

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850042

研究課題名(和文)根粒菌の脱窒を制御する新奇二成分情報伝達系NasS、NasTの構造機能解析

研究課題名(英文)Structure and function relationships of NasS-NasT, a novel two-component system in root nodule bacteria

研究代表者

日高 将文(Hidaka, Masafumi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：00584848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌はNasS、NasTからなるタンパク質複合体で、細胞内の硝酸塩濃度変化を感知している。硝酸塩濃度が上昇するとNasTがmRNAと結合することで脱窒関連タンパク質の翻訳が促進される。本研究は、NasS-NasTによる硝酸塩濃度変化感知システムの分子レベルのメカニズム解明と、NasS-NasTを応用したバイオセンサー開発を目指した。

NasSとNasTの構造解析を目指し、それぞれのタンパク質の結晶化を試みた結果、NasSについては新規の立体構造を決定した。また、NasS-NasTを利用した細胞内硝酸塩センサーsNO00pyを開発し、動物細胞内の硝酸塩濃度変化を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Root nodule bacteria control expression levels of protein involved in nitrate assimilation, and the sensing is regulated by protein complex of NasS and NasT. This project tried to reveal nitrate sensing mechanism of NasS-NasT at molecular level, and develop bio-sensor of nitrate in the cells by utilizing NasS-NasT.

To clarify structure and function relationships of NasS-NasT, crystallographic approach was attempted. After successful construction of expression and purification system of NasS-NasT, these proteins were subjected to crystallization and X-ray analysis. Finally, novel crystal structure of NasS was solved.

In this project, sNO00py, sensor for NO₃/NO₂ in physiology, was developed. This system utilizing NasS-NasT protein enabled us to visualize the changes of nitrate and nitrite level in mammalian cells.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質工学 結晶構造解析 バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

生命活動に使われる硝酸態窒素 (NO_3^-) は、亜硝酸 (NO_2^-)、一酸化窒素 (NO) を経て N_2O 、またはその還元物である N_2 に代謝され大気中に放出される (脱窒: 図1)。
 N_2O は、二酸化炭素の300倍の温室効果を有するガスであり、深刻な地球環境問題であるオゾン層の破壊の原因物質であるため、地球温暖化防止のために N_2O を N_2 にまで還元する技術の開発が望まれている。

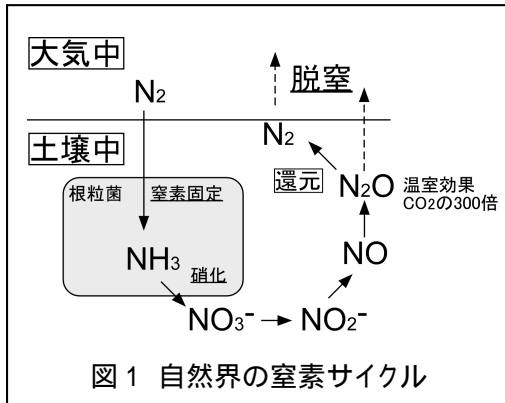


図1 自然界の窒素サイクル

近年、地球温暖化などの環境問題がクローズアップされる中で、微生物の働きを活用した環境浄化 (バイオレメディエーション) が注目されており、環境浄化作用を示す微生物の効果的な利用法確立や、その作用の更なる高活性化が課題となっている。

東北大学生命科学研究科・地圏共生遺伝生態分野・南澤 究 教授のグループは、 N_2O を N_2 に還元する酵素 (N_2O reductase: N_2OR) 遺伝子 *nosZ* を持つ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* に注目し、遺伝子にランダムな変異を導入することで N_2OR 活性が元株の7~11倍に上昇した複数の強化株の作出に成功した。これら強化株はそれぞれ複数の変異を有していたが、共通して *nasS* と呼ばれる遺伝子に変異が見られた。

nasS は *nasT* と硝酸同化系の2成分制御因子 (NasST) を構成しており、同化系硝酸還元酵素遺伝子の近傍に存在することが *Azotobacter* や *Pseudomonas* などの微生物で報告されている (図2)。*Bradyrhizobium* においても同様の構造が見られるが、強化株で *nasS* が変異していたことから、NasST が硝酸同化系だけでなく脱窒関連遺伝子の発現制御にも関与していることが推測される。これまでに NasST が脱窒関連遺伝子の発現制御に関与しているという報告はない。

