

氏 名 吉村 英哲

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1023 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 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 The mechanism of oxygen sensing and signal  
transduction in the heme-based oxygen sensor protein  
HemAT from *Bacillus subtilis*

論文審査委員 主 査 教授 宇理須 恆雄  
教授 青野 重利  
助教授 小澤 岳昌  
助教授 藤井 浩  
教授 渡辺 芳人（名古屋大学）

### Chapter 1. General introduction

HemAT は細菌類の酸素に対する走化性を担う O<sub>2</sub> センサータンパク質の一つである。HemAT のセンサードメインはグロビン構造を取り、またシグナル伝達ドメインは細菌類の代表的な走化性レセプターである MCP と相同性を有する。HemAT は O<sub>2</sub> のみを選択的に認識し、構造変化を誘起することで走化性シグナルを発生していると考えられる。しかし HemAT がどのように O<sub>2</sub> と CO や NO のような他の生理活性を示す気体分子を識別しているか、また O<sub>2</sub> を感知した後どのようにしてシグナル伝達を行っているかという機構については十分解明されていない。本論文では枯草菌由来の HemAT (HemAT-Bs) について、選択的 O<sub>2</sub> 感知機構およびシグナル伝達機構の解明を目的として研究を行った。

第 1 章では関連する気体分子センサータンパク質に関するこれまでの研究を概観すると共に、これまで行われてきた HemAT-Bs についての研究を紹介し、O<sub>2</sub> 認識及びシグナル伝達の機構解明について残されている課題、またそれらを明らかにすることの意義について述べる。

### Chapter 2. Specific hydrogen-bonding networks responsible for selective O<sub>2</sub> sensing of HemAT-Bs

これまで行われた研究の結果、O<sub>2</sub> 結合型 HemAT-Bs ではへムに結合した O<sub>2</sub> に対して Thr95 が水素結合を形成することが明らかとなっている。しかし、この水素結合が HemAT-Bs による選択的な O<sub>2</sub> 認識に関与しているかどうかは十分解明されていない。第 2 章では、共鳴ラマン分光法を用いて HemAT-Bs による選択的 O<sub>2</sub> 認識機構について解明した研究結果を述べる。

CO 結合型および NO 結合型 HemAT-Bs の共鳴ラマンスペクトルを解析した結果、HemAT-Bs 中のへムに結合した CO と NO は周辺残基と水素結合を形成しないことがわかった。すなわち、HemAT-Bs は選択的 O<sub>2</sub> 感知のために、O<sub>2</sub> に対してのみ水素結合を形成するための特有の機構を有していると推定された。さらにこれらのスペクトルと O<sub>2</sub> 結合型のスペクトルとを比較し詳細に解析した結果、O<sub>2</sub> がへムに結合した場合のみでへムプロピオン酸と His86 の間に水素結合が形成されていることがわかった。さらに、H86A 変異体では野生型で存在する Thr95 とへムに結合した O<sub>2</sub> 間に直接の水素結合が存在しないことを見出した。これらの結果より、His86 とへムプロピオン酸間の水素結合は、Thr95 が O<sub>2</sub> と直接水素結合を形成するために必須であると結論づけた。

以上の結果から、以下のような HemAT-Bs の O<sub>2</sub> 選択的感知機構を提案した。HemAT-Bs のへムに O<sub>2</sub> が結合すると、へムプロピオン酸と His86 間に水素結合が形成され、へム遠位空間の構造変化を誘起する。この構造変化は Thr95 を O<sub>2</sub> に近づけ、Thr95 と O<sub>2</sub> 間の水素結合形成を促進する。一方 CO、NO 結合型ではへムプロピオン酸—His86 間の水素結合が形成されないためへム遠位空間の構造変化が誘起されず、Thr95 は CO や NO から遠い位置にとどまり、水素結合は形成されない。

### Chapter 3. Signal transduction pathway through the heme proximal pocket in HemAT-Bs

HemAT-Bs に対するこれまでの研究はへム遠位空間による O<sub>2</sub> 感知及びシグナル伝達に焦点が絞られていた。しかし、へム近位側経路でシグナル伝達を行うへムタンパク質も存在する。そこで第 3 章では HemAT-Bs のへム近位側を経由したシグナル伝達系路について検討した結果を述べる。

