

## 6-5 生命・錯体分子科学研究領域

### 生体分子機能研究部門

青野重利(教授)(2002年5月1日着任)

A-1) 専門領域：生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) ヘム含有型気体分子センサータンパク質の構造と機能に関する研究
- b) ヘムをシグナル分子とする新規な転写調節因子の構造と機能に関する研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の酸素に対する走化性 (Aerotaxis) 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 Aer2 タンパク質の構造機能相関の解明を目的とし, Aer2 タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。アミノ酸配列から推定される Aer2 のドメイン構造は, N 末から HAMP, PAS, HAMP, MCP の各ドメインが連続していると考えられている。本年度の研究では, HAMP-PAS-HAMP ドメイン部分, および PAS-HAMP ドメイン部分の結晶構造解析に成功した。N 末および PAS ドメインの後方に存在する HAMP ドメインはそれぞれ, 三つおよび二つの HAMP ユニットが連結した poly-HAMP 構造を有している。HAMP ドメインと PAS ドメインは直線状に連結されており, 両者の間で直接的なタンパク質間相互作用は存在していないことが分かった。酸素センサーの本体として機能するヘムは, PAS ドメイン中に存在している。本研究において構造決定した Aer2 は, いずれの場合もシアン結合型である。ヘム鉄に配位した CN<sup>-</sup> には Trp283 が相互作用していることが分かった。シアン結合型を酸素結合型のモデルとして考えることができるとすれば, Aer2 に酸素が結合した場合には, ヘムに結合した酸素分子に Trp283 が水素結合しているものと推定される。Trp283L 変異体は, 安定な酸素結合型を形成しないことが分かった。このことから, Trp283 が酸素と水素結合を形成し, 酸素結合型 Aer2 の安定化に寄与しているというモデルは妥当なものであると考えられる。Trp283 は, PAS ドメインの下流に存在する HAMP ドメインとのリンカーに連結している PAS ドメインの最も C 末側の β シート中に存在している。したがって, ヘムに対する酸素分子の結合の有無, すなわち Trp283 と酸素間での水素結合の有無が, Trp283 のコンフォメーション変化を誘起し, そのコンフォメーション変化がダイレクトに C 末側 HAMP ドメインならびに MCP ドメインのコンフォメーション変化へと繋がることにより分子間シグナル伝達反応が進行しているものと考えられる。
- b) 乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) はヘム生合成系を欠損しているが, 外部からヘム分子を取込むことにより酸素呼吸により生育可能である。しかし, 必要量以上に取り込まれたヘム分子は, 活性酸素産生などにより細胞毒性を示すため, 細胞内のヘム濃度は厳密な制御を受けている。本年度の研究においては, 乳酸菌中で過剰なヘムを感知し, ヘム排出に関与するタンパク質群の発現制御を行っている転写調節因子 HrtR (以前の名称では YgfC) タンパク質の X 線結晶構造解析を行うとともに, ヘム分子による HrtR の機能制御機構の解明を行った。HrtR はホモダイマーとして存在しており, その全体構造は, 転写調節因子 TetR ファミリーの構造に類似しており, N 末領域には DNA 結合ドメインを, C 末領域にはヘム結合ドメインを有していた。本研究では, ヘムを結合したホロ型, およびヘムを結合していないアポ型, 両方の構造を決定した。ヘムは, His72 および His149 を軸配位子として HrtR に結合し, 6 配位構造

を取ることが分かった。HtrR の標的 DNA 配列の同定にも成功し、アポ型 HtrR のみが標的 DNA に結合可能であることを明らかにした。標的 DNA と複合体を形成した HtrR にヘムを添加すると、HtrR が DNA から解離することが分かった。これらの結果と、X線結晶構造解析により得られた構造情報を総合し、ヘム分子による HtrR の機能制御分子機構の解明を行った。その結果、HtrR にヘムが結合することにより、HtrR ヘム結合ドメインの最も N 末側に存在しているヘリックス・ループ・ヘリック構造部分にコイル・ヘリックス転移が誘起され、さらにこの構造変化により DNA 結合ドメイン全体の相対配置が変化することにより HtrR の DNA 結合能が失われることを明らかにした。

#### B-1) 学術論文

**N. FUJIEDA, T. IKEDA, M. MURATA, S. YANAGISAWA, S. AONO, K. OKUBO, S. NAGANO, T. OGURA, S. HIROTA, S. FUKUZUMI, Y. NAKAMURA, Y. HATA and S. ITO**, “Post-Translational His-Cys Cross-Linkage Formation in Tyrosinase Induced by Copper(II)-Peroxo Species,” *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1180–1183 (2011).

