

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350086

研究課題名(和文)紫外共鳴ラマン分光法によるヘム蛋白質高次構造変化の検出と蛋白質機能制御機構の解明

研究課題名(英文)UV resonance Raman investigation on detection of higher order structural changes of heme proteins and elucidation of functional regulation mechanism

研究代表者

北川 禎三 (Kitagawa, Teizo)

兵庫県立大学・生命理学研究科・名誉教授

研究者番号：40029955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトHbの 或は サブユニットのみがFe-His結合を持たないが、O₂分子を4個結合できる部位特異的変位体を作製し、その酸素平衡曲線を決めた。同時に、リガンド結合による高次構造変化を¹H NMR、V- and UV-resonance Raman、nearUV CDスペクトルで調べた。分光学的測定はリガンド結合による高次構造変化は起こらない事を示し、 のFe-His結合の消失はHbをTに凍結させ、 のそれは のO₂親和性を高めた。NOセンサーのsGCのモデル蛋白として、バクテリアのH-NOX蛋白の共鳴ラマンを調べた。

研究成果の概要(英文)：Cavity mutant human Hb, which lacks the Fe-His bond in either the or subunit but can bind four O₂ molecules, was prepared. Its oxygen binding curve was determined, and higher order structural changes upon O₂ binding were investigated with ¹H NMR, V- and UV-resonance Raman, and nearUV CD spectra. Spectroscopic measurements revealed that the quaternary structure change did not occur upon ligand binding. The absence of Fe-His bond in froze Hb in T while that of raised the affinity of . Resonance Raman spectra of NO sensor protein, mammalian sGC and its model protein, bacterial H-NOX, were investigated.

研究分野：生物物理化学

キーワード：生物物理 蛋白質 シグナル伝達 生体分子 分子認識 振動分光 共鳴ラマン散乱

1. 研究開始当初の背景 酵素反応等の細胞中の化学反応速度は温度一定の条件下で制御されている。蛋白質はそれを高次構造変化で実現している。此の事は概念的にはわかるが、構造揺らぎの大きい蛋白中で、どのような構造変化がどれほど速く起こって、実際にこれを実行しているかは、分子科学のレベルでは明らかでない。それを明らかにしていく事が、生命科学の発展には必須の基礎科学である。

研究代表者が金属ポルフィリンの共鳴ラマン線を各振動モードに帰属して以来、金属ポルフィリンやヘム蛋白質の共鳴ラマンスペクトルは、申請者の付けたモード番号で国際的に呼ばれており、ヘム蛋白質の鉄の酸化数や配位数を反映する ν_4 , ν_3 , ν_{10} 等は国内外で広く使われている。又ヘモグロビン(Hb)の鉄-軸配位子(ヒスチジン)伸縮振動のラマンバンド($\nu_{\text{Fe-His}}$)は、Hbの酸素親和性を反映するだけでなく、広くヒスチジン配位のヘム蛋白質全体の蛋白張力マーカーとして使われている。酸素を活性化するヘム酵素の反応中間体の共鳴ラマン分光の研究では、フェリルオキソ中間体の Fe(IV)=O 伸縮振動($\nu_{\text{Fe=O}}$)の帰属に初めて成功し、分担者の小倉がその研究を進展させてきた。特に呼吸酵素による O_2 分子の還元機構については、北川—小倉の研究成果がアメリカの生化学の教科書(H. Lodish, et al.著 Molecular Cell Biology, 4.0版、日本語訳、野田春彦ら、分子細胞生物学第4版(下), p.568, 図16.36, 東京化学同人)に記載されるに到っている。このように北川グループは共鳴ラマン分光法の威力を世界に示してきたので、生物無機化学の国際的COEとして認知され、国内外からサンプルを持参してスペクトル測定に来る人が多かった。代表者の分子研定年退職後、その実験装置をそっくり兵庫県立大学ピコバイオロジー研究所に移管し、分担者の小倉が管理運転している。本研究ではそれらを駆使して、生物界で未解決基本問題の一つであるアロステリック効果の構造化学の問題に挑戦する。