これまでに報告されている HemAT-Bs センサードメインの結晶構造によると、へム近位

側に存在する Tyr133 と近位ヒスチジンである His123 間の距離が、CN 結合型の方がデオキシ型と比較して小さくなっている。この結果は HemAT-Bs 中のヘムに配位子が結合することで、His123 と Tyr133 間に水素結合が形成される可能性を示唆している。このような反応が実際に起こっているかを確認するため、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、デオキシ型と CO 結合型を光解離させた直後の生成物のヘム近位構造の特徴を比較した。その結果、この水素結合は CO 結合型では存在するが、デオキシ型では存在しないことがわかった。Tyr133 は HemAT-Bs 中の G ヘリックスと呼ばれる部分に存在し、G ヘリックスと H ヘリックスは MCP に特有なヘリックスバンドル構造を構成している。従って、配位子が結合することにより生じる Tyr133 の動きは、このヘリックスバンドルに対して、他の MCP と同様の構造変化を誘起することでシグナル伝達に関与していると考えられる。また、今回 HemAT-Bs で見られた、配位子の有無によるヘム近位空間での水素結合形成を用いたシグナル伝達はこれまでに報告例が無く、ヘムタンパク質の構造変化伝達機構として新規なものである。

#### Chapter 4. Summary and general conclusion

第 4 章では本研究における結果を総括するとともに、今後の展望についても述べる。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は酸素センサータンパク質 HemAT による選択的な酸素センシングならびにシグナル伝達の分子機構解明を行ったもので、4章から構成されている。

第1章では、関連する気体分子センサータンパク質に関するこれまでの研究について概説し、本研究の背景を説明するとともに、本研究の目的を述べている。

第2章では、共鳴ラマン分光法を用いて HemAT-Bs による選択的 O<sub>2</sub> 認識機構について解明した研究結果を述べている。これまで行われた研究の結果、O<sub>2</sub> 結合型 HemAT-Bs ではヘムに結合した O<sub>2</sub> に対して Thr95 が水素結合を形成することが明らかとなっている。しかし、この水素結合が HemAT-Bs による選択的な O<sub>2</sub> 認識に関与しているかどうかは十分解明されていない。そこで本研究では、CO 結合型および NO 結合型 HemAT-Bs の共鳴ラマンスペクトルを解析し、選択的な O<sub>2</sub> 認識機構の解明を試みた。その結果、HemAT-Bs 中のヘムに結合した CO と NO は周辺残基と水素結合を形成しないことがわかった。すなわち、HemAT-Bs は選択的 O<sub>2</sub> 感知のために、O<sub>2</sub> に対してのみ水素結合を形成するための特有の機構を有していると推定された。さらにこれらのスペクトルと O<sub>2</sub> 結合型のスペクトルとを比較し詳細に解析した結果、O<sub>2</sub> がヘムに結合した場合のみでヘムプロピオン酸と His86 の間に水素結合が形成されていることを明らかにした。さらに、H86A 変異体では野生型で存在する Thr95 とヘムに結合した O<sub>2</sub> 間に直接の水素結合が存在しないことを見出した。これらの結果より、His86 とヘムプロピオン酸間の水素結合は、Thr95 が O<sub>2</sub> と直接水素結合を形成するために必須であると結論づけた。以上の結果から、以下のような HemAT-Bs の O<sub>2</sub> 選択的感知機構を提案した。HemAT-Bs のヘムに O<sub>2</sub> が結合すると、ヘムプロピオン酸と His86 間に水素結合が形成され、ヘム遠位空間の構造変化を誘起する。この構造変化は Thr95 を O<sub>2</sub> に近づけ、Thr95 と O<sub>2</sub> 間の水素結合形成を促進する。一方 CO、NO 結合型ではヘムプロピオン酸-His86 間の水素結合が形成されないためヘム遠位空間の構造変化が誘起されず、Thr95 は CO や NO から遠い位置にとどまり、水素結合は形成されない。この違いが選択的な O<sub>2</sub> 認識に重要な役割を果たしている結論した。

第3章では HemAT-Bs のヘム近位側を経由したシグナル伝達系路について検討した。これまでに報告されている HemAT-Bs センサードメインの結晶構造によると、ヘム近位側に存在する Tyr133 と近位ヒスチジンである His123 間の距離が、CN 結合型の方がデオキシ型と比較して小さくなっている。この結果は HemAT-Bs 中のヘムに配位子が結合することで、His123 と Tyr133 間に水素結合が形成される可能性を示唆している。このような反応が実際に起こっているかを確認するため、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、デオキシ型と CO 結合型を光解離させた直後の生成物のヘム近位構造の特徴を比較した。その結果、この水素結合は CO 結合型では存在するが、デオキシ型では存在しないことがわかった。Tyr133 は HemAT-Bs 中の G ヘリックスと呼ばれる部分に存在し、G ヘリックスと H ヘリックスは MCP に特有なヘリックスバンドル構造を構成している。従って、配位子が結合することにより生じる Tyr133 の動きは、このヘリックスバンドルに対して、他の MCP と同様の構造変化を誘起することでシグナル伝達に関与していると考えられる。

第4章では本研究で得られた結果を総括し、今後の展望についても述べている。

本論文で述べられている研究成果は独創性の高いものであり、第2章の結果は既に権威ある国際学術雑誌に発表されている。また、第3章の結果は現在論文投稿中である。

以上により、審査委員会全員一致で本申請論文は博士（理学）の学位論文として十分であると判断した。