

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19350089
 研究課題名 (和文) ガスセンサーヘム蛋白質の特異的リガンド識別と検出情報伝達機構の構造化学
 研究課題名 (英文) Structural Chemistry Involved in Discrimination of Diatomic Ligands and Transduction Mechanism of Sensed Information of Gas Sensing Heme Proteins.
 研究代表者
 北川 禎三 (KITAGAWA TEIZO)
 財団法人・豊田理化学研究所・フェロー
 研究者番号：40029955

研究成果の概要：O₂分子センサーである *Ec* DOS と HemAT-*Bs* を詳しく調べた。これらの蛋白では、N 末端側にある Fe(II)へみに O₂, CO, 或は NO 等の 2 原子分子が結合するが、ターゲット分子が結合した時のみ C 末端側で機能 (*Ec* DOS ではリン酸ジエステル化活性、HemAT-*Bs* では次の蛋白に情報伝達) を発揮する。蛋白の構造変化を紫外共鳴ラマン法で、ヘムの構造変化を可視共鳴ラマン法で検出し、蛋白の識別法と情報伝達の構造化学を解明した。呼吸酵素のプロトンポンプ機構についても調べた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2008 年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体分子、生物物理、生体生命情報学、振動分光学、ヘム蛋白質、シトクロム酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

申請者は色々なヘム蛋白質の共鳴ラマンスペクトルを測定して、蛋白質高次構造変化と機能発現との関係を構造化学の言葉で記述する研究を展開してきた。特に酸素を活性化する酵素の反応機構や、ヘモグロビンのアロステリック効果に関して国際的に注目される成果を発表し、共鳴ラマン分光法の威力

を世界に示してきた。呼吸酵素であるシトクロム酸化酵素の電子駆動プロトンポンプの機構解明が残された大きな問題であった。

一方、色々な生物の遺伝子解析が分子生物学の分野で進展し、新規なヘム蛋白質の遺伝子が見つけられてきた。それをクローニングし、大腸菌の遺伝子ベクターに組み込んで発現させてみると、それらはガスセンサー蛋白

質として機能する新しい蛋白群である事がわかった。生物が自分の周りの環境に適応する為、周りのガス分子を検出し、検出した事を作用部位に伝えて、そこで転写活性を調節したり、酵素反応速度を数百倍変えたり、生物の走光性を変えるシグナル伝達系を制御したりしている事が明らかになってきた。これらの蛋白それぞれは、 O_2 、CO、或はNO等の2原子分子を特異的に検出し、その情報を作用部位に伝達しているらしい事がわかってきた。2原子分子がヘムの鉄に結合する事がprimary eventである。どの2原子分子も鉄に結合するにもかかわらず、各蛋白はターゲット分子が結合したときしかシグナルを作用部位に送らない。ここで新たにわいてきた疑問は、1) 蛋白は大きさの似た2原子分子をどのようにして識別しているのか? 2) 検出の情報をどのようにして作用部位に伝達しているのか?である。この質問に答えられる実験手法は、蛋白の分子量が大きくてNMRは使えないため、共鳴ラマン法がベストであり、それを実施できるのは北川グループであると考えて、各蛋白を単離・精製する生化学者と共同研究体制を組み、その共鳴ラマン分光の研究を始めた。

2. 研究の目的

(1) ガスセンサー蛋白 代表的な O_2 センサー蛋白として phosphodiesterase 活性 (PDE 活性)を持つ大腸菌の DOS 蛋白と O_2 に向かう走行性を制御する緑濃菌の HemAT、CO センサー蛋白として転写活性を持つヒト脳の NPAS2 と窒素固定系を制御する CooA、NO センサー蛋白として GTP を cGMP に変換する可溶性グアニレートシクラーゼ (sGC) を取り上げ、それらにおけるターゲット分子の特異的認識のメカニズムと、認識後の情報伝達の道筋及びダイナミクスを明らかにして、それらに共通に含まれる蛋白アロステリック効果の構造化学を解明する

(2) シトクロム c酸化酵素 上述のものとは全く違うアロステリック効果として、呼吸酵素によるプロトンの能動輸送が有る。電子移動に駆動されるプロトンポンプとして、シトクロム c酸化酵素 (CcO) を取り上げ、ヘム a の酸化還元による蛋白構造変化とプロトン輸送のカップリングを明らかにする。特に CcO の P 中間体について、ラマンバンドの帰属を確立する。また、酸素還元部位であるヘム a_3 からその軸配位子を含むヘリックス X の間の構造変化の伝達速度を明らかにするために CO 型酵素の CO 光解離後の構造ダイナミクスをヘムに注目して可視共鳴ラマン法で調べる。

