

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号： 24506

研究種目： 基盤研究（B）

研究期間： 2009～2011

課題番号： 21350098

研究課題名（和文） ヘム蛋白質のアロステリック効果における情報伝達の構造化学

研究課題名（英文） Structural Chemistry on Information Transduction through Allosteric Effects in Heme Proteins

研究代表者

北川 禎三（KITAGAWA TEIZO）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号： 40029955

研究成果の概要（和文）：アロステリック効果の構造化学を可視及び紫外共鳴ラマン分光法を用いて具体的に記述した。基本分子のヘモグロビンについてはリガンド結合中間体の四次構造を定量的に評価する方法を提案した。応用として酸素センサー蛋白の DOS と HemAT の情報伝達の道筋とダイナミクスを解明した。NO センサーの sGC については effector 結合の構造効果を論じた。呼吸酵素のシトクロム酸化酵素についてはプロトンポンプ機構を調べた。

研究成果の概要（英文）：Structural chemistry involved in allosteric effects of heme proteins was investigated with visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy. About hemoglobin as a fundamental molecule, a quaternary structure of half-ligated state was quantitatively determined on the basis of inter-subunit interactions. As applications, information transduction pathway and its dynamics were elucidated with two oxygen sensor proteins, DOS and HemAT, and structural effects of effector binding was revealed for an NO sensor protein, sGC. For respiration enzyme, proton pumping mechanism of a mammalian cytochrome c oxidase was examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学、生態関連化学

キーワード： 生物無機化学、振動分光学、アロステリック効果、ガスセンサー蛋白、ヘモグロビン、情報伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞中では化学反応速度の制御は温度一定の条件下で行われ、蛋白質はアロステリック効果を使ってそれを実現している。アロステリック効果は、教科書的には「蛋白質の活性点以外のところに小分子が結合する事によって活性点の反応性を変える効果」と記され

ているが、分子科学的には未解明である。最近医学の世界では、ストレスにより小分子が生成され、それが情報伝達分として働いてレセプターに結合し、生理作用を引き起こす場合のある事が指摘されている。

一方、研究代表者は金属蛋白質の構造と機能の相関や小分子との相互作用を詳しく調

べてきた。その中にはアロステリック効果で機能制御をしている蛋白が含まれていた。ピコメーターオーダーの構造変化を検出する共鳴ラマン分光法の装置を岡崎の分子科学研究所にそえ、定年退職後は兵庫県立大学のピコバイオロジー研究所に移管して、分担者が管理運転していた。その装置群を駆使し、上記の問題に挑戦する事が、国際的優位性を維持する最も良い方法であると考え、本研究を申請した。

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質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ために、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。これらの蛋白質それぞれは、 O_2 、 CO 、或は NO 等の 2 原子分子を特異的に検出し、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らしい。これらの蛋白質は分子量が大きくて、NMR の手法が使えないため、振動分光法を適用する好材料と考えた。そこで、各蛋白質を単離精製する生化学者と共同研究を企画し、その共鳴ラマンの実験を進めることにした。

2. 研究の目的

アロステリック効果を、具体的に構造化学として明らかにする事が本研究の目的である。アロステリック効果の起こる道筋や速度を、実験的に解明する事が当面の目標である。材料としては、アロステリック効果が最も顕著で色々な方法で調べられているヘモグロビンを基本分子として取り上げる。応用として、最近見つかっているガスセンサー蛋白質群と呼吸酵素を取り上げる。小分子の結合脱離をトリガーとする蛋白構造の変化の道筋やダイナミクス、すなわち分子内情報伝達機構を、可視光および紫外光を光源とする静的および動的共鳴ラマン散乱法で解明し、構造変化の実態を明らかにする。特に注目する点は、1) 蛋白質は大きさの似た 2 原子分子をどのようにして識別し、ターゲット分子が結合した時しかシグナルを送らないようにしているのか?、2) どのようなコンフォメーション変化がシグナル伝達に使われているのか?、3) そのダイナミクスは?、を明らかにする事である。

