

氏 名 稲垣 さや香

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 918 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Structure and Function of the CO-Sensing Transcriptional  
Activator CooA from Carboxydothemus hydrogenoformans

論文審査委員 主 査 教授 魚住 泰広  
教授 青野 重利  
助教授 小澤 岳昌  
助教授 藤井 浩  
教授 中村 聡（東京工業大学）

## 論文内容の要旨

### Structure and Function of the CO-sensing Transcriptional Activator CooA from *Carboxydothemus hydrogenoformans*

CooA is a transcriptional factor and regulates the expression of the genes responsible for the carbon monoxide (CO) metabolism. CooA is a homodimer and each subunit consists of the N-terminal sensor domain containing a heme and the C-terminal DNA binding domain. The heme is the active site for CO sensing. In the presence of CO under reducing condition, CO binds to the heme forming Fe(II)-CO (CO-bound state). The CO-bound CooA binds to the target DNA and promotes the expression of the *coo* operons. The previous studies carried out by using only CooA from *Rhodospirillum rubrum* (Rr-CooA) and revealed the unique properties of the heme coordination structure and a crystal structure of inactive, Fe(II) state. However, the relationship between the coordination structure of the heme and functions and the detailed mechanism of the CooA activation have not been elucidated, yet. To further understand of these problems, it is required to elucidate the essential factor of the coordination structure of the heme and determine of structures of the active form.

The purpose of this study is to elucidate the structure-function relationship of CooA. To accomplish this goal, she carried out the search and characterization of a new CooA homologue and determined a crystal structure of an exogenous ligand-bound form of CooA.

This thesis consists of four chapters. In Chapter 1, the general introduction is described, in which the background and the review of the previous studies in the related field are provided. And the purpose and the significance of this study are also described.

In Chapter 2, the spectroscopic and redox properties of a new CooA homologue from *Carboxydothemus hydrogenoformans* (Ch-CooA) were studied. The amino acid sequence of Ch-CooA, which was deduced from the DNA sequence, showed significantly identity (31%) and similarity (55%) to that of Rr-CooA. And Cys and His, which are proximal ligands of the Fe(III) and Fe(II) hemes (Cys75 and His77 in Rr-CooA), were conserved in Ch-CooA at corresponding positions (Cys80 and His82 in Ch-CooA). However, the distal ligand of the Fe(III) and Fe(II) hemes, Pro2 in Rr-CooA, was not conserved in Ch-CooA. Spectroscopic and mutagenesis studies revealed that the heme in Ch-CooA is six coordinate and low spin states in Fe(III), Fe(II), and Fe(II)-CO forms. His82 and the N-terminal  $\alpha$ -amino group were the axial ligands of the Fe(III) and Fe(II) hemes in Ch-CooA. The N-terminal  $\alpha$ -amino group was replaced by CO upon CO binding. Two neutral ligands, His82 and the N-terminal  $\alpha$ -amino group, are coordinated to the Fe(III) heme in Ch-CooA while two negatively charged ligands, a thiolate from Cys75 and the nitrogen atom of the N-terminal Pro, are the axial ligands of the Fe(III) heme in Rr-CooA. The difference in the coordination structure of the Fe(III) heme resulted in a large positive shift of the redox potentials of Ch-CooA compared with Rr-CooA. Comparing the properties of Ch-CooA and Rr-CooA demonstrates that the essential factors for CooA function will be: (i) the heme is six-coordinate in the Fe(III), Fe(II), and Fe(II)-CO forms; (ii) the N-terminus is coordinated to the ferric and ferrous hemes as an axial ligand, and (iii) CO replaces the N-terminus bound to the ferrous heme upon CO binding.