2. 研究の目的 アロステリック効果が機能に直結する蛋白材料として、ガスセンサー蛋白に注目し、基本分子としてヘモグロビン及び呼吸酵素を取り上げる。トリガー分子としては O_2 , CO , NO に注目する。微小な蛋白構造変化を鋭敏に反映する静的及び動的紫外共鳴ラマン分光法を手法として用いる事により、小分子の結合をトリガーとする蛋白高次構造変化の道筋やダイナミクス、即ち情報伝達の構造化学を解明する。近年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、それを作用部位に伝達して、そこで転写活性を調節したり、酵素反応速度を変えたり、生物の走光性を変えるシグナル伝達系を活性化したりしている事が明らかになってきた。これらの蛋白質各々は、 O_2 , CO , 或は NO 等の2原子分子を特異的に検出し、コンフォメーション変化を起こしてその検出を作用部位に伝達している。センサー蛋白のN末端側にあるヘムに二原子分子が結合する事が primary event であり、C末端側にある作用部位の活性を変化させる。どの二原子分子もヘム鉄に結合するにもかかわらず、各蛋白質はターゲット分子が結合した時しか作用部位にシグナルを送らない。ここで疑問は、(A)大きさの似た二原子分子を蛋白質はどのようにして識別しているのか？(B)どのような構造変化がシグナル伝達に使われているのか？である。この疑問に応える事が本研究の具体的目標である。

そこで各蛋白質を単離・精製する生化学者と共同研究を組み、その共鳴ラマンの研究を始めた。大腸菌の O_2 センサーで Phosphodiesterase 活性を持つ DOS を東北大学多元研の清水 透教授と、 O_2 に向かって遊泳する走光性センサーの緑膿菌 HemAT については、分子研の青野重利教授と共同研究をスタートしていた。更に CO センサーで転写活性持つヒト脳の NPAS2 については京都府立大学の佐上郁子教授と、 NO センサーで GTP を cGMP に変換する可溶性グアニレートシクラーゼ(sGC)については、大阪府立大学農学部の竹中教授と新しく共同研究を立ち上げた。一方、分担者の小倉は呼吸酵素の共鳴ラマンの研究を進めており、この頃には Fe(IV)=O のCT吸収バンドが近赤外領域にある事を見つけて、その近赤外線励起共鳴ラマンの観測に成功した。蛋白高次構造と機能との相関を調べる際の基本分子である Hb について、分担者の長友と代表者は、ヒト Hb の四次構造変化を紫外共鳴ラマン法で定量的に見積もる新しい方法を見つけ、国際誌に報告した段階にあった。

3. 研究の方法 3年間に代表的な O_2 センサー、 CO センサー、 NO センサーについて、上に記した(A)と(B)の疑問に回答を出す事を目指す。第1年目は、上記共同研究を続け、DOS, HemAT, NPAS2 及び sGC のサンプルを共同研究者から受け取り、その共鳴ラマンスペクトルを北川が測定する。第2年目には、中国の吉林大学 Li, Zhengqiang 教授の助手である、Dr. Yuebin Zhang が、自分の作った sGC の β サブユニットの#1-185と#1-385蛋白(ヘム結合部位)を持参し、その共鳴ラマンスペクトルを当研究所で測定する。又、ヘムが垂線の周りに90度回転した時にラマンスペクトルがどう変わるかを、部位特異的アミノ酸置換でそのことが起こるヘムオキシゲナーゼ(HO)を用い、ビニル基

及びプロピオン酸基重水素化鉄プロトポルフィリンをHOに再構成して調べる。同じ実験をsGCモデルについて行う。蛋白質のコンフォメーション変化の観測には220-240 nm励起の紫外共鳴ラマン分光法を用いる。これまであまり注目されていなかった低波数領域のヘム側鎖変角振動バンドの変化が、ドメイン界面の蛋白構造マーカーとなる紫外共鳴ラマンバンドの変化と、互いに同調する事を確認するための実験を進める。具体的内容を項目に分けて説明する。