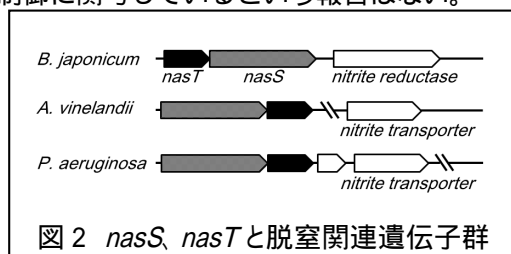


図2 *nasS*、*nasT* と脱窒関連遺伝子群

2. 研究の目的

NasS、NasT による発現制御は、図3のようなモデルが提唱されている[2]。

- NasS は硝酸結合タンパク質である。
- NasT は RNA のヘアピン構造に結合することで転写抑制を解除するアンチターミネータータンパク質である。

硝酸非存在下では NasS と NasT は複合体を形成し、NasT の RNA 結合能は抑制されている。

硝酸存在下では、NasS は硝酸と結合して NasT から解離し、フリーとなった NasT が RNA に結合して転写抑制を解除する。すなわち、NasS と NasT は硝酸の存在に応じてタンパク質の発現を制御する『二成分情報伝達系』である。

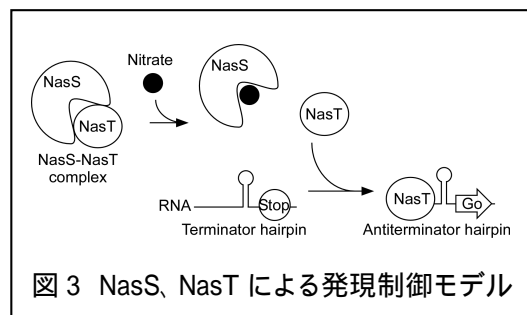


図3 NasS、NasT による発現制御モデル

微生物は、光、熱、酸素、ストレス、栄養状態など多様な外部環境を感知し、そのめまぐるしい変化に適応している。この環境変化の感知は、「二成分情報伝達系」と呼ばれるセンサーシステムを使って行われてる。一般的によく知られている二成分情報伝達系は、DNA/RNA に結合するレスポンスレギュレーター (RR) と、環境の変化に応答して RR をリン酸化するヒスチジンキナーゼ (HK) の2つのタンパク質からなるセンサーシステムで、環境変化をリン酸化という生体シグナルに置き換えている。

NasS、NasT は硝酸濃度に応答した発現制御メカニズムであるが、NasS にはリン酸化能は見出されておらず、硝酸濃度の変化を生体シグナルに置き換える分子機構は RR-HK のシステムとは大きく異なると考えられる。特に NasS、NasT は、ともに立体構造が解明されていないため、その分子レベルにおける制御機構は未知である。本研究は、NasS、NasT について、X線結晶構造解析を中心としたタンパク質レベルでの機能解析により、根粒菌の持つ脱窒関連タンパク質の制御機構の解明を目指す。また、より高活性型の変異株作成、NasS、NasT に作用する肥料・農薬開発の基盤となる知見の獲得を目指す。

3. 研究の方法

研究計画・方法として以下の3課題を設定する。

(1) NasS、NasT の結晶構造解析

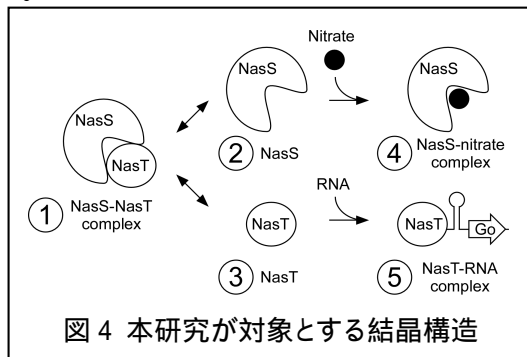
NasS、NasT のタンパク質立体構造について、X線結晶構造解析の手法を用いて解明する。

