

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510224
 研究課題名（和文）ドメイン間相互作用に元づいた可溶性グアニル酸シクラーゼのシグナル識別機構の解析
 研究課題名（英文）Signal discrimination analyses based on the domain structure of soluble guanylate cyclase
 研究代表者
 牧野 龍（MAKINO RYU）
 立教大学・理学部・教授
 研究者番号：40101026

研究成果の概要（和文）：本酵素の一酸化炭素複合体の解析から、ヘム鉄に外来配位子が結合すると真性ヌクレオチド部位と擬ヌクレオチド部位は相互に作用し、それが YC-1 等のアロステリック活性化剤の結合に重要であることが示された。また、これまで未検出であった酸素化型酵素を凍結状態で安定に補足することに成功し、その結合は擬ヌクレオチド部位への YC-1 の結合により制御されることを明らかにした。その酸素親和性は異常に低く、その原因は速度論的には酸素解離速度の速さによること、構造的にはヘム面からのヘム鉄の大きな変位によることが示唆された

研究成果の概要（英文）：We have revealed that there were two kinds of nucleotide binding sites, a catalytic and a pseudo-nucleotide sites in soluble guanylate cyclase. When carbon monoxide combined to the enzymic heme, the binding of YC-1 to the pseudo-nucleotide binding site increased the affinity of a nucleotide for the pseudo nucleotide binding site, through interaction between two binding sites. Furthermore, we have first confirmed the formation of the oxygenated form of the enzyme, which was stable under frozen conditions. The formation of the oxygenated form was noted to be regulated by YC-1 binding, and also was suggested to be governed by the deformation of the heme iron from the heme plane, based on the EXAFS analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構

1. 研究開始当初の背景

ヘム鉄をガス状分子のセンサー部位とするヘム酵素、グアニル酸シクラーゼは、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロニ量体酵素であり、それぞれの鎖は N

と C 末端ドメインから構成されている。ヘムは α 鎖の N 末端ドメインにのみ 1 分子結合しており、ガス状シグナル分子である一酸化窒素 (NO) が結合すると環状 GMP (cGMP) の産生活性が著しく増

加する。したがって、本酵素の活性化にはドメイン間の相互作用が必須であるにもかかわらず、その詳細は不明のまま残されていた。

2. 研究の目的

(1) グアニル酸シクラーゼの強力な阻害剤として知られている 2'-deoxy-3'-GMP (以下 2'-d-3'-GMP) の結合部位の同定、ならびにその親和性を指標にしてドメイン間の相互作用を解析し、外来性のヘム鉄配子の結合に及ぼすヌクレオチド結合ドメインの役割を理解することを目的にした。

(2) 後述するように、本酵素は多量の酸素が存在するにもかかわらず微量の一酸化窒素 (NO) を選択的に感知する。この識別機構を分子論的に理解することを目的とする。具体的には、本酵素の酸素化型の生成機構を解析するとともに、その配位構造を X線微細構造解析法 (EXAFS) により決定し、他の高スピン型ヘムタンパク質には見られない本酵素の特異な性質を抽出し、識別機構を構造を基盤に理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 2'-d-3'-GMP の結合部位の同定・親和性の測定

2'-d-3'-GMP の最大結合数と親和性を透析平衡法により決定し、その結果に基づきドメイン間相互作用の有無を解析した。さらに、これらの結果を、ヘムに結合した一酸化炭素 (CO) の赤外伸縮振動の測定から補完した。

(2) 酸素化型酵素の検出・同定

酸素化型酵素は、凍結状態で検出・構造解析を行った。この目的のため、液体窒素温度で吸収スペクトルが測定可能なクライオスタットを自作した。なお、EXAFS による解析は、理研播磨研究所・城主任研究員、横浜市大・朴准教授との共同研究である。

4. 研究成果

cGMP の産生を担う触媒部位は、 α 鎖と β 鎖の C 末端ドメイン同士の会合により形成されているものと考えられている (図 1)。これまでの研究から、真のヌクレオチド部位 (触媒部位、GTP 結合部位) と擬ヌクレオチド部位の 2 種類の存在が示唆されていたが、擬ヌクレオチド部位の役割は不明であった。我々は、擬ヌクレオチド部位にはヌクレオチドのみならず本酵素の活性化剤として作用する YC-1 等の化合物も結合することを見出し、その部位の機能は、活性調節部位であることを明らかにしてきた (図 2)。