3. 研究の方法

(1) ガスセンサー蛋白 代表的なガスセン

サー蛋白について、共同研究者の協力の下に蛋白の単離精製を行い、その可視光共鳴ラマンスペクトルを北川が測定する。これによりリガンド脱着によるヘムの構造変化を調べる。リガンド脱着による蛋白のコンフォメーション変化を 220-240 nm 励起の紫外共鳴ラマン分光で調べる。これらの実験装置は、研究代表者の分子研定年退職後は研究分担者の所属する兵庫県立大学で稼働しているため、その研究室の学生も含めて測定チームをつくり、北川は平均月1回兵庫県立大学に出向いて実験をする。緑濃菌の HemAT 蛋白は分子研の青野重利教授の協力の下に、また大腸菌の DOS 蛋白は東北大学多元科学研究所の清水透教授の協力のもとに、単離精製し、部位特異的アミノ酸置換を用意する。

(2) シトクロム c 酸化酵素 酸素同位体感受性低波数ラマン線 (356 cm^{-1}) の帰属に関する実験では、細菌を ^{15}N 標識培地で培養し、そこから ^{15}N ラベル CcO を得る。その P 中間体の共鳴ラマンスペクトルを天然のものと比較する。構造ダイナミクスの実験に関しては、CO を時間幅 10 ns のパルス光で光解離し、遅延時間を 10 ns~5 ms の間で変えて可視共鳴ラマンスペクトルを測定する。

4. 研究成果

(1) ガスセンサー蛋白 HemAT の詳しい研究成果は文献 (①) に、EcDOS の詳しい研究結果は文献 (②③④) に発表してあるが、その要点のみをここに説明する。

細菌 (*Bacillus subtilis*) の O_2 センサー蛋白、HemAT-Bs を調べた。これはヘムを持ち、ヘムに O_2 が結合すると次の蛋白にそれを伝え、最終的にはその生物の走光性を変えて O_2 に向かわせる。CO や NO もヘムには結合するが走光性は変わらない。ヘムに O_2 、CO、NO と云った環境因子が結合した時のヘムの構造変化を可視光共鳴ラマン分光で、その時の蛋白部分の構造変化を紫外光共鳴ラマン分光で検出した。また、遺伝子操作で特定のアミノ酸残基 (Tyr13, 49, 70, 133, 148, 184, Trp132, Thr95, His86) を部位特異的に置換した HemAT-Bs を作り、どの残基が変化するかを帰属した。

Fe- O_2 伸縮振動から、 O_2 結合体に3つの構造があり、蛋白が O_2 と1番強い水素結合を作るものがシグナル伝達の活性種であった。CO は蛋白と水素結合を作らない。ヘムに結合した O_2 と Thr95 が水素結合を作るが、Tyr70 は作らない事、 O_2 の結合によりヘム側鎖6番目のプロピオン酸基が His86 と水素結合をつくる事がわかった。 O_2 の結合による水素結合状態の変化は、蛋白の全体的な構造に影響を与え、Trp132, Tyr133, Tyr70 も少しスペクトル変化を示したが、その大きさはCOやNOの場合

とは異なっていた。換言すると、蛋白はその構造変化として、 O_2 , CO, NO の結合を識別している事が明らかになった。

大腸菌の O_2 分子センサーで、 $3' \cdot 5'$ -cyclic diguanylic acid のリン酸ジエステル化酵素活性を持つ DOS 蛋白 (*Ec* DOS) を調べた。この蛋白では、N 末端側にある Fe(II)ヘムに O_2 , CO, 或は NO と云った 2 原子分子が結合すると、C 末端側にある触媒部位での活性は高くなるが、高くなり方は結合する分子種により異なる。具体的な戦略として、活性のある野生株蛋白と、その中の重要と思われるアミノ酸残基を 1 つずつ別のアミノ酸に置換した変異蛋白のラマンスペクトルを比較し、一方でその蛋白の酵素活性を見るという方法をとった。ラマンスペクトルの測定には、ヘム含有ドメイン (147 残基、DOSH と略す) を用い、活性測定には全長の蛋白を用いた。