i) ヒトHbのcavity mutantの合成とそのリガンド結合によるサブユニット界面の構造変化: ヒトHbの α 或は β サブユニットのどちらかがFe-His結合を持たないが、分子当たり4個の O_2 が結合できる recombinant Hbを部位特異的アミノ酸置換法で合成する事が可能になった。すなわち、proximal histidineをglycineに置換し、イミダゾール(Im)を培養液に入れておくと、Fe-His結合の代わりにFe-Im結合を持つHbを作ることができ、それには O_2 , CO, NOが結合できる。しかしImの動きはヘリックスと切れている為、リガンド結合が蛋白構造を変えないのでサブユニット界面の構造を変えない可能性が高い。その変位を α サブユニットのみ、或は β サブユニットのみに入れたテトラマーHbを合成し、その酸素平衡曲線、可視及び紫外共鳴ラマン、 1H NMR、近紫外CDを測定して、機能変化と高次構造変化との相関を明らかにする。

ii) O_2 センサー蛋白 HemAT: これはグロビンフォールドを持つ蛋白として岡崎統合バイオサイエンスセンターの青野らにより遺伝子解析で見つけられた蛋白で、菌を O_2 に向かって遊泳させる為のセンサーである。COやNOもヘム鉄に結合するが、生理活性は生み出さない。その紫外共鳴ラマンスペクトルを調べ、この蛋白が二原子分子を識別するメカニズムと、そのナノ秒オーダーの構造ダイナミクスを明らかにする。

iii) ヘムオキシゲナーゼのアミノ酸置換によるヘム90度回転の共鳴ラマンスペクトルへの影響: 岡崎統合バイオサイエンスセンターの藤井らが、HOの α 位特異的ヘム開裂のメカニズムを説明する為、ヘム周辺の蛋白残基を部位特異的に置換してNMRで調べたところ、ある変異体でヘムがヘム垂線の周りに90度回転して δ 位開裂の特異性を示す事を見つけた。北川はその低振動数ラマンスペクトルを測定したが、本研究ではビニル基及びプロピオン酸基を重水素化したヘムでこの蛋白を再構成し、それらのバンドの90度回転の影響を明らかにする。それがsGCのエフェクターで起こっているのではないかと云う、想像に基づく実験である。

iv) 可溶性グアニレートシクラーゼ(sGC)CO錯体の activator による活性化機構: 既に北川はsGCの共鳴ラマンの研究でsGCがNOによって活性化されるメカニズムとして

Fe-His結合のNOによる開裂を報告したが、CO錯体では活性化されない事が知られている。ところが、YC-1やBAYと云ったピリジン誘導体小分子(activator)が存在すると、CO錯体もNO錯体と同じように活性化される事が知られている。それら activator の存在下の共鳴ラマンスペクトルは観測できたが、NO錯体とCO錯体の活性化機構の共通性が不明のままである。吉林大学のDr. Yuebin Zhangを研究協力者として中国から招聘し、彼の作った#1-185と#1-385蛋白を持参してもらって、その共鳴ラマンスペクトルを測定する。

v) バクテリアのH-NOX蛋白の共鳴ラマン: sGCは全て共通にヘムの近くの蛋白残基にTyr-Ser-Arg(YxSxR)というトリプレットモチーフを持ち、それとヘムの相互作用が特異的なラマンスペクトルを生み出す可能性がある。そのモチーフを持つ蛋白として、H-NOXという蛋白を吉林大学のLi, Zhengqiangグループがバクテリアから単離し、その recombinant 蛋白を大腸菌で作る事に成功した。

4. 研究成果

i) ヒトHbのcavity mutantの合成とそのリガンド結合によるサブユニット界面の構造変化: ヒトHbの α 或は β サブユニットのみがFe-His結合を持たない recombinant Hbを、部位特異的アミノ酸置換法で分担者の長友が合成する事に成功した。すなわち、proximal histidine(His-F8)をglycine(Gly)に置換し、His-F8の代わりにイミダゾール(Im)をヘムに配位させると、そのHbには4個の O_2 , CO, NO等が結合できるが、ヘムの構造変化がFヘリックスに伝搬されない。その変位体Hbの可視レーザーによるヘムモードの観測と紫外レーザーによる蛋白モードの観測を行うと共に、此のHbの酸素平衡曲線を測定し、cooperativityがどのように変えられたかも同じサンプルで測定する。リガンド結合による構造変化を 1H -NMR、可視及び紫外共鳴ラマン、near-UV CD、で調べたところ、 α サブユニットのFe-His結合を欠くHbは、 O_2 親和性の異なる2つのヘムが存在する2相性の酸素結合曲線を与え、協同性は示さなかった。一方 β サブユニットFe-His結合を欠くHbは、酸素親和性の高いヘム1種類の存在を示し協同性は示さなかった。分光学的測定結果は、リガンド結合による四次構造変化が起こらない事を示した。 α サブユニットのFe-His結合の消失はHbをTに凍結させるが、 β サブユニットのそれは α サブユニットの O_2 親和性をあげる事がわかった。