- **NasS の一次構造**は、構造が明らかになっているタンパク質の中ではシアノバクテリア由来 nitrate-binding protein (NrtA) と同一性が認められる。NrtA は硝酸トランスポーター付近に存在する膜タンパク質で、硝酸が結合することで構造が変化し、硝酸をトランスポーターに受け渡す。一方 NasS は膜結合領域がなく、細胞内可溶性タンパク質である。
- **NasT の一次構造**は、構造既知のタンパク質では *Mycobacterium* 由来のアンチターミネーター (Rv1626) と同一性を示す。Rv1626 はヒスチジンキナーゼ レスポンスレギュレーター系の二成分情報伝達系のタンパク質で、ヒスチジンキナーゼによりリン酸化される。NasT の C 末端部位は、Rv1626 を含む複数の DNA 結合タンパク質と高い保存性を示すが、N 末端部位は被リン酸化部位が保存されておらず、リン酸化とは異なる機構で DNA 結合能が制御されていると考えられる。

しかしながら、いずれも同一性が約 30% と低く、NasS、NasT の構造は新規性が高い。本研究では、NasS、NasT について、NasS-NasT 複合体、NasS、NasT、NasS + 硝酸、NasT+RNA の 5 つ状態 (図 4) について構造解析を目指す。大腸菌を用いた発現系を構築し、結晶化条件探索に供する。

結晶が獲得できたものから順次、高エネルギー加速器研究機構 (つくば市) で X 線を照射し、回折データを測定する。NasS、NasT は新規性が

高い構造であるため、立体構造解析には位相の決定が必要となると考えられることから、セレンメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法、重原子を用いた同型置換法を試みる。



(2) NasS、NasT の相互作用、機能解析

水晶発振子マイクロバランス測定法やカロ

リメトリー法などを用いたタンパク質相互作用検出による NasS と NasT の相互作用解析を行う。

Paracoccus denitrificans の NasS、NasT は、本研究の研究対象である根粒菌の NasS、NasT とアミノ酸配列で約 40% の同一性を示す。分子量の解析から、*P. denitrificans* の NasS と NasT はヘテロ二量体を形成し、硝酸存在下で単量体に解離することが明らかとなっている [3]。一方、NasS の硝酸認識機構、NasS と NasT の相互作用機構、NasT の RNA 認識機構については全く知られていない。本研究の目標である新奇の二成分情報伝達系の解明のためには、NasS、NasT の分子認識機構を明らかにすることが不可欠である。そのため、X線結晶構造解析と並行して NasS、NasT の変異体を用いた分子認識機構の解明を目指す。

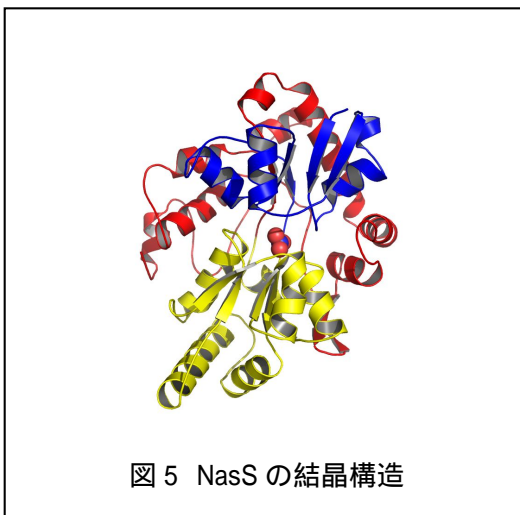
(3) NasS、NasT の相互作用を制御する因子のスクリーニング系の開発・実施

NasS、NasT の二成分情報伝達系に作用し、制御メカニズムを停止する生育調節剤の創出を目指し、候補化合物の探索を行う。

4. 研究成果

NasS の構造解析

NasS の立体構造を決定した (図 5)。硝酸認識残基を同定し、タンパク質工学的研究に応用するための分子基盤を獲得することができた (発表準備中)。



NasS-NasT を利用した硝酸センサー開発

NasS、NasT に、それぞれ蛍光タンパク質 CFP (Cyan Fluorescent Protein)、YFP (Yellow Fluorescent Protein) を付加する (図 6B)。NasS と NasT が複合体を形成する場合、CFP と YFP が近接するため、CFP の蛍光が YFP を励起する FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) が起こり、YFP の蛍光 (527 nm) が検出される。硝酸存在下で NasS と NasT が解離すると CFP と YFP の距離も離れるため