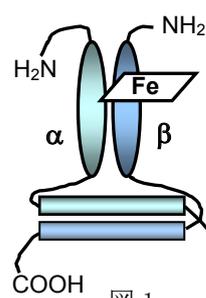


図 1

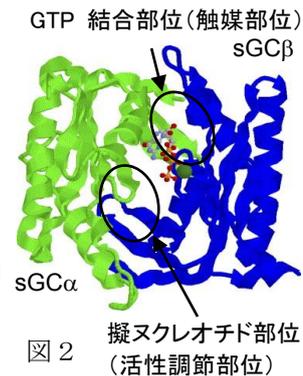


図 2

(1) 2'-d-3'-GMP の結合部位の同定とヘム鉄配子の効果

2'-d-3'-GMP は GTP 等の他のヌクレオチドと異なり、還元型酵素には有意な結合を示さない。また、活性化剤である、YC-1 を加えても、その結合量はほとんど増加しない。しかし、下図に示すようにヘム鉄に一酸化炭素 (CO) が結合すると、Ca あるいは Mn 存在下では著しく結合量が增大する (図 3)。このような条件下では、2'-d-3'-GMP が酵素当り 1 分子結合する (解離定数 75 μ M)。

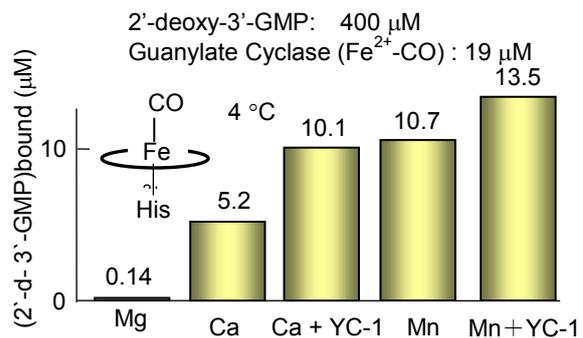


図 3. 還元型酵素に対する 2'-d-3'-GMP の結合

2'-d-3'-GMP の結合は、YC-1 により阻害されないが、触媒部位にのみ結合する AMP-PNP により著しい阻害をうけるので、2'-d-3'-GMP は触媒部位に結合するものと結論された。この結果は、ヘム鉄に CO が結合すると、 β 鎖の N 末端ドメイン (ヘム結合ドメイン) と C 末端ドメイン (ヌクレオチド結合ドメイン) の間に相互作用が存在することを明確に示したはじめての実験結果である。

真と擬ヌクレオチド部位間に相互作用が存在するの否かを検討するために、YC-1 の結合に及ぼす 2'-d-3'-GMP の結合効果を測定した。図 4 に示すように、2'-d-3'-GMP が存在すると、YC-1 の親和性が 3 倍程度増加しているのが分かる。このように、真性ヌクレオチド部位と擬部位に対するリガンド結合は独立ではなく、両部位間に相互作用が存在することを明瞭に示めすことができた。測定温度を 15 $^{\circ}$ C に下げると 2'-d-3'-GMP の親和性

は上昇するが、予想外なことに YC-1 の親和性は逆に減少した。

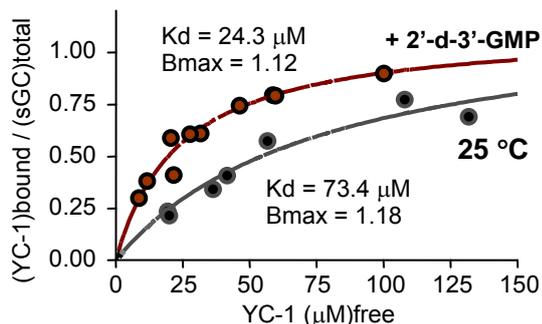


図 4. 2'-d-3'-GMP 存在下と非存在下における YC-1 結合当量 (Bmax) とその解離定数 (Kd)

2'-d-3'-GMP による YC-1 の親和性の増加は、ヘム鉄に結合した CO の伸縮振動 (ν_{C-O}) の測定からも明瞭に裏づけられた (図 5)。図に示した 1987cm^{-1} の吸収帯はヘム鉄に結合した CO の伸縮振動に帰属されること、一方、 1972cm^{-1} の吸収帯は YC-1 結合型 CO 複合体のそれに帰属される ν_{C-O} であることは、すでに我々は明らかにしている。図 5 に示すように 1972cm^{-1} の吸収帯は、温度が上昇するとその強度が増すが、それは上述した YC-1 の親和性の上昇で説明できる。

