

戦略的方法論研究領域
(生物無機)

青野重利 (教授)

1) 専門領域：生物無機化学

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

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。

4) 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 and Proteomics* **1824**, 866-872 (2012).

5) 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へム濃度制御」, *化学* **67**, 68-69 (2012).

6) 国際会議発表リスト

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, H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in lactic acid bacteria” 8th International Biometals Symposium (Biometals 2012), Brussels (Belgium), July, 2012.

H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Crystal structures of heme-sensing transcriptional regulator responsible for heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 11), Granada (Spain), September, 2012.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. KATO, Y. ASANO, Y. SHIRO, S. AONO, “X-ray crystal structure of Michaelis complex of aldoxime dehydratase, a new heme-containing hydrolyase” EMBO Conference: Catalytic Mechanisms by Biological Systems, Groningen (The Netherlands), October, 2012.

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

H. SAWAI, M. YAMANAKA, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*” The 1st International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo (Japan), November, 2012.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 5th Korea-Japan Seminar on

Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Seoul (Korea), February, 2013.

7) 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.

H. SAWAI, H. SUGIMOTO, Y. SHIRO, S. AONO, “Structural Basis for Oxygen Sensing and Signal Transduction of the Heme-based Sensor Protein Aer2” 5th Korea-Japan Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Seoul (Korea), February, 2013.

8) 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委員 (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-).

11) 競争的資金

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).