3. 研究の方法

手法として用いる共鳴ラマン分光は、ラマン散乱励起光の波長を分子のクロモフォアの吸収極大に近づける事によって、そのクロモ

フォアの分子振動を選択的に観測するものである。スペクトル強度増大を伴うためにもメリットがある。振動スペクトルはピコメーターオーダーの構造変化をも鋭敏に反映する。ヘムの吸収は可視領域に有り、蛋白の芳香族アミノ酸の吸収は紫外領域にある。可視光レーザーを光源にする事によりヘムの分子振動が観測できるので、小分子の結合によるヘムの構造変化を検出する。紫外光をラマン励起光源とする事により、芳香族アミノ酸の側鎖の分子振動を検出する。この場合は、遺伝子工学の手法を使い、特定の芳香族アミノ酸を非芳香族アミノ酸に部位特異的に置換して機能を失わないものを見つける。そして、置換してないもののスペクトルから置換したもののスペクトルを引き算する、差スペクトル法を導入する事により、その特定のアミノ酸のスペクトル寄与を抽出する事が出来る。この方法を用いて、めばしいアミノ酸残基を順次置換し、全体スペクトルへの寄与や、小分子の脱着によるスペクトル変化を明らかにしていく事により、情報伝達の道筋を決定する。 CO をリガンドとして結合させておき、 CO をパルスレーザーで光解離させた後の変化を、もう一つのレーザーを用いて時間分割法で測定する事により、ダイナミクスを明らかにする。

4. 研究成果

1) Hb のリガンド結合による四次構造変化の定量化; Hb はアロステリック効果を示す典型的な分子としてよく調べられている。これ迄にMWCモデルとKNFモデルが提案されているが、X線結晶解析ではいずれが正しいか決められない。両モデルの違いは 2 個リガンドの結合した中間状態ではっきり見えるはずである。正常なHbでは協同効果のために、その中間状態を純粋には得られない。そこで本研究では、金属ハイブリッド、原子価ハイブリッド、リガンドハイブリッドHbを用いて、2 個リガンドの結合した安定状態を作り出し、その紫外共鳴ラマンスペクトルを測定して、トリプトファンとチロシン残基のサブユニット間相互作用の様子を、各残基毎に決め、相互作用しているものとしていないもののスペクトル強度の比から、各残基に対して四次構造を定量的に評価する方法を見つけ、それをJ. Am. Chem. Soc. に発表した。ヘムポケットにおける歪みの大きさを、鉄—ヒスチジン伸縮振動で評価し、サブユニット相互作用の状態とヘムポケットの歪みとの相関を調べた。本研究から、トリプトファンとチロシンの変化は必ずしも同期しないこと、及び α サブユニットと β サブユニットとで歪みの大きさが大きく異なることを明らかにし、MWCモデルもKNF

モデルもその点の改善が必要である事を指摘した。

2) O_2 センサー蛋白, DOS-*Ec*, の構造ダイナミクス; 大腸菌のDOS蛋白質(Direct Oxygen Sensor)の時間分解紫外共鳴ラマン散乱を測定し、部位特異的アミノ酸置換で特定アミノ酸残基を置換して、差スペクトル法により、元のアミノ酸残基のスペクトルを抽出した。 O_2 , CO, NOを結合させた時の各残基のスペクトル変化より、シグナル伝達の経路を決め、時間分解スペクトルでそのダイナミクスを明らかにした。COの解離により0.5ナノ秒以内の速い変化の後、ナノ秒の変化がTrp53に見られ、マイクロ秒領域でTrpとTyrのラマンバンド強度が変化した。この研究から、ヘムのリガンド脱着がヘム側鎖の構造変化を通じて蛋白構造を変える事が明らかになった。

3) O_2 センサー蛋白, HemATの構造ダイナミクス; HemATはグロビンフォールドを持つ蛋白として、青野らにより遺伝子解析から見つけられた蛋白で、その生物を O_2 に向かって遊泳させるためのセンサーとして機能している。COもNOもヘム鉄には結合するが生理活性は生み出さない。その野生型と変異体蛋白の紫外共鳴ラマンスペクトルから、シグナル伝達の道筋を決めた。また、その時間分解スペクトルから、2つの反応中間体が含まれ、ヘムからリガンドの解離がBヘリックスとGヘリックスを移動させてシグナルを作用部位に送る事を明らかにした。

