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) コリネバクテリア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
- b) 細胞内の遷移金属イオン濃度恒常性維持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) 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。HtaA はリンカーでつながれた N 末端ドメイン (HtaA-N) と C 末端ドメイン (HtaA-C) から、HtaB は1つのドメインから構成されている。HtaA-N, HtaA-C, HtaB は、いずれもホロ型 (ヘム結合型) として単離精製された。本年度の研究で決定した HtaA-C および HtaB の全体構造は、以前に構造決定した HtaA-N と高い相同性を示した。いずれの構造においても、Tyr が第 5 配位子としてヘム鉄に配位しており、Tyr は近傍の His と水素結合を形成していた。また、HtaA-N で観測されていた、ヘムプロピオン酸と Ser 間での水素結合、Phe とヘムピロール環の間の π - π スタッキングも、HtaA-N, HtaA-C, HtaB すべてで保存されており、これらの相互作用が、ヘム認識に重要な役割を果たしていることを示唆している。HtaA-N, HtaA-C, HtaB の全体構造が高い相同性を示す一方、結合するヘムの配向やヘム結合部位周辺のループの長さには、違いが見られた。黄色ブドウ球菌のヘム取り込み系では、ヘム結合部位周辺のループがヘム結合タンパク質間の特異的な認識に寄与することが報告されており、HtaA/HtaB においてもループの長さの違いがヘムの輸送に関わっている可能性が考えられる。ヘム獲得・輸送反応において、ヘム軸配位子である Tyr と近傍の His 間での水素結合が果たす役割を明らかにするため、His を Ala に置換した HtaA-N, HtaA-C, HtaB の変異型タンパク質を調製した。いずれの変異体も、アポ型として単離精製されたことから、これら変異体ではヘムへの結合親和性が低下していることが分かった。これら変異体の結晶化条件のスクリーニングを行った結果、HtaA-C の H434A 変異体の結晶が得られ、その結晶構造を決定した。HtaA-C の H434A 変異体の結晶構造では、非対称単位中の 2 分子が N 末端の β -strand のドメインスワップによって二量体を形成していた。この二量体構造では、ヘムの軸配位子となる Tyr が隣り合う分子のヘム結合領域に入り込んでいることが分かった。現在、HtaA/HtaB 間でのヘム輸送反応において、タンパク質がダイナミックに構造変化 (ドメインスワッピングが起こる) することにより、ホロ型 HtaA とアポ型 HtaB 間で同様な二量体構造を過渡的に形成し、ヘム輸送反応が進行するという作業仮説を立て、検証を進めている。
- b) 新生児の細菌性髄膜炎や敗血症の原因菌である連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae* は、ヘム生合成のための酵素系を有しておらず、宿主から獲得したヘムを利用して生育する。宿主から獲得したヘムは、ヘムトランスポーターにより細胞内に取り込まれるが、フリーなヘム分子による細胞毒性を回避するために、細胞内ヘム濃度は厳密に制御される必要がある。*S. agalactiae* は、細胞内の過剰なヘム分子を感知し、それらを細胞外へ排出するヘムエクスポーター

を発現することにより、ヘムの細胞毒性を回避している。本研究では、このヘム分子感知に関与しているセンサータンパク質 PefR の構造機能相関解明を目的とした。本年度は、PefR の発現・精製系を構築し、PefR の結晶構造解明を試みた。その結果、X線結晶構造解析に適したアポ型 PefR の結晶を得ることができ、2.6Å 分解能で構造解析に成功した。PefR は、MarR ファミリーに属する転写調節因子と相同なホモ二量対構造を有しており、それぞれのサブユニットの N 末は、winged HTH (helix-turn-helix) を DNA 結合モチーフとする DNA 結合ドメインを構成していた。in vitro DNA 結合アッセイの結果、アポ型 PefR が標的 DNA に対する結合能を有しているのに対して、ヘムを結合したホロ型 PefR では、DNA 結合能が失われていることが分かった。これらの結果より、アポ型 PefR は、ヘムエクスポーター遺伝子上流に結合することにより、ヘムエクスポーターの発現を抑制していると考えられる。また、細胞内のフリーなヘム分子が PefR に結合することによりホロ型 PefR が生成すると、標的 DNA から PefR が解離することにより、ヘムエクスポーターの発現が誘導され、その結果、過剰なヘムが細胞内から細胞外へと輸送されることで、細胞内ヘム濃度を制御していると考えられる。

B-1) 学術論文

A. PAVLOU, A. LOULLIS, H. YOSHIMURA, S. AONO and E. PINAKOULAKI, “Probing the Role of the Heme Distal and Proximal Environment in Ligand Dynamics in the Signal Transducer Protein HemAT by Time-Resolved Step-Scan FTIR and Resonance Raman Spectroscopy,” *Biochemistry* **56**, 5309–5317 (2017).

B-3) 総説, 著書

青野重利, 「フロンティア生物無機化学」, 錯体化学会フロンティア選書, 三共出版, 430–456 (2016).

B-4) 招待講演

S. AONO, “Structural characterization of heme uptake system in Corynebacteria,” 231st The Electrochemical Society Meeting, New Orleans (U.S.A.), May 2017.

青野重利, 「遷移金属が関与するシグナルセンシングとシグナル伝達」, 第 44 回生体分子科学討論会, 秋田, 2017 年 6 月.

青野重利, 「Structural basis for the heme-dependent transcriptional regulation」, 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本, 2017 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 (2007–2014).

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 (2016–2017).

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, 2012–2016).
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).
大阪大学蛋白質研究所専門委員会委員長 (2017).
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–).
その他
総合研究大学院大学物理科学研究科構造分子科学専攻長 (2016–).

B-10) 競争的資金

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).
科研費若手研究(B), 「ビタミン B12 を感光色素とする新規光センサーの構造機能研究」, 村木則文 (2014年–2016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).
科研費若手研究(B), 「過渡的複合体に着目したヘムリレー輸送の分子機構の解明」, 村木則文 (2017年–2018年).
科研費基盤研究(B), 「新規な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」, 青野重利 (2017年–2020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行きたいと考えている。