2'-d-3'-GMP 存在下では非存在下のそれに較べて 1972cm^{-1} 吸収帯の強度は強くなり、これは YC-1 の親和性の増加によるものである。したがって、この結果は透析平衡法の結果 (図 4) を裏付けるものであり、CO 結合型酵素に 2'-d-3'-GMP が結合すると、YC-1 の親和性が上昇するのが分光学的方法でも確認された。

以上の結果から、YC-1 存在下においてヘムに CO 等の配位子が結合すると β 鎖の N 末端ドメイン (ヘム結合ドメイン) は触媒部位と相互作用して触媒部位への 2'-d-3'-GMP の親和性を増加させること、が明らかになった。しかし、図 5 の赤外スペクトルに見られるように、2'-d-3'-GMP の結合による新しい吸収帯の出現が見出されないため、触媒部位への 2'-d-3'-GMP の結合は CO の配位構造に大きな影響を与えるものではない。

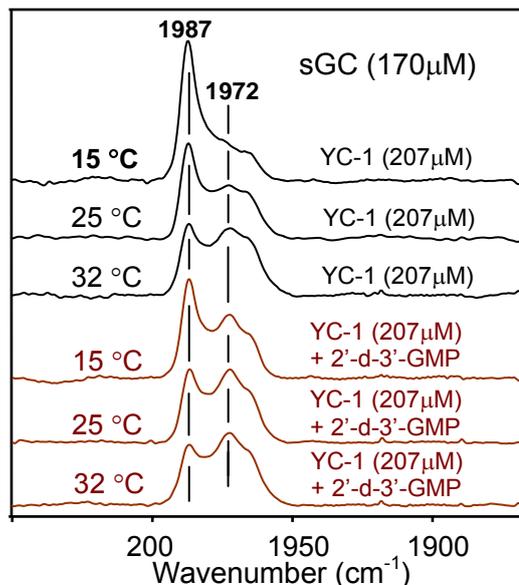


図 5. YC-1 が結合した CO 型酵素の C-O 伸縮振動におよぼす 2'-d-3'-GMP の効果

(2) 酸素化型酵素の検出

本酵素のヘム鉄は、還元型高スピン状態であり、したがってヘモグロビンと同様に酸素が結合し易いと考えられたが、本酵素の還元型が安定に存在するにもかかわらず、予想外なことにその酸素結合型は見出されていない。このように、本酵素は生体内の酸素が存在する条件下においても NO のみを選択的に感知して、生体内における NO シグナル伝達を可能にしている。これまで本酵素のセンサー部位であるヘム鉄には酸素が結合しない

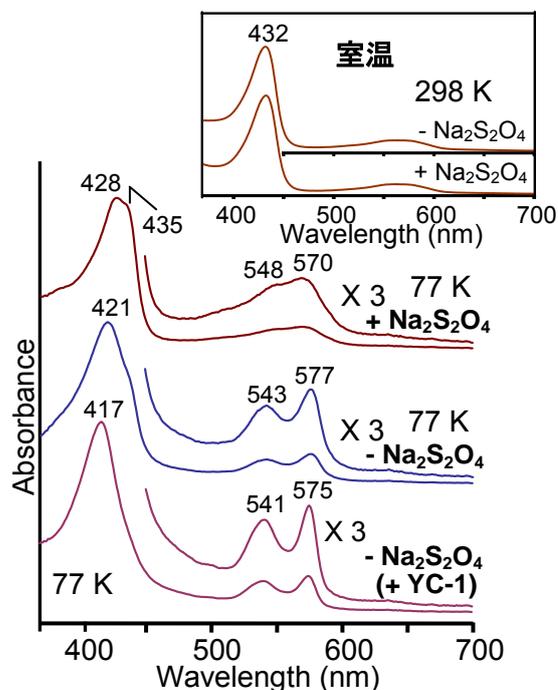


図 6. 酸素存在下ならびに非存在下における還元型酵素の低温吸収スペクトル (挿入図は室温での吸収スペクトル)