4) NOセンサー蛋白, sGCの共鳴ラマンスペクトル; 可溶性グアニレートシクラーゼ(sGC)は、生理的にはNOセンサーであり、 $\alpha\beta$ ダイマーより成る。NOの結合によりシクラーゼ活性が数百倍高くなる、COもヘムに結合するが、活性はあまり変わらない。しかし、エフェクター分子が存在すると、CO結合がNO結合と同じ程度に活性を変える事が報告され、その共鳴ラマンスペクトルを詳しく調べてきた。エフェクターとしてYC-1という分子を用いた場合、ドッキングシミュレーション法で計算すると、それが α サブユニットのキャビティに結合すると結論された。YC-1の結合により、 β サブユニットのCO結合形ヘムが2種類(5配位と6配位)できる事がわかり、その存在比が推定されたが、そのメカニズムはの解明が、今後の問題として残された。

5) 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: ヘムオキシゲナーゼはヘムの α 位を特異的に開裂する酵素であるが、藤井らが作った部位特異的アミノ酸置換体では、ヘムが垂線の周りに90度回転して挿入され、 δ 位開裂特異性を示す事が示された。90度回転する

とヘム側鎖のビニル基やプロピオン酸基と蛋白との相互作用が変わるので、ラマンスペクトルが影響されるはずである。そこで、ビニル重水素化ヘム、プロピオン酸重水素化ヘムを合成し、それをヘムオキシゲナーゼ蛋白の野生型と変異体に再構成し、それら側鎖のラマンバンドを含め、他のバンドがどのように変化するかを調べた。重視素化ラベルで、それらが主に寄与するラマンバンドが実験的に明らかになり、変異体蛋白に挿入した時のスペクトルは観測できた。まだ解析は終わっていないが、重視素化ラベルヘムを挿入したヘムオキシゲナーゼのNMRスペクトルを藤井が測定する予定で、ラマンの結果と合わせてまとめる予定である。

6) チトクロム酸化酵素によるプロトンポンプ機構の解明; ウシ心臓のチトクロム酸化酵素について、一酸化炭素(CO)結合型のCO光解離後の蛋白質構造ダイナミクスを時間分解可視共鳴ラマン分光法により調べた。2つのヘムの協動的動きと酸素還元部位の中間的コンフォメーションの存在を明らかにした。

7) インドールアミンジオキシゲナーゼにおけるCO結合型ヘムとトリプトファンとの相互作用; 基質であるトリプトファンが、L-TrpとD-Trpの場合で反応性が異なる事がわかっている、その共鳴ラマンスペクトルにおける違いを、COの振動モード($\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{Fe-CO})$, $\delta(\text{FeCO})$)をプローブとして詳しく調べた。その結果をもとに O_2 添加反応における基質の立体異性体に依存する反応性の違いの起源を考察した。

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12件)

1. Uchida, T., H. Mizuki, M. Ishida, I. Sagami, T. Shimizu, K. Ishimori, and T. Kitagawa, *Effects of the bHLH domain on axial coordination of heme in the PAS-A domain of neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2): Conversion from His119/Cys170 coordination to His119/His171 coordination*. J. Inorg. Biochem. **108**, 188-195, (2012).
2. El-Mashtoly, S. F., M. Kubo, S. Nakashima, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *Structural Dynamics of EcDOS Heme Domain Revealed by Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy*. J. Phys. Chem. Lett., **2** (17), pp 2212-2217, (2011).
3. Nagatomo, S., M. Nagai, and T. Kitagawa, *A new way for understanding quaternary*