ii) 可溶性グアニレートシクラーゼ(sGC)モデルとしてのバクテリアHNOXの共鳴ラマンスペクトル: sGCはCO錯体では活性化されないが、YC-1やBAYと云ったピリジン誘導体小分子(activator)が存在すると、CO錯体もNO錯体と同じように活性化される事が知られてい

て、それら activator 存在下の sGC の CO 錯体の共鳴ラマンスペクトルを報告した。しかし、NO 錯体と CO 錯体の活性化機構の共通性が不明である。そこで吉林大学の Dr. Yuebin Zhang を研究協力者として招聘し、彼が作った #1-185 と #1-385 蛋白 (sGC のヘム結合部位を含む) を持参してもらって、その共鳴ラマンスペクトルを測定した。

sGC のラマンスペクトルは Hb とはかなり異なる。それが蛋白の Tyr-Ser-Arg から成る YxSxR トリプレットモチーフとヘムのプロピオン酸基やビニル基との相互作用のためと想像されている。そのモチーフをもつ、バクテリアの HNOX 蛋白が sGC に似たラマンスペクトルを与えた。そのラマンバンドの帰属の為に重水素ラベルしたヘムで蛋白を再構成する計画を立てた。しかし普通の方法ではヘムの入れ替えは化学的にはできなかったので、自分でヘムを合成できない大腸菌、RP523 株に HNOX を発現させる遺伝子ペクトルを取り込み、RP523 株による HNOX 合成を試みた。最終的にはそれに成功した。それに外部からメソヘムを加えて HNOX が正しくできたので、その共鳴ラマンスペクトルを測定した。

iii) **O₂ センサー HemAT 蛋白**: HemAT はグロビンフォールドを持ち、菌を O₂ に向かって遊泳させるためのセンサー蛋白として、分子研の青野らにより遺伝子解析から見つけれられた蛋白である。CO や NO もヘム鉄には結合するが、生理活性を生み出さない。この蛋白のナノ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法により、蛋白質ダイナミクスを解明した。

iv) **ヘムオキシゲナーゼのアミノ酸置換によるヘム 90 度回転の共鳴ラマンスペクトルへの影響**: 分子研の藤井らが、ヘムオキシゲナーゼのある変異体でヘムがヘム垂線の周りに 90 度回転している事を見つけた。ビニル基及びプロピオン酸基重水素化ヘムでこの蛋白を再構成して、ビニル基とプロピオン酸基のバンドを確認し、90 度回転が共鳴ラマンスペクトルのそれらのモードにどのような影響を与えるかを明らかにした。

v) **シトクロム酸化酵素 (CcO) のプロトンポンプ機構**: 我々は 2011 年に Fe-His 伸縮振動数を通して O₂ 還元反応活性部位の中間的コンフォメーションを検出し、これが O₂ 還元反応とプロトンポンプ反応の共役に関わっていると指摘した。その実験は CO の光解離をトリガーとしたが、CO の濃度を変化させてさらに詳しく調べるとともに、O₂ の解離をトリガーとして測定できる実験系を構築して、構造ダイナミクスを調べる。

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 22+13+17=52 件)

(1) Nakajima, S, T. Ogura, and T. Kitagawa, *Infrared and Raman spectroscopic*

investigation of the reaction mechanism of cytochrome c oxidase, Biochim. Biophys. Acta, 1847, 86-97 (2015), 査読有
DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.08.002

(2) S. Nagatomo, Y. Nagai, Y. Aki, H. Sakurai, K. Imai, N. Mizusawa, T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai, *An origin of cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin; Different roles of the α and β subunits in the $\alpha_2\beta_2$ tetramer*. Pros One, in press 2015. 査読有

