

## 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) 新規なセンサー型転写調節因子の構造と機能に関する研究
- b) 細菌のヘム取り込み反応に関与するタンパク質の構造機能相関解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) *Thermus thermophilus* に含まれる CarH は、カロテノイド色素合成酵素の発現を光依存的に制御している転写調節因子であり、ビタミン B12 (アデノシルコバラミン) を光受容体として利用している新規な光センサータンパク質である。暗所で調製したアデノシルコバラミン結合型 CarH (AdoCbl-CarH) は、四量体構造を有しているが、これに可視光を照射すると単量体へと解離した。光照射による四量体から単量体への高次構造変化は不可逆的な変化であり、光照射後のサンプルを暗所に戻しても四量体へと戻ることはなかった。CarH による光センシング、および光による CarH の機能制御の分子機構を明らかにするため、CarH の結晶構造解析を行い、暗所で調製した AdoCbl-CarH の結晶構造解析に成功した。得られた結晶構造中で CarH は四量体を形成しており、CarH プロトマーは三つのドメイン (N 末端側から順に DNA 結合ドメイン、helix-bundle ドメイン、Rossman-fold ドメイン) から構成されていた。アデノシルコバラミンは、helix-bundle ドメインと Rossman-fold ドメインに挟まれる形で結合しており、Rossman-fold ドメイン中の His177 が第 6 配位子としてコバルトに配位していた。アデノシル基は、helix-bundle ドメイン中の二本のヘリックスに挟まれて存在しており、Trp131 と His142 がアデノシル基周辺に位置することにより、その配向を制御していると推定された。CarH が光を感知すると、アデノシル基が光解離することにより、コバラミン周辺のコンフォメーションが変化し、その結果として四量体から単量体への高次構造変化が誘起されるものと考えられる。
- b) コリネバクテリア中に含まれるヘム取り込み系は、コリネバクテリアの細胞表層に存在し、ヘムの結合・輸送に関与する HtaA-HtaB タンパク質と、細胞内へのヘム輸送に関与する HmuT-HmuU-HmuV タンパク質から構成されている。今年度の研究では、細胞表層に存在するヘム輸送タンパク質 HtaA の N 末ドメイン (HtaA-N) の結晶構造決定に成功した。HtaA-N は 11 本の  $\beta$ -strand と 2 本の短い  $\alpha$ -helix から構成されており、HtaA-N 1 分子あたりにヘム 1 分子が結合していた。分子表面近傍に、 $\beta$ -strand 間を繋ぐ二つのループ領域がヘム分子を挟み込むように存在し、疎水性アミノ酸が豊富なポケット中にヘムが結合していた。ヘム鉄は Tyr58 を軸配位子とする 5 配位構造をとっていた。Tyr58 のヒドロキシ酸素は、近傍の His111 のイプシロン位の窒素と水素結合を形成していた。HtaA-N と HtaA の C 末ドメイン (HtaA-C) および HtaB のアミノ酸配列を比較すると、HtaA-N においてヘム結合ポケットを形成する疎水性アミノ酸や、ヘム鉄の軸配位子である Tyr58、Tyr58 と水素結合している His は、HtaA-C、HtaB の対応する位置に保存されていた。このことから、HtaA-N、HtaA-C、HtaB は共通の構造基盤を有するヘム結合・輸送タンパク質であると考えられる。HtaA-N と共通のフォールディングを有する既知のヘム結合タンパク質は存在しなかった。しかしながら、これまでに報告されているヘム輸送タンパク質中に存在するヘム結合ドメイン (NEAT ドメイン) と

HtaA-Nとの間には、いくつかの共通する性質が見られた。HtaA-NとNEATドメインでは、アミノ酸配列の相同性はないが、 $\beta$ シート構造を骨格としているという共通点があった。また、ヘム結合部位に着目すると、いずれもTyrがヘムの軸配位子として機能しており、軸配位子であるTyrは近傍の残基と水素結合を形成している。この水素結合は、ヘム取込み系で機能するタンパク質に共通の構造基盤であると考えられ、ヘムの結合親和性の制御に寄与していると推定される。

#### B-1) 学術論文

**N. MURAKI and S. AONO**, “Structural Basis for Heme Recognition by HmuT Responsible for Heme Transport to the Heme Transporter in *Corynebacterium glutamicum*,” *Chem. Lett.* **45**, 24–26 (2015).

**N. MURAKI, C. KITATSUJI, M. OGURA, T. UCHIDA, K. ISHIMORI and S. AONO**, “Structural Characterization of Heme Environmental Mutants of CgHmuT that Shuttles Heme Molecules to Heme Transporters,” *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 829 (10 pages) (2016).

**A. OTOMO, H. ISHIKAWA, M. MIZUNO, T. KIMURA, M. KUBO, Y. SHIRO, S. AONO and Y. MIZUTANI**, “A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-Helix in CoxA Upon CO Dissociation Using Time-Resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy,” *J. Phys. Chem. B* **120**, 7836–7843 (2016).

**T. NAKAE, M. HIROTSU, S. AONO and H. NAKAJIMA**, “Visible-Light-Induced Release of CO by Thiolate Iron(III) Carbonyl Complexes Bearing N,C,S-Pincer Ligands,” *Dalton Trans.* **45**, 16153–16156 (2016).

#### B-4) 招待講演

**S. AONO**, “Structure and Function of Heme Acquisition System in *Corynebacterium glutamicum*,” 229<sup>th</sup> The Electrochemical Society Meeting, San Diego (U.S.A.), May 2016.

**S. AONO**, “Structural Basis for Heme Acquisition in *Corynebacterium glutamicum*,” 9<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-9), Nanjing (China), July 2016.

**S. AONO**, “New Functions of Heme: Sensing and Signaling in Biological Systems,” 9<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Gyeongju (Korea), November 2016.

**N. MURAKI**, “Structural Analysis of a Novel Heme Acquisition Protein, Heme Transport-Associated (Hta) Family,” 9<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Gyeongju (Korea), November 2016.

**S. AONO**, “Structural Basis for the Molecular Mechanism of Heme Acquisition in *Corynebacterium glutamicum*,” 8<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Auckland (New Zealand), December 2016.

#### 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 (2007–2014).

日本化学会東海支部常任幹事 (2009–2010).

日本化学会生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン幹事 (2014–2015).

日本化学会生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン主査 (2016–).

#### 学会の組織委員等

14<sup>th</sup> 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, 2012–2016).

#### 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, 2014–2015).

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員及び国際事業委員会書面審査委員・書面評価員 (2016–2017).

大阪大学蛋白質研究所専門委員会委員 (2016–).

#### 学会誌編集委員

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

*Biosensors*, Editorial Board (2010–).

*Chemistry Letters*, Section Editor (2013–).

#### B-10) 競争的資金

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).

科研費挑戦的萌芽研究,「生物の環境センシング機能を基盤とした高感度な環境汚染物質検出システムの構築」, 青野重利 (2013年–2014年).

科研費挑戦的萌芽研究,「環境汚染物質に対する自発集積能を有する高感度汚染検出システムの構築」, 青野重利 (2015年–2016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に着目し、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やヘム分子取込み・排出に関与する一連のタンパク質の構造機能相関解明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いきたいと考えている。