The crystal structure of imidazole (Im)-bound form of CooA from *Carboxydothemus*

*hydrogenoformans* (Im-bound Ch-CooA) was determined in Chapter 3. The structure of Im-bound Ch-CooA showed a two-fold symmetry and each subunit was the bent form unlike Fe(II) Rr-CooA. This crystal structure revealed that Im bound to the heme iron as a distal heme ligand in the same site as does CO. The dissociated N-terminus was located about 16Å away from the heme iron. The heme-bound Im had a hydrogen bonding interaction with the carbonyl oxygen of Met5. Overall topology of Im-bound Ch-CooA was almost the same as that of Fe(II) Rr-CooA, but there several differences between them. The relative orientation of the DNA-binding domain was different, as described above. And the orientation of the heme plane was also different between Im-bound Ch-CooA and Fe(II) Rr-CooA. The heme plane of Im-bound Ch-CooA was rotated by 30° and 180° about the normal of the heme plane at the heme center and about the meso  $\alpha$ - $\gamma$  axis, respectively.

Regardless of the binding of Im to the heme and the changing of the heme coordination structure, Im-bound Ch-CooA remained in the inactive form, in which the DNA recognition helices were buried inside of CooA. This result suggests the release of the N-terminus caused by the Im binding is not enough to induce the drastic conformation change of CooA for activation. The hydrogen bond between the heme-bound Im and Met5 would restrict the complete conformational change for activation. Such restriction is absent when CO is bound to the heme in Ch-CooA. Therefore, more drastic movement of the N-terminal region and/or of the heme may be induced by CO binding. For the CooA activation, the CO binding will trigger the significant movement of the heme, which will be essential for the transition to the active form, in which the HTH motif is exposed to the protein surface.

Finally, the summary of this work and the future prospects are presented in Chapter 4.

## 論文の審査結果の要旨

CooA は一酸化炭素 (CO) を生理的なエフェクターとする、これまでに例の無い新規な転写調節因子である。CooA 分子中には CO センサーの活性中心として機能するヘムが存在し、ヘムに CO が結合することにより CooA の転写調節因子としての活性が制御されている。すなわち、嫌気条件下で CO が存在する場合、CO が CooA 中のヘムに結合し、その結果 CooA は転写活性化因子としての活性を獲得する。これまで CooA に関する研究は、光合成細菌 *R. rubrum* 由来の CooA (Rr-CooA) を対象として行われ、Rr-CooA 中のヘムの配位構造、不活性型 (還元型)の結晶構造などが報告されている。しかしながら、ヘムの配位構造と CooA の機能発現との関係、CO による CooA 活性化の分子機構などについては、活性型 (CO 結合型) の構造が未解明であることもあり、不明な点が多く残されている。そこで本研究では、上記のような未解明な課題の解明も含め、CooA の構造機能相関を明らかにすることを目的とし、新規な CooA ホモログの探索を行い、その性質ならびに構造を詳細に検討するため、以下に述べるような研究を行っている。

本博士論文は、4章から構成されている。第1章では、本研究の背景を説明するとともに、関連する研究分野の研究成果を概説し、さらに本研究の目的と意義について述べている。第2章では、新規 CooA ホモログの探索を行い、好熱性一酸化炭素酸化細菌 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 中に新規な CooA ホモログ (Ch-CooA) が存在することを見い出した。さらに、Ch-CooA の発現系を構築するとともに、その精製系を確立した。共鳴ラマン分光法、核磁気共鳴分光法 (NMR)、紫外可視吸収分光法などの各種分光学的手法と、遺伝子工学的的手法による各種変異体調製を駆使することにより、得られた Ch-CooA の性質解明を行った。さらに Rr-CooA の研究結果と比較・検討することにより CooA に共通して保存されている性質を明らかにし、CooA の機能発現に必須の性質を明らかにしている。第3章では、Ch-CooA の結晶構造の解明を目的とし、各種結晶化条件の検討を行っている。各種結晶化条件の検討を行い、X線結晶構造解析に適した Ch-CooA 単結晶の結晶化条件を見い出した。ここでは、外部配位子であるイミダゾール (Im) がヘムに結合した Ch-CooA の結晶化、および構造決定に成功している。さらに、得られた構造をもとに、CooA の活性化機構についての考察を行っている。第4章では、本研究で得られた結果を総括するとともに、今後の研究の方向性についても述べている。

本論文の内容は権威ある国際的学術雑誌に一報の論文として既に掲載されており、語学力についても十分な水準に達していると判断した。これらのことから、審査委員会は全員一致で出願論文は博士 (理学) の授与に値するものと判定した。