASによって活性化され、RsbVを脱リン酸化する役割を担っているが、どのような仕組みで活性化されるのか不明であったので構造決定を進めた。結晶は酢酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で得られた(図4)。放射光施設にて2.3Å分解能の回折強度データを収集し、分子置換法により構造を決定した。

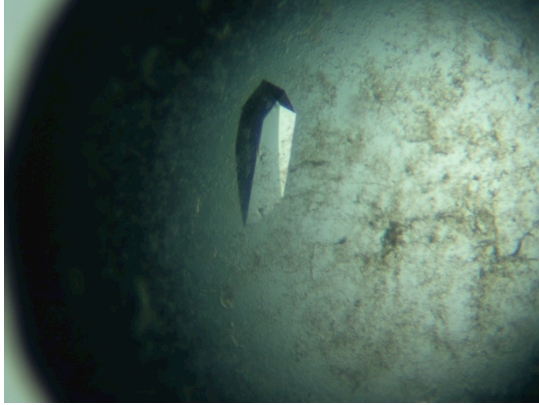


図4 RsbP-PPMの結晶

得られた構造は、 $\alpha\beta\alpha$ サンドイッチフォルドを保持した構造で、これまで知られている同種のヒトPP2Cや結核菌のPstPなどの蛋白質と基本的な構造は類似していた(図5)。

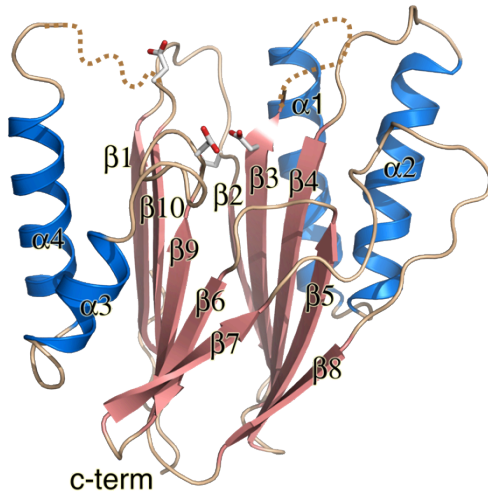


図5 RsbP-PPMの全体構造

PPMファミリーに分類される酵素は、2-3核のMnイオンあるいはMgイオンを活性中心に持つ。RsbP-PPMでも金属イオンに対する内在性の配位子として4つのアスパラギン酸が保存されている。しかし結晶構造には金属イオンの配位は確認できず、金属イオンの配位に関わる一部のアスパラギン酸側鎖は完全に活性中心の裏側へ突出していた。これはPPMドメインを切り出して結晶化させたことによるアーティファクトの可能性が考えられるものの、RsbP-PASにおけるストレ

スシグナルの認識によって始めて金属イオンを配位させるように構造変化し、活性化するという仕組みを反映しているとも考えられる。実際に変異体実験から、栄養状態に関わらずRsbPを活性化させるRsbP-PPM上の部位が数例報告されている。それらは構造から金属イオン結合サイトの裏側の表面残基であることが分かった。またRsbP-PASや、RsbP-PAS/RsbP-CCまでを欠損させると活性に深刻な影響が出ることから、ドメイン間の相互作用やそれらの空間配置が活性制御に重要な役割を果たすと予想された。そのためRsbP-PPMを切り出す長さを変えたコンストラクトを幾つか新たに作成し、高純度精製まで行った。現状では結晶化まで至っていないが、結晶化-構造解析を行い、分子機構の解明を目指している。

#### (4) 微小結晶のマウント法

図2のような微小な結晶から回折強度データ収集を可能にする結晶マウント器具(図6)を新たに開発し、有用性の確認を行った。約10 $\mu$ m角のリゾチーム結晶を本マウント器具に適応したところ、従来のループマウント法に適応し測定したものに匹敵する回折強度データを収集できた。また窒素気流による脈動の影響を抑え、高い位置決め精度を有することや、ループに由来する散乱ノイズを低減できることも確認した(雑誌論文①)。

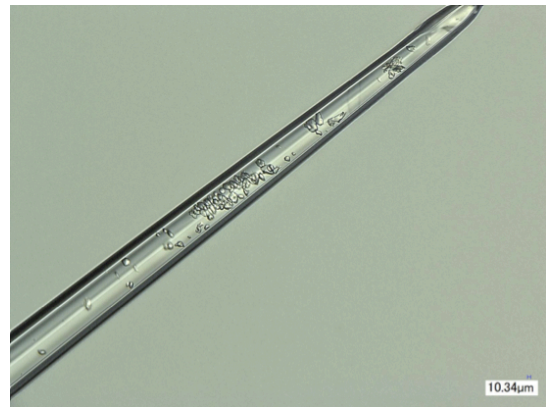


図6 マウント器具と微小結晶

#### 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2件)

① Makino, M., Wada, I., Mizuno, N., Shimizu, N., Hikima, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T. Fine-needle capillary mounting for protein microcrystals. 査読有, *J. Appl. Cryst.* (accepted)

② Makino, M., Sawai, H., Shiro, Y., Sugimoto, H.

Crystal structure of the carbon monoxide complex of human cytoglobin. 査読有  
*Proteins*, **79**, 1143-1153 (2011)

〔学会発表〕（計 3 件）

- ①Miyano, N., Hoshino, T., Makino, M., Shimizu, N., Kumasaka, T., Studies of signaling mechanism of general stress response mechanism in *Bacillus subtilis*.高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 10 回連携研究会、2011 年 8 月 20 日、播磨
- ②伊藤廉、牧野正知、星野武司、清水伸隆、熊坂崇、枯草菌の一般ストレス応答機構に関する構造研究、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 9 回連携研究会、2010 年 8 月 21 日、播磨
- ③牧野正知、星野武司、熊坂崇、PAS ドメインを有するストレス応答ホスファターゼ RsbP の構造生物学研究、日本蛋白質科学会 2010 年度年会、2010 年 6 月 17 日、北海道

〔その他〕

ホームページ等

- ①島根県産業技術センター  
<http://www.shimane-iit.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

牧野 正知 (MAKINO MASATOMO)  
島根県産業技術センター・機能性食品産業  
化プロジェクトチーム・研究員  
研究者番号：30529582