

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) 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中に含まれる HemAT-Bs は、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り、酸素センサーの本体として機能するヘムを活性中心として有している。HemAT-Bs 中のヘムには、生理的なエフェクター分子である酸素以外に、CO も結合するが、CO が結合した場合には生理的な応答は起こらない。すなわち、HemAT-Bs は何らかの機構により、生理的なエフェクターである酸素を選択的に認識することにより、酸素センサーとして機能している。本年度の研究においては、時間分解共鳴ラマン分光法を用い、HemAT-Bs による選択的酸素センシングおよび分子内シグナル伝達の分子機構解明を目的とした研究を行った。CO 結合型 HemAT-Bs の光解離に伴って生成する反応中間体では、10 ns ~ 100 μ s の時間領域において $\nu(\text{Fe-His})$ (ヘム鉄と軸配位子であるヒスチジン間の伸縮振動モード) の位置は変化しなかった。これに対して、酸素結合型 HemAT-Bs においては、酸素の光解離後に観測される $\nu(\text{Fe-His})$ は、デオキシ型の $\nu(\text{Fe-His})$ に比べて低波数側にシフトして観測された。これらの結果は、HemAT-Bs に酸素、あるいは CO が結合した場合に、それぞれのヘム近位側のコンフォメーションが異なっていることを示唆している。また、このようなヘム近位側のコンフォメーション変化が、酸素センシングにより誘起される分子内シグナル伝達に関与しているものと考えられる。また、CO 結合型 HemAT-Bs の CO 光解離後の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル測定を行い、CO 結合に伴うタンパク質コンフォメーション変化を追跡した結果、気体分子の結合・解離により B-ヘリックス、G-ヘリックスのコンフォメーション変化が誘起されることが分かった。
- 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。今年度も昨年度に引き続き、*L. lactis* の細胞内ヘム濃度制御に中心的な役割を果たしている転写調節因子 HrtR の構造機能相関の解明に取り組んだ。アポ型 HrtR は、非常に高い DNA 結合能 ($K_d = 0.2$ nM) を有しており、遊離のヘム分子が存在しない条件下においてリプレッサーとして機能し、細胞外へのヘム排出に関与するトランスポーター遺伝子の発現を抑制している。細胞内の遊離ヘム濃度が上昇すると、アポ型 HrtR にヘム分子が結合することにより、HrtR は標的 DNA から解離し、ヘム排出に関与するトランスポーター遺伝子の発現が誘導される。本研究では、アポ型 HrtR と標的 DNA の複合体の結晶構造解析に成功し、その構造を 2.0 Å 分解能で決定した。HrtR は、DNA 結合モチーフとしてヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを有している。本モチーフ中の認識ヘリックス中に存在する Arg46 と Tyr50 の 2 残基が、HrtR による標的 DNA 配列の認識および

特異的結合に中心的な役割を果たしていることが分かった。ヘム結合に伴い、HrtR は標的 DNA から解離する。これは、ヘム結合に伴って HrtR の N 末ドメイン (DNA 結合ドメイン) の相対配置が変化し、二つのサブユニットにそれぞれ存在する DNA 認識ヘリックス間の距離が増大し、その結果、DNA 認識ヘリックスが標的 DNA の主溝に結合できなくなるためであることが分かった。

B-1) 学術論文

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, H. ISHIKAWA, Y. MIZUTANI and S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-Based Sensor Protein Aer2 from *Pseudomonas aeruginosa*,” *Chem. Commun.* **48**, 6523–6525 (2012).

S. EL-MASHTOLY, M. KUBO, Y. GU, H. SAWAI, S. NAKASIMA, T. OGURA, S. AONO and T. KITAGAWA, “Site-Specific Protein Dynamics in Communication Pathway from Sensor to Signaling Domain of Oxygen Sensor Protein, HemAT-Bs: Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Study,” *J. Biol. Chem.* **287**, 19973–19984 (2012).

H. SAWAI*, M. YAMANAKA*, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO and S. AONO, “Structural Basis for the Transcriptional Regulation of Heme Homeostasis in *Lactococcus lactis*,” *J. Biol. Chem.* **287**, 30755–30768 (2012). (* equal contribution)

Y. YOSHIDA, H. ISHIKAWA, S. AONO and Y. MIZUTANI, “Structural Dynamics of Proximal Heme Pocket in HemAT-Bs Associated with O₂ Dissociation,” *Biochem. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1824**, 866–872 (2012).

B-3) 総説, 著書

S. AONO, “Novel bacterial gas sensor proteins with transition-metal-containing prosthetic groups as active sites,” *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 678–686 (2012).

青野重利, 「鉄分バランスを整える—乳酸菌における細胞内ヘム濃度制御」, *化学* **67**, 68–69 (2012).

B-4) 招待講演

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Nara (Japan), January 2012.

S. AONO, “Transcriptional regulation by heme acting as a signaling molecule,” 221st The Electrochemical Society Meeting, Seattle (U.S.A.), May 2012.

S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis*,” 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-7), Jeju (Korea), July 2012.

S. AONO, “Molecular mechanism of heme-responsive transcriptional regulation,” 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-6), Hong Kong (China), November 2012.

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

14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry 組織委員会総務委員長 (2009).

The first International Symposium on Biofunctional Chemistry 組織委員 (2012).

Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations 組織委員 (2008–2010, 2012).

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 (2010–2012).

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

生物は、様々な外部環境の変化に応答・対応しながら、生体内の恒常性を維持している。我々の研究グループでは、生物にとって最も重要な遷移金属イオンである鉄イオンの細胞内恒常性維持に興味をもち、細胞内の鉄イオンの恒常性維持機構解明を目的とした研究に取り組んでいる。なかでも、鉄イオンを含む化合物である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重点を置き、研究を進めている。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。