

氏 名 佐 藤 亮

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第732号

学位授与の日付 平成15年9月30日

学位授与の要件 先導科学研究科 光科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Resonance Raman Studies on Static and
Dynamical Structures of Heme-based
sensor Protein, Dos

論 文 審 査 委 員 主 査 助 教 授 高 木 紀 明
教 授 青 野 重 利
教 授 北 川 禎 三
助 教 授 猿 倉 信 彦

博士論文の要旨：

センサーヘムタンパク質は、タンパク質中に存在するヘムが生理機能上のエフェクター分子である酸素、一酸化窒素、一酸化炭素などの気体分子を検出するセンサーとして機能するヘムタンパク質の一群の総称である。これらのタンパク質における機能制御の機構は、気体分子がヘム鉄に結合、解離することによるヘムの構造変化がタンパク質高次構造の変化を誘起し、ヘム部位とは空間的に離れた作用ドメインにおける酵素活性が調節されるアロステリック効果によると考えられている。従って気体分子リガンドの結合、解離によるヘムとヘムの近傍のタンパク質部位の構造変化についての情報を得ることは、センサーヘムタンパク質の気体分子センシング機構を理解する上で重要である。

Dos は大腸菌に存在するタンパク質であり 807 個のアミノ酸残基から構成される。1-147 番目のアミノ酸残基から構成される N 末端領域のヘム含有ドメインのアミノ酸配列は根粒バクテリアの酸素センサーキナーゼである FixL のヘム含有センサードメインに類似する一方、C 末端領域はバクテリアのセルロース合成に関与するホスホジエステラーゼである AxPDEA1 に類似しており、Dos がセンサーヘムと作用ドメインであるホスホジエステラーゼが結合しているセンサーヘム酵素であることが強く示唆されている。本研究においては共鳴ラマン分光法の手法を用いて、Dos の単離したヘム結合センサードメイン (DosPAS) と作用ドメインを含む全長タンパク質 (Dos_{Full}) に対して、気体分子のヘムへの結合、解離に伴うヘムとその近傍部位の構造変化についての検討を行った。ヘムのコアサイズ及びスピン状態を反映するマーカーバンドを帰属し、それらの振動数から Dos におけるヘムの配位構造は外来の気体分子がヘムに配位した状態で 6 配位である一方、その非存在下においても 6 配位で配位飽和した構造であることが明らかにされた。従って気体分子がヘムに結合するのに伴いヘムの軸配位子の一方がヘムから他サイトへと移動する必要があることが分かった。このヘムの軸配位子の決定を目的として変異体の共鳴ラマンスペクトルを検討した結果、デオキシ状態では軸配位子は Met95 と His77 のアミノ酸残基であり、Met95 がヘムから解離している状態で外来の気体分子がヘム鉄に結合することが分かった。次にヘムに配位した気体分子リガンドに対して周囲のタンパク質部位がどのような構造的応答を示すのかを調べた。酸素結合型 Dos の共鳴ラマンスペクトルを測定し、酸素結合型のみ 560 cm⁻¹ 付近に現れるバンドを酸素の同位体シフトから鉄と酸素分子間の伸縮振動バンド、 $\nu[\text{Fe}-\text{O}_2]$ 、と帰属し振動数を 561 cm⁻¹ と決定した。酸素結合体の立体構造及び $\nu[\text{Fe}-\text{O}_2]$ の振動数が既知であるヘムタンパク質の構造との比較から、Dos において観測される低い鉄酸素間の伸縮振動数は、ヘム鉄に配位した酸素分子の内、鉄に隣接している酸素原子と近傍のアミノ酸残基との間で水素結合が形成されることで酸素分子が安定化されている構造を示唆していると考えられた。

Dos のホスホジエステラーゼ活性は、一酸化炭素 (CO) がヘムに結合することによりデオキシ状態のその 2 割程度迄低下することが知られている。また CO のヘム鉄からの解離後にデオキシ体が生成するので、CO 光解離により誘起されるタンパク質構造変化は酵素が活性阻害状態から活性化する過程の構造変化に相当していると考えられる。この過程におけるヘムの構造変化をピコ秒及びナノ秒のポンププローブ時間分解共鳴ラマン分光の手法を用いて観測した。過渡的に 5 配位ヘムが生成した後に Met95 がおよそ 100 μs でヘム