(3) Kitagawa, T., *Picobiology Revealed by Vibrational Spectroscopy*. J. Spectroscopical Society of Japan, 63 (#2), 49-61 (2014). (in Japanese). 査読有

(4) Pal B., K. Tanaka, S. Takenaka, T. B. Shaik, and T. Kitagawa, *Structural characterization of Nitric Oxide-bound soluble guanylate cyclase using resonance Raman spectroscopy*. J. Por. Phthal. 17, 240-246, 2013. 査読有

(5) S. Nagatomo, M. Nagai, T. Ogura, and T. Kitagawa, *Near-UV Circular dichroism and UV resonance Raman spectra of tryptophan residues as a structural marker of proteins*. J. Phys. Chem. B 117, 9343-9353, 2013. 査読有

(6) El-Mashtoly, S. F., M. Kubo, Y. Gu. H. Sawai, S. Nakashima, 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*. J. Biol. Chem. 287, 19973-19984 2012. 査読有

(7) Nagai, M., S. Nagatomo, Y. Nagai, K. Ohkubo, K. Imai, and T. Kitagawa, *Near-UV circular dichroism and UV resonance Raman spectra of individual tryptophan residues in human hemoglobin and their changes upon the quaternary structure transition*. Biochemistry 51, 5932-5941, 2012. 査読有

[学会発表] (計 26+24+7=57 以下招待講演のみ。7 件)

(1) Takashi, Ogura, Infrared investigation of signal transduction between metal center and protein moiety, and its dynamical features. 分子研研究会「生物無機化学の最先端の今後の展望」, Jan. 6 - Jan. 7, Okazaki Conference Center, Okazaki, 2015. (愛知県岡崎市)

(2) Teizo Kitagawa, *Different roles of*

the Fe-His bonds of α and β subunits toward to quaternary structure change of human hemoglobin. Oxygen binding properties, resonance Raman, ^1H NMR and near-UV CD studies of cavity mutants. The Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Nov. 30 - Dec, 5, 2014, Gold Coast, Australia.

- (3) Takashi Ogura, Vibrational spectroscopic investigation of molecular mechanisms of aerobic respiration. Advances in Live Single-cell Thermo Imaging and manipulation Nov. 10-12, 2014, Okinawa Science and Technical University at Sea-side House. (沖縄県国頭郡恩納村)
- (4) S. Nagatomo, Y. Nagai, H. Aki, K. Sakurai, N. Maruyama, K. Imai, N. Mizusawa, T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai, Function and structure of mutant hemoglobins with proximal histidine replaced by glycine in either α or β subunit. 日本生物物理学会第 52 回年会, Sep 25 - 27, 2014, Sapporo Convention Center, (北海道札幌市)
- (5) Teizo Kitagawa, Resonance Raman investigation of heme of sGC caused by substrate, ligand, and effectors, 8-th Intl Conf. of Porphyrins and Phthalocyanines. June 22 - 27, 2014, Istanbul, Turkey.
- (6) T. Ogura, S. Nakashima, M. Kubo, S. Yamaguchi, S. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, and Y. Yanagisawa, Cooperative structural dynamics of proton pumping elements in cytochrome c oxidase as studied by innovative infrared spectroscopy. 8th Intl. Conf. on Porphyrin and Phthalocyanines, June 22 - 27, 2014, Istanbul, Turkey.
- (7) S. Yanagisawa, M. Hara, K. E. Kayama, H. Sugimoto, Y. Shiro, and T. Ogura, Visible and UV resonance Raman study on indoleamine 2,3-dioxygenase, 8-th Intl Conf. of Porphyrins and Phthalocyanines, Jun, 22, - 27, 2014, Istanbul, Turkey.

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川禎三 (KITAGAWA, Teizo)
兵庫県立大学 生命理学研究科 特任教授
研究者番号: 40029955

(2) 研究分担者

小倉尚志 (OGURA, Takashi)
兵庫県立大学 生命理学研究科 教授
研究者番号: 70183770

長友重紀 (NAGATOMO, Shigenori)

筑波大学 数理物質科学研究科 講師
研究者番号: 80373190

(3) 連携研究者

()

研究者番号: