

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651086

研究課題名（和文） 環境汚染物質検出用の高感度蛍光プローブを装備したホーミングセルの創製

研究課題名（英文） Construction of the homing cells harboring sensitive fluorescence probes for detection of environmental pollutants

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):本研究では、重金属結合モチーフとして HRM(heme regulatory motif)あるいは重金属結合タンパク質 SmtA を利用した、重金属センシング機能をもった FRET 型蛍光プローブ分子の合成を試みた。さらに、遷移金属イオンが関与する走化性シグナルトランスデューサーの構造機能相関の解明を行い、重金属イオンに対する自発集積能を有するホーミングセル作成のための基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文): In this work, the construction of FRET-type fluorescence probes using HRM(heme regulatory motif) or transition metal ions binding protein SmtA was tried. Structural and functional characterization of the transition metal ion-containing chemotaxis signal transducer protein was carried out to obtain basic information for the construction of homing cells that can swarm spontaneously toward transition metal ions.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境技術、生物物理、蛋白質、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

土壌および水圏におけるカドミウム、水銀、鉛、六価クロムなどの重金属汚染は、生物に対して深刻な障害をもたらすため、重金属汚染が判明した場合には、迅速な対応が必要となる。そのためには、重金属汚染の有無を簡便かつ高感度に判定するシステムが必要不可欠である。従来、蛍光 X 線法、ボルタンメトリー法、および吸光度法などが、重金属汚染の有無を判定するための分析法として利用されている。しかしながら、これらの分析法では試料の前処理が必要であり、分析結果がでるまでに長い時間が必要であるという欠点がある。

申請者は、これまでの研究において、各種細菌中に含まれ、各種外部環境因子に対するセンサーとして機能する遷移金属含有型センサータンパク質の構造機能相関解明に関する研究に取り組んできた。さらに、各種外部環境因子に対する細菌の走化性制御に関する研究も行ってきた。これらの研究をもとに、タンパク質を利用した高感度な重金属イオンセンサータンパク質、ならびに細菌の走化性制御を利用したホーミングセル(対象とする重金属イオンに対して自発的に集積する性質を付与した細菌)の創製に関する研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、重金属イオン結合能を有することが知られているメタロチオネイン、亜鉛フィンガータンパク質などに存在する重金属イオン結合モチーフと、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表される蛍光タンパク質を構成要素として利用し、重金属イオンを高感度で検出可能な FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 型蛍光プローブ分子の設計・合成を行う。さらに、遺伝子工学的手法を適用することにより、重金属イオンセンシング能を獲得した外部環境因子結合タンパク質 (各種細菌の走化性制御系において外部環境因子のセンサーとして機能している蛋白質) を調製し、これを大腸菌に導入することにより、重金属イオンに対する自発集積能を有するホーミングセルの創製を試みる。

重金属イオンセンシング能を有する外部環境因子結合タンパク質の調製のためには、走化性制御系において外部環境因子のセンサーとして機能している蛋白質の作動原理の理解が必要不可欠である。そこで本研究では、細菌の走化性制御系において外部環境因子のセンサーとして機能しているシグナルトランスデューサータンパク質の中からいくつかの例を取り上げ、それらの作動原理解明に関する研究も合わせて行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、「自発的に重金属汚染域に移動・集積し、重金属汚染を高感度に検出可能なシステムの構築」という、これまでの全く例の無いチャレンジングなテーマに挑むものである。このようなシステムを構築するためには、次の二点の要求を解決する必要がある。重金属に対する自発的移動・集積能を如何にしてシステムに付与するか。如何にして高感度な重金属検出系を構築するか。

そこで本研究では、各種細菌が有している走化性 (様々な外部環境因子に対して寄っていく、あるいは遠ざかる、という性質) に着目し、対象とする重金属イオンに対する走化性を付与した細菌を、重金属に対する自発的移動・集積システムとして利用することを着想した。細菌の走化性制御系は、外部環境因子を感知するためのセンサーとして機能する外部環境因子結合タンパク質、シグナルトランスデューサータンパク質、シグナルトランスデューサータンパク質からのシグナルを伝達する一連のシグナル伝達タンパク質から構成される。ここで伝達されたシグナルが、最終的にべん毛モーターの回転方向を制御することにより、細菌の運動性が制御される。本研究では、センサーとして機能する外部環境因子結合タンパク質、あるいはシグナルトランスデューサータンパク質に、重金属イオンセンサー能を付与することにより、

「走化性を利用して、重金属に対して自発的に移動・集積する細菌」を創製し、上記のシステムとして利用することを考えた。

(2) 重金属検出用高感度蛍光プローブの設計・合成、およびその機能解析を行うため、下記に述べるような研究を行う。

重金属が存在する場合にのみ選択的に何らかのシグナルが発生するプローブ分子があれば、重金属の存在を選択的に検出することが可能である。そこで本研究では、メタロチオネインおよび亜鉛フィンガータンパク質中に存在する重金属結合モチーフと、蛍光タンパク質 (緑色蛍光タンパク質 (GFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)) を構成要素とする新規なプローブ分子を、次のような設計方針に従って作成する。蛍光タンパク質からの蛍光によるシグナル検出を考えた場合、オン・オフ型、レシオ型、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 型など、異なる原理のプローブ設計が考えられる。本研究では、これらの中でバックグラウンドシグナルが最も小さいことが期待される FRET 型プローブを、GFP と YFP (あるいは、それらの誘導體) の組み合わせにより作成する。(図 1)

FRET 型蛍光プローブでは、二つの蛍光発色



図 1

団がある一定距離以下に近づいた場合のみ、両者の間でエネルギー移動が進行し、FRET シグナルが観測される。したがって、重金属が存在する場合にのみ、GFP と YFP が FRET シグナルを与える距離に近づくようなプローブを設計すれば、重金属検出用 FRET 型蛍光プローブが作成可能であると考えられる。

重金属イオン結合能を有するメタロチオネイン、亜鉛フィンガータンパク質は、重金属イオンの有無により大きくコンフォメーション変化すると考えられている。この性質を利用し、本研究では、メタロチオネイン、亜鉛フィンガータンパク質中の重金属結合モチーフ部分の両端に二種の蛍光タンパク質を連結することにより重金属検出用蛍光プローブを作成する。作成にあたっては、該当する金属結合モチーフ部分の遺伝子を PCR 法により調製し、その 5'-末端、3'-末端に GFP および YFP 遺伝子を連結する。このよう

にして調製した重金属検出用蛍光プローブの遺伝子断片を、発現用プラスミドに組み込んだ後、大腸菌を用いて発現させることにより、設計した重金属検出用蛍光プローブを組換えタンパク質として調製する。重金属結合モチーフ部分と GFP、YFP 間の連結部分の長さ（ペプチド鎖長）を系統的に変化させた、一連の変異型プローブ分子を調製する。フレキシブルなランダムコイル構造を取ることが判明しているアミノ酸配列をもとにして人工合成した DNA 断片を、重金属検出用蛍光プローブ遺伝子の該当部分に挿入することにより、連結部分の長さを変化させる。調製した一連のプローブ分子について、FRET 効率の測定を行い、重金属イオン存在下において最大の FRET 効率を示すプローブ分子を選抜する。FRET 効率は、プローブ分子を GFP の励起波長で励起した際に観測される YFP と GFP の蛍光強度比から算出する。

(3) 細菌の走化性制御系において外部環境因子のセンサーとして機能しているシグナルトランスデューサータンパク質として、鉄錯体の一種であるヘムが関与するシグナルトランスデューサータンパク質である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の Aer2 タンパク質を対象として、X 線結晶構造解析、および共鳴ラマン分光法を始めとする各種分光学的解析により、Aer2 の作動原理解明を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究では、重金属汚染の有無を簡便かつ高感度に判定するシステムの開発を目的とし、重金属が存在する場合にのみ選択的に何らかのシグナルが発生するプローブ分子の設計、開発を行った。本研究では、重金属結合モチーフとして HRM (heme regulatory motif, CP モチーフとも呼ばれる) を利用し、HRM を含むポリペプチドの両端に、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が可能な二種の異なる蛍光タンパク質を連結したプローブ分子の合成を行った。HRM を含むポリペプチドとしては、ラット由来のアミノレブリン酸合成酵素のプレ配列部分 (N 末端 ~ 120 残基 (ALAS-120)、および N 末端 ~ 56 残基 (ALAS-56)) を利用した。それぞれのアミノ酸配列を図 2 に示す。