と再結合したが、解離した CO が Met95 と交換してヘムと再結合する時間は DosPAS に比して Dos_{Full} では遅くなっていることが明らかになった。この事実により作用ドメインの存在がヘム遠位側のタンパク質構造に影響を与え、Met95 がヘムに結合したデオキシ型構造をより安定化していることが考えられた。鉄とヒスチジン間の伸縮振動バンド、 $\nu_{\text{Fe-His}}$ は CO 光解離後に低波数シフトを示したが、シフトの大きさは 2 cm^{-1} 程度であり 20 ns 以内で完了した。この低波数シフトの大きさ及び緩和時間はヘモグロビンにおいて CO 光解離後に観測されるものとは大きく異なり、むしろミオグロビンに見られるそれと質的に類似している。したがって Dos における CO 光解離後の鉄とヒスチジン間の結合を介したヘム近位側のタンパク質構造の変化は小さく、これがセンサーヘムから作用ドメインへの気体分子センシング情報伝達において寄与する役割は小さいことを示唆していると考えられる。また $\nu_{\text{Fe-His}}$ の低波数シフトの後、500 ns 以内にヘムプロピオン酸の変角振動バンド、 $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\delta)$ 、の波数変化及び ν_8 バンドの強度増加が観測された。これらバンドはヘムペリフェラル基の構造、特にヘムプロピオン酸における水素結合構造を敏感に反映すると考えられている。Dos の詳細な立体構造は明らかではないが、FixL の構造に基づくと Dos においても端部にヘム軸配位子の Met95 を含む FG ループ領域とヘムプロピオン酸の間に水素結合が形成されていることが推定される。したがってこれらバンドの変化が観測されたことの解釈として、CO 光解離に伴うヘムの構造変化がヘムプロピオン酸基を介してタンパク質部位、とりわけ FG ループ領域の構造変化を引き起こしている可能性が考えられた。以上の実験事実を総合して、ヘムから作用部位への情報伝達経路において、ヘム遠位側のタンパク質構造が重要であることを指摘した。

論文審査結果の要旨

本論文は英文で書かれた3章から成るもので、第1章はヘム蛋白質全般やそれに対する共鳴ラマン分光法という手法の役割など、一般的な説明とセンサーヘム蛋白質という新しいタイプのヘム蛋白質に対する構造化学的な研究の位置づけが記述されている。第2章は本論文の主テーマである、Dos 蛋白 (Direct Oxygen Sensor) のヘムドメイン (#32~#138 残基) に関する結果、第3章は全長の蛋白とヘムドメインの比較や時間分解ラマン等の結果を含む、より深い研究展開の結果が記述されている。この内第2章の内容は、アメリカで発行されているこの分野のトップジャーナル (J. Biol. Chem.) に掲載済みである。

センサーヘム蛋白質とは、その一部にヘムをもち、ヘムが酸素、一酸化炭素、一酸化窒素などの気体分子を検出するセンサーとして働いて、別の箇所にある作用ドメインにそれを伝え、そこで各々特異な生理機能を実現する蛋白質群である。気体分子の脱着により、ヘムに構造変化が起こって、それがタンパクの高次構造変化を誘起し、作用ドメインでの反応性を変えるというシナリオの実質を構造化学的に検証し、具体化する事が本論文の大筋である。

Dos は大腸菌に見つけられた蛋白質であるが、そのアミノ酸配列は、N 末端側が根粒バクテリアの酸素センサーである FixL に類似し、C 末端側はセルロース代謝バクテリアのホスホジエステラーゼ部に類似する。まず N 末端側 130 残基を含むヘムドメインのみについてリガンドの脱着に伴う共鳴ラマンスペクトルの変化を調べ、経験則に基づいてそのスペクトル変化を解釈した。すなわち、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} の各状態で鉄が6配位構造をとり、鉄の軸配位子が何であるかを推定した。その残基に対する部位特異的アミノ酸置換の実験により、Met95 と His77 が軸配位子で、Met95 が二原子分子に置換される事を明らかにした。また、二原子分子と鉄との伸縮振動を同位体シフトの観測で帰属した。特に Fe-O_2 伸縮振動より、Dos に結合した O_2 分子が周囲のタンパク残基と強い水素結合をしている事を指摘して、Dos が O_2 を特異的に認識する方式を示した点は興味深い。同種の実験を全長の蛋白について行い、その結果を比較検討した。

Dos のホスホジエステラーゼ活性は、一酸化炭素によってかなり阻害される。すなわち、CO の脱着が本酵素の活性を制御しているので、CO の光解離による蛋白の構造変化をナノ秒とピコ秒のポンプ/プローブ時間分解共鳴ラマン分光法で調べた。CO の再結合は全長の蛋白の方が、ヘムドメインのものより遅かった。これは Met95 が Fe^{2+} に配位した構造が両者で違うためと結論した。一方、His77 側の Fe^{2+} -ヒスチジン伸縮振動数は、CO 光解離後から平衡状態まで 2 cm^{-1} しかシフトせず、しかも変化は 20 ns 以内に完了した。この事は、ヘモグロビンとは全く異なっており、アロステリック効果に Fe -ヒスチジン結合はあまり関与していないと結論した。

この様に、本研究は Dos 蛋白のリガンド脱着に伴う構造変化を共鳴ラマン法を用いて解明した先端的研究であり、その内容がわかりやすく記述されているということに、審査員全員の意見が一致し、合格と判定した。