**E. PINAKOULAKI, C. KOUTSOUPAKIS, H. SAWAI, A. PAVLOU, Y. KATO, Y. ASANO and S. AONO**, “Aldoxime Dehydratase: Probing the Heme Environment Involved in the Synthesis of the Carbon–Nitrogen Triple Bond,” *J. Phys. Chem. B* **115**, 13012–13018 (2011).

#### B-4) 招待講演

**S. AONO**, “Structure and function of oxygen sensor proteins adopting a heme-containing PAS domain as a sensor for aerotaxis control,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Jeju (Korea), March 2011.

**S. AONO**, “Biological Sensing and Signal Transduction Systems with a Heme,” 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-15), Vancouver (Canada), August 2011.

青野重利, 「ヘムをシグナル分子とする生体機能制御の分子機構」第108回触媒学会, 北見, 2011年9月.

#### B-7) 学会および社会的活動

##### 学協会役員等

触媒学会生体関連触媒研究会世話人 (2002–).

日本化学会生体機能関連化学部会幹事 (2007–).

日本化学会東海支部常任幹事 (2009–2010).

##### 学会の組織委員等

第14回国際生物無機化学会議組織委員会総務委員長 (2009).

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations 組織委員 (2008–2010).

##### 文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員 (2005–2007).

日本学術振興会国際事業委員会書面審査員 (2005–2007).

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2010–).

##### 学会誌編集委員

*J. Biol. Inorg. Chem.*, Editorial Advisory Board (2002–2004).

*Biosensors*, Editorial Board (2010–).

## B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(C),「シグナルセンサーとしてのヘムを有する転写調節因子の構造と機能に関する研究」青野重利 (2000年-2001年).

科研費特定領域研究(計画研究)「一酸化炭素センサーとして機能する転写調節因子CooAの構造と機能」青野重利 (2000年-2004年).

科研費基盤研究(B),「ヘムを活性中心とする気体分子センサータンパク質の構造と機能」青野重利 (2002年-2003年).

科研費萌芽研究,「気体分子センサータンパク質の構造機能解析とそのバイオ素子への応用」青野重利 (2002年-2003年).

東レ科学振興会科学技術研究助成金,「気体分子による生体機能制御のケミカルバイオロジー」青野重利 (2003年).

科研費基盤研究(B),「生体機能制御に関与する気体分子センサータンパク質の構造と機能」青野重利 (2004年-2006年).

科研費特定領域研究(公募研究)「タンパク質配位空間を利用した気体分子センシングとシグナル伝達」青野重利 (2005年-2007年).

内藤記念科学振興財団内藤記念科学奨励金(研究助成)「気体分子による生体機能制御のケミカルバイオロジー」青野重利 (2006年).

倉田記念日立科学技術財団倉田奨励金(研究助成)「一酸化炭素,一酸化窒素,酸素による遺伝子発現制御の分子機構」青野重利 (2006年).

科研費基盤研究(B),「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」青野重利 (2007年-2009年).

科研費特定領域研究(公募研究)「ガス分子により駆動される新規なセンサータンパク質の機能発現機構」青野重利 (2007年-2010年).

ノバルティス科学振興財団研究奨励金,「ガス分子により駆動される生体内シグナル伝達の分子機構解明」青野重利 (2010年).

野田産業科学研究所研究助成,「ヘムをシグナル分子とする*Lactococcus lactis*における遺伝子発現制御」青野重利 (2011年).

科研費挑戦的萌芽研究,「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」青野重利 (2011年-2012年).

科研費基盤研究(B),「ガス分子による生体機能制御に関与するセンサータンパク質の構造と機能」青野重利 (2011年-2013年).

## C) 研究活動の課題と展望

当研究室では、酸素、一酸化炭素などの気体分子が生理機能を発揮するために必要不可欠な気体分子センサータンパク質を研究対象とし、それらの構造機能相関ならびに機能発現機構を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を進めている。これらの研究に加え、本年度からはヘム分子がエフェクター分子として機能し、細胞内ヘム濃度の恒常性維持に関与している転写調節因子に関する研究にも取り組み始めた。本研究は、細胞中における遷移金属イオン濃度の恒常性維持機構の解明という、大きな研究目標への出発点ともいえる研究である。今後は、構造生物学的、ならびに生化学・分子生物学的な実験手法を活用し、ヘムを含む遷移金属イオンの細胞内濃度恒常性維持に関与するタンパク質群の構造機能相関解明を進めて行きたいと考えている。