ものと考えられてきたが、低温条件において酸素が結合した酸素化型が生じることをはじめて見出した。

図 6 の挿入図に示すように、室温 (298K) では酸素存在下 (-Na₂S₂O₄)、酸素非存在下 (+Na₂S₂O₄) の両条件においてスペクトルには変化が見られない。しかし、液体窒素温度 (77K) では、酸素存在下 (-Na₂S₂O₄) において、可視領域に二つのピーク (543、577nm) があらわれた。このようなスペクトル変化は酸素存在下でのみ見出されることから、ヘム鉄に酸素が結合したことを示唆する。これらのピークとソーレー帯は、YC-1 添加により尖鋭化し、加えて低波長シフトすることから、YC-1 は CO 複合体の場合と同様に、擬ヌクレオチド部位に結合して酸素に対する親和性を増加させるものと考えられる。

上記の結果は酸素配位の直接的な証拠を示す結果ではないので、鉄をコバルトで置き換えた酵素 (Co-porphyrin 置換酵素) を調製し、電子スピン共鳴スペクトル (ESR) による酸素配位の実証を試みた。Co 置換酵素でも、ヘムの場合と同様に、酸素非存在下では室温と 77K でそれらのスペクトルには変化が見られないが、酸素が存在すると 77K で Co-porphyrin 置換ヘモグロビンの酸素化型に類似した吸収帯が現れた。この複合体の ESR スペクトルを測定したところ、 $g = 2.35$ と $g = 2$ にシグナルが得られた。前者は Co²⁺ のシグナルに帰属される分子種である (図 7A)。後者を詳細に解析すると、 $g = 2.08$ のラジカル様のシグナルは核スピンの由来する微細構造酸素を示すことから、 $g = 2.08$ のシグナルは結合酸素 (O₂) に帰属

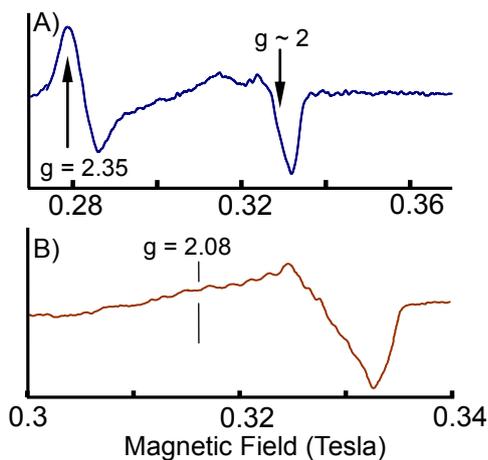


図 7. 酸素存在下における Co-porphyrin 置換酵素の ESR スペクトル

される (図 7B)。以上の結果は、還元型グアニル酸シクラーゼを酸素存在下で凍結すると、凍結過程でヘム鉄に酸素が結合して酸素化型が生じるこ

とを明確に示している。

酸素化型が酵素活性を持つのか否かという疑問に答えるためには、溶液状態における酸素化型の検出が必須である。不凍液 (10% ethylene glycol) を含む低温あるいはサブゼロ溶液状態で、酸素の有無により吸収スペクトルはわずかに変化するが、その変化量はおおよそ数%である。このような事情から図 8 のスペクトルは差スペクトル (酸素存在下-酸素非存在下) として表してある。+3°C ならびに -7°C のどちらの条件においても、酸素の有無によりわずかな変化が検出され (図 8 A)、この変化は酸素有無の条件下における 77K での低温差スペクトル (図 8 B) の極大ならびに極小値ともにほぼ一致することから、低温では溶液状態においても酸素化型が生成するものと結論された。

ストップフロー装置により酸素の結合速度の測定を試みたが、酸素親和性が低いため高濃度の酸素存在下で測定せねばならず、有意な結果は得られなかった。これは酸素結合速度が遅い事によるのではなく、十分速く装置の dead time 内に反応が終了することによるものと考えられる。したがって、本酵素の酸素親和性が極めて低いのは、酸素化型からの酸素の解離速度が非常に速いことによるものと解釈された。