紫外共鳴ラマンスペクトルでは Trp と Tyr の側鎖モードが観測される。DOSH には 2 個の Trp (#53, #110) と 4 個の Tyr (#55, #110, #125, #126) がある。その帰属に当たって次の部位特異的変異体を用いた; Trp53→Phe, Asn84→Val, Tyr126→Phe, Glu93→Ile, Met95→Ala, Arg97→Ile, Arg97→Ala, Arg97→Glu, Phe113→Leu, Phe113→Thr。X 線結晶解析から、His77 がヘムに配位し、ヘムビニル基の近くに Trp53 があって、ヘムポケットに Tyr80 と Tyr126 のある事がわかっている。ヘムは異なるリガンドの結合を、異なるコンフォメーション変化を蛋白に起こさせてリガンドを区別している。具体的には、Trp53 は O_2 結合でより疎水的環境に移るが CO 結合ではより親水的環境に移る。 O_2 及び CO 結合形の PDE 活性は Trp53Phe では野生株より低い。一方、野生株に O_2 或は CO が結合すると Tyr126 のスペクトルが大きく変わる。この事から O_2 或は CO が結合すると Asn84 が Tyr126 と水素結合をつくるが、リガンド無しでは水素結合はできてない、と考えられた。Asn84Val や Tyr126Phe 変異体で活性が落ちるのは、Asn84 と Tyr126 との水素結合ができないため、ヘムのプロピオン酸基側鎖と Asn84 との水素結合を通して Tyr126 にシグナル伝達ができないためと思われる。

CO 結合形と NO 結合形に対しては、水素結合型と非水素結合型の両方が共存している事がわかった。前者に対しては Arg97 がヘムリガンドと水素結合していた。また Arg97 と Phe113 がヘム結合リガンドと重要な相互作用をしている事がスペクトルで示され、Phe113 の変異は PDE 活性に影響を与えた。CO 結合形から CO を光解離させるとヘムプロピオン酸側鎖の構造変化が観測され、Met95 が光解離後過度的に CO の代りに配位する様相が、Arg97 と Phe113 の変異によりかなり

変えられた。この事は、Arg97 の静電相互作用と Phe113 の立体障害が、Met95 と CO の競争的配位を制御している事を示唆する。これらを基に、ヘム側鎖プロピオン酸基と、それに繋がる水素結合が情報伝達に重要な役割を果たしているモデルを提案する。

(2) シトクロム *c* 酸化酵素 CcO の Fe-Cu センターの構造化学に関する研究結果は文献 (⑥⑧) に発表してあるが、論文に未発表の P 中間体および CO 型酵素の構造ダイナミクスに関しては、結果を以下に説明する。

天然 CcO の P 中間体に現れる $3 \ 5 \ 6 \text{ cm}^{-1}$ のラマンバンドは ^{15}N -CcO では $3 \ 5 \ 3 \text{ cm}^{-1}$ に低波数シフトしたので (His)N-Fe=O 変角振動への帰属が確立した。なお、イミダゾールを軸配位子として配位させた Fe(IV)=O ポルフィンモデル化合物として、密度汎関数法に基づく基準振動計算を行ったところ、上記の帰属を支持する結果が得られた。この変角振動モードがラマン活性であることは (His)N-Fe=O 結合が非直線である事を意味する。その歪みエネルギーが CcO のこの段階でのプロトンポンプに使われるものと思われる。

CO を光解離後 10 ns~5 ms の可視共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、時間の経過に伴い次の 3 つの顕著な変化が検出された。すなわち、(1) Fe-His 伸縮振動数は 100 ns までは不変で、その後 $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ の時定数で低波数シフトを示す。(2) ポルフィリンの平面性のマーカーである ν_9 モードの強度は 100 ns 以内に低下し、その後一定値をとる。

(3) ヘム側鎖フォルミル基の変角振動モードは 5 ms 以降に高波数シフトを示すが、これはこの置換基の立体障害が増すことを示唆する。以上の観測結果から次の描像が推論された。CO 光解離後 100 ns 以内にヘムの平面性が低下し、その後 Fe-His 結合が伸び、さらにその後ヘムが Fe-His 距離を一定に保ったまま水平変位する。この構造ダイナミクスが CcO の機能と関係していると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

① El-Mashtoly, S.F., Y. Gu, H. Yoshimura, S. Yoshioka, S. Aono, and T. Kitagawa, *Protein conformation changes of HemAT-bs upon ligand binding probed by ultraviolet resonance Raman spectroscopy*. J. Biol. Chem. **283**: p. 6942-6949 2008.