ALAS-120、および ALAS-56 の両端に、蛍光タンパク質として K01 (吸収極大: 548 nm、蛍光極大: 559 nm) および MiCy1 (吸収極大: 470 nm、蛍光極大: 496 nm) を連結したプローブの発現ベクターを構築し、大腸菌における発現を行った。いずれの系においてもタンパク質の発現は認められたが、精製直後のサンプルにおいては、ALAS ペプチドの C 末端側に連結した蛍光タンパク質の蛍光発色団の

```
ALAS-56
METVRRRCPFILSRVPAFLQKAGKSLFLFYAQNCPKMMEV
GAKPAPRTLSTSAVHCQ
```

```
ALAS-120
METVRRRCPFILSRVPAFLQKAGKSLFLFYAQNCPKMMEV
GAKPAPRTLSTSAVHCQQVKETPPANEKEKTAKAAVQQA
PDESQMAQTPDGTQLPSGHPSPATSQSGSGKCPFLAAQL
SQT
```

図 2 ALAS1-56 および ALAS1-120 のアミノ酸配列

形成が観測されなかった。これは、対応する蛍光タンパク質のフォールディングが進行しなかったためであると考えられる。ALAS ペプチドの N 末端側だけに蛍光タンパク質を連結したプローブ分子を大腸菌中で発現させた場合には、蛍光発色団が形成されたプローブ分子が発現した。このプローブ分子を精製し、in vitro においてヘミンを添加すると、蛍光タンパク質による蛍光が消光されることが分かった。このことから、調製したプローブ分子中に存在する HRM にヘミンが結合することにより、蛍光の消光反応が進行したものと考えられる。

(2) 本研究では、重金属結合モチーフとして ALAS1-56、ALAS1-120 の他に、シアノバクテリア由来の SmtA タンパク質を用いた新たなプローブ分子の合成も試みた。SmtA は、56 アミノ酸残基から構成されており (図 3)、その分子中に 9 つのシステイン残基を有していることから、銅、亜鉛、カドミウム等の重金属を効率よく結合することが可能である。本研究では、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来の SmtA を用い、その両端に K01 と MiCy1 をそれぞれ結合したプローブ遺伝子を調製し、大腸菌中での発現を行った。その結果、大腸菌中において本プローブタンパク質の発現は、ほとんど観測されなかった。そこで、SmtA 部分に金属イオンが結合した状態にすれば発現効率が上昇することを期待し、銅イオン、あるいは亜鉛イオンを添加した培地を用いて発現を行ったが、金属イオン添加の効果は観測されなかった。今後は、金属結合モチーフ部分の配列を最適化する必要がある

```
SmtA
MTSTTLVKACEPCLCNVDPSKAIDRNGLYYC
SEACADGHTGGSKGCGHTGCNCHG
```

図 3 SmtA のアミノ酸配列

と考えられる。

(3) 本研究では、緑膿菌由来の Aer2 がヘム含有 PAS ドメインを有する新規な酸素センサータンパク質であることを見出した。また、共鳴ラマン分光法によるヘム近傍構造の解析を行い、Aer2 による酸素センシング機構の解明を試みた。Aer2 の発現系は、次のようにして調製した。緑膿菌のゲノム配列情報を基に、*aer2* 遺伝子を人工合成した。その際、大腸菌中での発現効率上昇を期待して、大腸菌のコドン使用頻度に合わせて塩基配列を変更した *aer2* 遺伝子を合成した。発現ベクターとしては pKK223-3 を使用し、*tac* プロモーター下流に、C 末端に 6 x His タグを付加するように設計した *aer2* 遺伝子を挿入した。発現用宿主には大腸菌 DH5 α を使用した。培養は、0.5 mM δ -アミノレブリン酸を添加して行った。

精製した Aer2 の電子吸収スペクトルを図 4 に示す。Aer2 はヘムタンパク質に特徴的な吸収 (Soret 帯ピークが 419 nm、Q 帯のピークが 543 および 578 nm) を示した。このことから Aer2 は、フラビントタンパク質である大腸菌 Aer とは異なり、ヘムタンパク質であることが分かった。Aer2 精製標品の共鳴ラマンスペクトル、および電子吸収スペクトルは、酸素化型ヘムに特徴的なものであった。これらのことから、Aer2 は酸素化型として精製されていることが分かる。ヘム含有 PAS ドメインを有するセンサータンパク質は、これまでにいくつか報告されている。代表的なものとして、FixL、EcdOS などがある。これらのヘム含有 PAS ドメインと Aer2 の PAS ドメインのアミノ酸配列を比較すると、Aer2 のアミノ酸配列中で、FixL、EcdOS においてヘム近位側軸配位子として機能している His に対応する位置に His (His234) が保存されている。His234 を Ala に置換した H234A 変異体は、ヘムをほとんど含まないアポ体として発現することが分かった (図 4)。これらの結果より、Aer2 では His234 がヘム近位側軸配位子として機能していると考えられる。

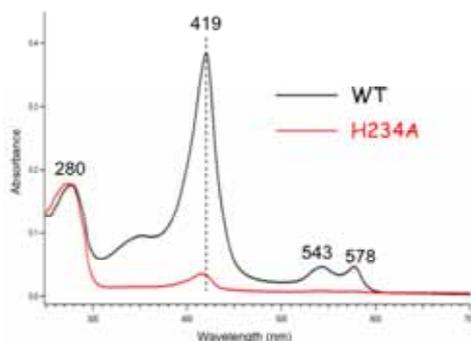


図 4 Aer2 の電子吸収スペクトル

ヘム含有型 PAS ドメインを含む FixL、EcdOS では、酸素分子のヘムへの配位にともない、遠位側ヘムポケットに位置している FG ループ上に存在するアミノ酸残基 (Bj FixL の場合 Arg220、EcdOS の場合 Met95 および Arg97) と、ヘムプロピオン酸基、およびヘムに配位した酸素分子間の水素結合ネットワークの組換え、ならびに FG ループのコンフォメーション変化が誘起される。これらの変化が、酸素センシングならびに酸素センシングに引き続く分子内シグナル伝達に重要な役割を果たしているものと推定されている。FixL、EcdOS においてヘムあるいはヘムに配位した酸素と相互作用することが報告されている Arg や Met は、Aer2 においては保存されていない。そこで、Aer2 の配列中でこれらの残基に対応する位置近傍に存在するアミノ酸 (His251、Lys252、Glu254、Asn256) に変異を導入した 4 種類の変異体を作成し、これら変異体の性質を調べることで、Aer2 においても FG ループ部分のコンフォメーション変化等が機能発現に重要な役割を果たしているかどうか検討した。その結果、Lys252、Glu254、あるいは Asn256 を Ala に置換した 3 種類の変異体は、いずれも野生型と同様な性質を示した。一方、His251 を Ala に置換した H251A 変異体は、野生型に比べて酸素親和性が低下していることが分かった。また、酸素化型の自動酸化反応の速度も野生型に比べ、H251A 変異体の方が速くなっていた。これらの結果より、Aer2 においては、His251 が酸素化型の安定化に重要な役割を果たしているものと推定される。

Aer2 の作動原理の詳細を明らかにするため、Aer2 の X 線結晶構造解析を行った。Aer2 は、679 アミノ酸残基よりなる可溶性タンパク質であり、N 末端より poly HAMP ドメイン、PAS ドメイン、di HAMP ドメイン、MCP ドメインの 4 つのドメインから構成されると考えられている。本研究では、poly HAMP ドメイン、PAS ドメイン、di HAMP ドメインからなる HPH-Aer2 (1-384 残基) および PAS ドメイン、di HAMP ドメインからなる PH-Aer2 (173-384 残基) の結晶構造解析を試み、HPH-Aer2 については分解能 3.2 Å で、PH-Aer2 については分解能 2.4 Å で構造決定を行った。HPH-Aer2、PH-Aer2 いずれの場合も、KCN 存在下において酸化型 Aer2 を用いて結晶化を行った。

本研究で決定した PH-Aer2 の構造を図 5 に示す。173-306 残基目までの領域は、はっきりとした電子密度が観測されたものの、307 残基目以降 (di HAMP ドメイン) は明瞭な電子密度が観測されなかった。PH-Aer2 中の PAS ドメインは、これまでに報告されている FixL および EcdOS 中のヘム含有 PAS ドメインと類似の構造を有しているが、いくつかの点で