- structure change of hemoglobin upon ligand binding on the basis of UV-resonance Raman evaluation of inter-subunit interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10101-10110, (2011).
4. Pal, B. and T. Kitagawa, *Differences between two active forms of CO-bound soluble guanylate cyclase in the presence of activators and substrate and their populations revealed by resonance Raman spectroscopy*. *Ind. J. Chem.* **50A**, p.395-400. (2011).
 5. Li, J. and T. Kitagawa, *Applications of Vibrational Spectroscopy in the Study of Flavin-based Photoactive Proteins*, in *Spectroscopy: Biomedical Applications* 25 261-269 (2011).
 6. Pal, B., K. Tanaka, S. Takenaka, and T. Kitagawa, *Resonance Raman spectroscopic investigation of structural changes of CO-heme in soluble guanylate cyclase generated by effectors and substrate*. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 1178-1184, (2010).
 7. Pal, B. and T. Kitagawa, *Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase; A new perspective to the mechanism of activation*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, p.375-379, (2010).
 8. Aki, Y., M. Nagai, Y. Nagai, K. Imai, M. Aki, A. Sato, M. Kubo, S. Nagatomo, and T. Kitagawa, *Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobins M probed by resonance Raman spectroscopy*, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, p.147-158, (2010).
 9. Hiramatsu, M., M. Lu, Y. Goto, and T. Kitagawa, *The β -sheet structure pH dependence of the core fragments of β_2 -microglobulin amyloid fibrils*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83**, p.495-504, (2010).
 10. Hiramatsu, M., M. Lu, K. Matsuo, K. Gekko, Y. Goto, and T. Kitagawa, *Differences in the molecular structure of β_2 -microglobulin between two morphologically different amyloid fibrils*. *Biochemistry* **49**, p.742-751, (2010)
 11. I. Ishigami, T. Nishigaki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, S. Nakashima and T. Ogura, *An intermediate conformational state during ligand binding to cytochrome c oxidase detected by time-resolved resonance Raman analyses of heme peripheral groups*, *Chem. Lett.*, **2**, 178-180 (2012).
 12. S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro and T. Ogura, *A Specific Interaction of L-Tryptophan with CO of CO-Bound Indoleamine 2,3-Dioxygenase Identified by Resonance Raman Spectroscopy*, *Biochemistry*, **49**, 10081-10088 (2010).
- [学会発表](計7件(主なもの))
1. Kitagawa, T. Picobiological features in functions of heme proteins revealed by resonance Raman spectroscopy, 14th National Symposium in Chemistry (招待講演) February 5, 2012, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology.
 2. Kitagawa, T. Ultraviolet time-resolved resonance Raman investigation of structural dynamics of Hem-AT-*Bs* following CO photodissociation, 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (招待講演) August 11, 2011, University of British Columbia, Vancouver, Canada.
 3. T. Kitagawa, S. F. El-Mashtoly, S. Nakajima, H. Takahashi, A. Tanaka, and T. Shimizu, Structural Chemistry of Information Communication in Oxygen Sensor Protein, *EcDOS*, Revealed with Resonance Raman Spectroscopy, 6th Intl. Conf. on Porphyrin and Phthalocyanine, July, 2010, Hyatt Regency Tamaya Resort & Spa (U.S.A.).
 4. T. Kitagawa, S. Nagatomo and M. Nagai, Evaluation of Inter-subunit Interactions in Half-ligated Human Adult Hemoglobin based on the Single Residue UVR Spectra, 12th Intl. Conf. Raman Spectroscopy, August, 2010, Boston Park Plaza Hotel (U.S.A.)
 5. T. Ogura, S. Nakashima, I. Ishigami, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa, Protein Dynamics of Cytochrome c Oxidase as Studied by Resonance Raman Spectroscopy, Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (Invited Talk), November 6, 2009, Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India.
 6. T. Ogura, S. Yanagisawa, H. Sugimoto and Y. Shiro, Resonance Raman study on CO-bound indoleamine 2,3-dioxygenase, The 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (Invited Talk), June 1, 2011, Stockey Centre, Parry Sound, Ontario, Canada.
 7. T. Ogura, I. Ishigami, T. Nishigaki, S. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh and

Shinya Yoshikawa, Microsecond Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, The 3rd Asian Spectroscopy Conference (Invited Talk), November 29, 2011, Xiamen University, China.

研究者番号： 7 0 1 8 3 7 7 0

〔図書〕(計1件)

1. Nagatomo, S. M. Nagai, and T. Kitagawa, *Resonance Raman investigation of quaternary structure change in hemoglobin upon ligand binding, in 'Hemoglobin : Recent Development and Topics'* ed. M. Nagai) 2011, Research Signpost; Kerala, India. p.37-61.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.ac.jp/know/emeritus/kitagawa/index.html>

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 禎三 (KITAGAWA TEIZO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・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・大学院生命理学研究科・教授