② El-Mashtoly, S.F. and T. Kitagawa, *Structural chemistry involved in information detection and transmission by gas sensor heme proteins: Resonance Raman*

Investigation, Pure and Appl. Chem. 80, p.2667-2678, 2008.

③ El-Mashtoly, S.F., S. Nakashima, A. Tanaka, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *Roles of Arg97 and Tyr113 in regulation of distal ligand binding to heme in Ec Dos protein: Resonance Raman and mutation study*. J. Biol. Chem. **283**; p.19000-19010, 2008.

④ El-Mashtoly, S.F., H. Takahashi, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *Ultraviolet resonance Raman evidence for utilization of the heme 6-propionate hydrogen-bond network in signal transmission from heme to protein in Ec Dos protein*. J. Am. Chem. Soc. **129**: p. 3556-3563 2007.

⑤ Sato, A., Y. Gao, T. Kitagawa, and Y. Mizutani, *Primary protein response after ligand photodissociation in carbonmonoxy myoglobin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**: p. 9627-9632 2007..

⑥ Varotsis, C., T. Ohta, T. Kitagawa, T. Soulimane, and E. Pinakoulaki, *The structure of the hyponitrite species in a heme Fe-Cu binuclear center*. Angew. Chem. Intl. ed. **46**: p. 1-6 2007.

⑦ Fukumura, E., Sugimoto, H., Misumi, Y., Ogura, T. and Shiro, Y., *Cooperative Binding of L-Trp to Human Tryptophan 2, 3-Dioxygenase: Resonance Raman Spectroscopic Analysis*, J. Biochem., 2009, 145, 505-515.

⑧ Aoyama, H., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Hirata, K., Yamashita, E., Tsukihara, T., Ogura, T. and Yoshikawa, S., *A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome c oxidase could suppress the proton pump.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2009, 106, 2165-2169.

⑨ Ikemura, K., Mukai, M., Shimada, H., Tsukihara, T., Yamaguchi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Ogura, T., *Red-Excitation Resonance Raman Analysis of the n_{Fe=O} Mode of Ferryl-Oxo Hemoproteins*, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 14384-14385.

[学会発表] (計 23 件)

① T. Kitagawa, S. F. El-Mashtoly, and T. Shimizu, "Structural Chemistry of Sensing Mechanism of O₂-sensor Protein, Ec DOS, Revealed with Resonance Raman Spectroscopy" AsBIC-IV, Nov. 10-13, 2008, Ramada Plaza, Ceju, Korea

② 北川禎三, SamirEl-Mashtoly, 清水 透 "酸素分子センサー蛋白、EcDOS, のセンシング機構の構造化学: 共鳴ラマン分光法によ

る研究"、第2回分子科学討論会、福岡、2008. 9. 24-27、3C13

③ Takashi Ogura, Sachiko Yanagisawa, Kenichiro Ikemura, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Hideo Shimada, *Resonance Raman Spectroscopy of Cytochrome c Oxidase*, Invited Talk, The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Jeju, Korea

④ Takashi Ogura, *Probing Chemical Reactions in Intact Whole Mitochondria through Analysis of Molecular Vibrations*, Okazaki Conference "Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function", Invited Talk, Nov. 10 - 12, 2007, Okazaki.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川禎三 (KITAGAWA TEIZO)

(財) 豊田理化学研究所・フェロー
研究者番号; 40029955

(2) 研究分担者

小倉尚志 (OGURA TAKASHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号: 70183770

(3) 連携研究者

Samir F. El-Mashtoly (Dept. of Chem. Fac. of Sci., King Khalid University, Abha, Saudi Arabia).

(4) 協力研究者

池村賢一郎 (IKEMURA KENICHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・博士後期課程

(5) 協力研究者

久保 稔 (KUBO MINORU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任助教

(6) 協力研究者

石上 泉 (ISHIGAMI IZUMI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・博士
前期課程

(7) 協力研究者

柳澤幸子 (YANAGISAWA SACHIKO)
(独) 日本学術振興会・特別研究員