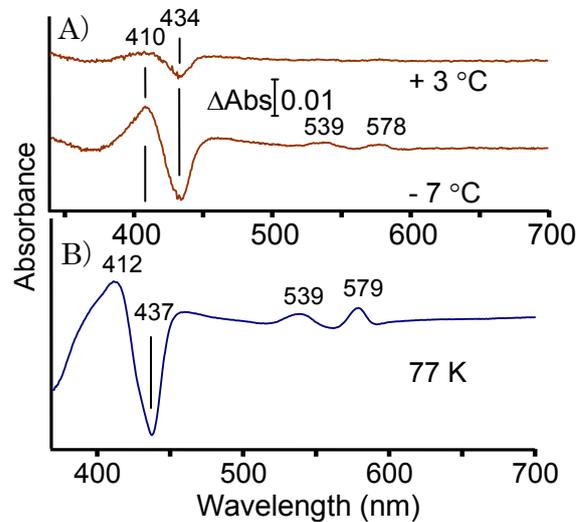


図 8. 酸素有無の条件下におけるスペクトル変化。A 図は溶液条件下における差スペクトル、B 図は凍結条件下における差スペクトル

酵素活性を +3°C ならびに -7°C の両方において酸素有無の条件下で測定したところ、両者の活性には大きな差は見出せなかった。したがって、酸素化型は、一酸化窒素 (NO) 型のような高い活性をもつ分子種ではないものと考えられる。

(3) 酸素化型酵素の構造解析

何故、本酵素の酸素に対する親和性が異常に低いのか、その構造的要因を探るため EXAFS により酸素化型等の配位構造を解析した。

EXAFS による配位構造 (結合距離) をミオグロビンの結果と比較して図 9 にまとめた。上記のように酸素化型と同定された分子種には、予想どおり外来配位子の結合が確認された。構造的には還元型や他の複合体の配位構造は、ミオグロビンのそれらと本質的には大きな相違は見られないが、ヘム面からの鉄の変位 (Fe-Ct) は還元型において本酵素の方がミオグロビンのそれらより大きい傾向を示す。したがって、酸素等の外来性配位子がヘム面に対して反対方向から結合する場合、すでに他のヘムタンパク質で明らかにされているように、外来配位子はヘム鉄と反応しにくいものと予想される。また、形成された複合体においても、本酵素のヘム鉄はミオグロビンと異なりヘム面内に収まっていない。したがって、Fe-Ct 差が、本酵素の CO ならびに酸素に対する親和性が低い原因のひとつと推定された。

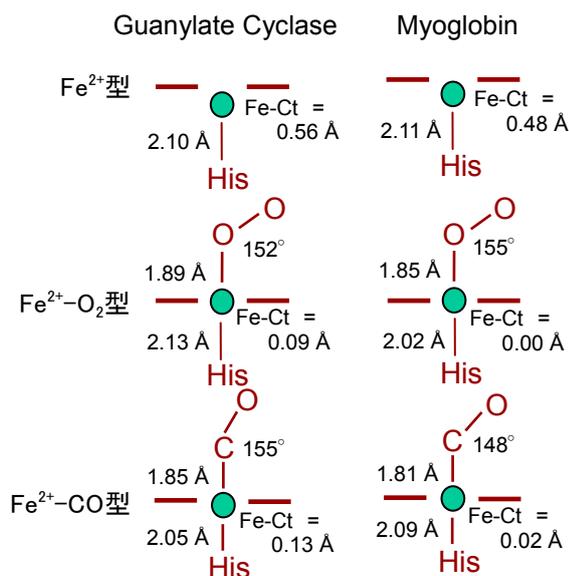


図 9. EXAFS によるヘムの配位構造の解析

Fe-Ct はヘム面と鉄の中心の間の距離。

His は近位ヒスチジン残基

本酵素は、分子量が大きく不安定であり、また組織含量も極めて低いため、ここで述べた高濃度の多量の試料を必要とする測定は我々以外の研究室では不可能であった。これまでは精製に home made のアフィニティー樹脂を使用してきたが、幸運にも昨年になり高分離能で高回収率な本酵素の精製に最適な市販のアフィニティー樹脂を見つけた。今後、この方法で精製した酵素を用

い、結晶化に取り組む予定である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

第 7 回日本蛋白質科学会 ワークショップ・小分子によるシグナル伝達

「可溶性グアニル酸シクラーゼにおけるヌクレオチド結合部位の役割」、牧野 龍、矢澤 真介、堀 洋、2007 年 5 月 26 日、仙台国際センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 龍 (MAKINO RYU)
立教大学・理学部・生命理学科・教授
研究者番号：40101026

(2) 研究協力者

なし

(3) 連携研究者

城 宜嗣 (SHIRO YOSHITUGU)
独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・主任研究員
研究者番号：70183051

朴三用 (PAKU SANYOU)
横浜市立大学・国際総合科学研究所・准教授
研究者番号：20291932