FRET が解消し、CFP の蛍光 (475 nm) 強度が上がり YFP 蛍光強度が下がる。

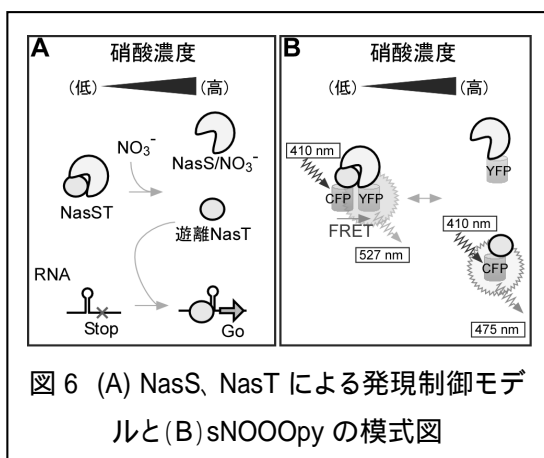


図 6 (A) NasS, NasT による発現制御モデルと(B) sNOOpy の模式図

NasS-NasT の複合体形成と硝酸による解離を蛍光スペクトルの変化として測定することに成功した (図 7A)。

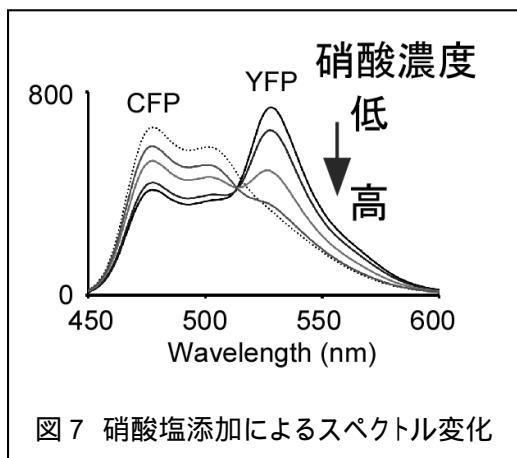


図 7 硝酸塩添加によるスペクトル変化

また、ヒト由来 HeLa 細胞内にセンサータンパク質を発現させたところ、細胞内の硝酸塩濃度変化を可視化することに成功した (図 8)。

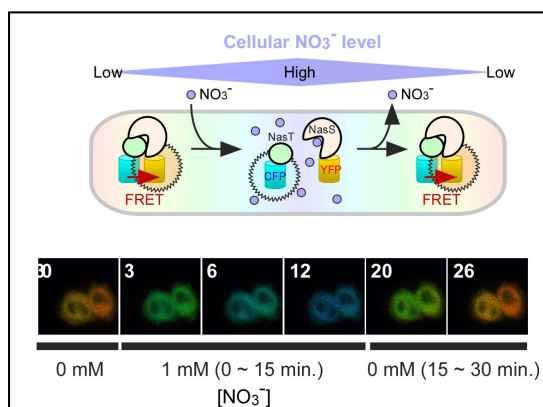


図 8 硝酸塩濃度変化を蛍光強度の変化として捉えるシステム・sNOOpy。このシステムを哺乳動物細胞内に導入すると、生きた細胞内の硝酸塩濃度変化をリアルタイムに可視化することができる。

このシステムを sNOOpy (sensor for $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ in physiology) と名付けた。sNOOpy は細胞内の硝酸塩濃度変化も検出することができ、今後は植物、微生物などの窒素代謝研究にも応用されることが期待される。

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)

Visualization of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ Dynamics in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Imaging Employing a Rhizobial Two-component Regulatory System.

Masafumi Hidaka, Aina Gotoh, Taiki Shimizu, Kiwamu Minamisawa, Hiromi Imamura, Takafumi Uchida.

Journal of Biological Chemistry, 291, 2260-2269 (2016) (査読あり)

Doi: 10.1074/jbc.M115.687632

[学会発表](計2件)

日高将文、後藤愛那、清水泰希、南澤究、今村博臣、内田隆史

微生物環境応答システムの速度論的解析と応用開発

日本農芸化学会年会、2016年3月27~30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

後藤愛那、日高将文、清水泰希、板倉学、クリスティーナ・サンチェス、南澤究、今村博臣、内田隆史

根粒菌の二成分制御システムを利用した $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ バイオセンサーの開発

日本生化学会、2014年10月15~18日、京都国際会館(京都府京都市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

日高 将文 (HIDAKA, Masafumi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号: 00584848