FixL、EcDos とは異なる特徴を有している。すなわち、FixL および EcDos の場合は、ヘム軸配位子である His がヘム近位側に存在する $\alpha 3$ ヘリックス上に存在しているのに対し、Aer2 においては $\alpha 3$ ヘリックス上流に存在する 3_{10} ヘリックス ($\eta 1$) 上にヘム軸配位子として機能する His234 が存在していることが分かった。ヘム鉄上には、CN⁻に帰属される電子密度が観測されたことから、本研究で得られた構造は、シアン結合型 PH-Aer2 の構造で

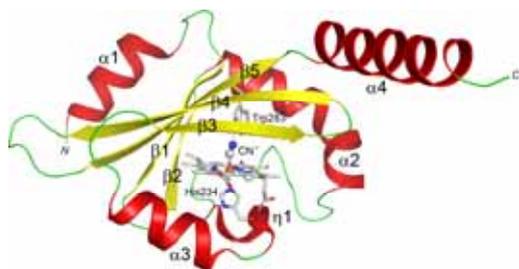


図5 PH-Aer2 の結晶構造

あると考えられる。

ヘムに結合した CN⁻の窒素原子と、ヘム遠位側ポケットに存在する Trp283 側鎖中の窒素原子間の距離は 3.0 Å であることから、ヘムに結合した CN⁻と Trp283 側鎖間で水素結合が形成されているものと推定される。現時点では、酸素結合型 Aer2 の構造は得られてはいないが、酸素結合型 Aer2 においてもシアン結合型の場合と同様、ヘムに結合した酸素分子と Trp283 間で水素結合が形成されるものと推定される。

FixL および EcDos では、FG ループ上に存在する Arg 残基が、ヘムに結合した酸素分子と水素結合を形成すること、および、酸素が結合することにより FG ループのコンフォメーション変化が誘起され、このコンフォメーション変化が酸素センシング後の分子内シグナル伝達に重要な役割を果たすと考えられることが報告されている。一方、Aer2 においてヘムに結合した酸素と水素結合を形成すると考えられる Trp283 は、PAS ドメインの C 末端に存在する $\beta 5$ ストランドに存在しており、FG ループ ($\alpha 3$ と $\beta 3$ 間のループ) 上には酸素と水素結合を形成可能なアミノ酸残基は存在しない。 $\beta 5$ ストランドは、PAS ドメインと隣接した di HAMP ドメイン (PH-Aer2 の構造中で観測されている $\alpha 4$ ヘリックスは、di HAMP ドメインの一部である) に直接連結している。これらのことを総合すると、Aer2 中のヘムに酸素が結合し、酸素と Trp283 の水素結合が形成されることにより、Trp283 付近のコンフォメーション変化が誘起され、そのコンフォメーション変化が di HAMP ならびに MCP ドメインのコンフォメーション変化を引き起しているものと推定される。これまで、

ヘム含有 PAS ドメインのシグナル伝達機構としては、ヘムにリガンドが結合することにより誘起される FG ループのコンフォメーション変化が重要であると考えられていたが、Aer2 における分子内シグナル伝達反応は、これまでのヘム含有 PAS ドメインとは異なる分子機構で駆動されていることが分かった。

HPH-Aer2 は、ホモダイマー構造を有していることが分かった。N 末に存在する poly HAMP ドメインは、特徴的なヘリックスバンドル構造を有している。N 末 poly HAMP ドメインを欠損した PH-Aer2 は、モノマーとして存在することから、N 末 poly HAMP ドメインは、Aer2 の二量化に重要な役割を果たしているものと推定される。

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)

(1) "Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*" H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Ishikawa, Y. Mizutani, S. Aono, *Chem. Commun.*, **2012**, 48 (52), 6523-6525. 査読有り

DOI: 10.1039/C2CC32549G

[学会発表](計 2 件)

(1) 岡本泰典, "Listeria monocytogenes のヘム取込み系におけるヘム結合タンパク質 HupD の性質", 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22 日~3 月 25 日, 立命館大学(滋賀県)

(2) H. Sawai, "Structural characterization of Aer2 that adopts a heme-containing PAS domain as a sensor for aerotaxis control", 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2011 年 8 月 7 日~8 月 12 日, Vancouver (Canada)

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者