2PA093

ヘム結合型 Heme-Binding Protein²³ の可視共鳴ラマンスペクトル
 ○¹安藤 理彦、²阿部 靖子、²西野 武士、^{1,3}北川 慎三
 (¹総研大・数物、²日本医大・医・生化学、³分子研)

【序】

Heme-Binding Protein (HBP) 23 は、ラット肝細胞質より単離された分子量 23K の蛋白質で、ヘムと高い親和性 ($K_d=55$ nM) を有する。ヘム非結合型 HBP23 の X 線構造解析からは、サブユニット間に形成されたジスルフィド (Cys52 と Cys172) 結合がパーオキシデースの活性中心であることが提唱され、変異体をもちいた実験によりこれが確かめられた。一方、HBP23 はヘムと 1 対 1 の割合で結合することが知られているが、その構造と機能は未解決である。本研究では、ヘム結合型 HBP23 (Complex) の構造を調べるために、可視共鳴ラマン分光法をもちいた。

【実験】

Complex は、HBP23 に酸化型 Hemin (Fe^{3+}) を少量ずつ滴下し、HBP23:Hemin=7:3 の割合に調整した。その後、遠心を行い上澄みを採取し、イオン交換樹脂 (DE-25)、ゲル濾過 (G-75) の各カラムを通し、透析を行った。ラマン散乱光の励起波長は、Complex Fe^{3+} と Complex Fe^{2+} 型は 406.7 nm、Complex Fe^{2+} -CO 型は 422.6 nm で測定した。

【結果】

Complex Fe^{2+} -CO 型は、Fe-CO 伸縮振動が 492 cm^{-1} に観測された。これは、ミオグロビンの遠位 His を非極性な Val などに変えた変異体の振動数に近い。このことは、ヘムの遠位側の環境が、非極性であることを示唆している。また、420 nm にソーレー帯を持つことから、軸配位子が、His か Lys である可能性が高い。Complex Fe^{2+} 型は、吸収スペクトルのソーレー帯 ($\lambda_{\text{max}}=425$ nm) とラマンスペクトルのスピンステートマーカーバンド ν_3 (1468 cm^{-1}) から、5 配位高スピンであると思われる。しかし、Fe-His 伸縮振動が期待される波数域に観測されなかったことから、軸配位子は His ではないと思われる。Complex Fe^{3+} 型は、吸収スペクトル ($\lambda_{\text{max}}=410$ nm) とラマンスペクトル ($\nu_3=1501\text{ cm}^{-1}$) から、6 配位低スピンであった。

これらのことから、軸配位子のひとつは Lys と考えられ、第 6 配位子も、N や S の配位能力が大きいリガンドと思われる。

M. Aki, Y. Abe, T. Nishino, T. Kitagawa,
 Visible Resonance Raman Spectra of Heme-Binding Protein²³

2PA095

シロザメヘモグロビンの立体構造

—ヒト、アカエイヘモグロビンとの比較

直井 如江 Chong Khoo Tee 堀 洋 森本 英樹 (阪大院・基)
 Sam Yong Park (理研・播磨)

脊椎動物 Hb で ($\alpha\beta$)₂ 型 4 量体構造およびリガンド結合に伴う 4 次構造変化を獲得した後、最初に分岐した軟骨魚類のシロザメ Hb の deoxy 型と CO 型の結晶構造解析を行った。deoxy 型は 2.0 Å 分解能で R=0.18、CO 型は 2.0 Å 分解能で R=0.21 まで精密化した。

他種の Hb と一次構造を比較すると、ヒトで 37%、クロマグロ (硬骨魚類) で 37%、アカエイ (軟骨魚類) で 40% 一致し、ヒトとクロマグロでは 52% である。これらの数値は系統樹上の距離を反映している。シロザメ Hb のアミノ酸置換の中には、ヒトで機能異常をひき起こすような置換も含まれている。しかし、酸素平衡機能の比較ではヒト Hb と大きな差はみられない。また、ヒトとシロザメ Hb の 4 量体を重ねると、deoxy 型、CO 型共によく重なり、リガンド結合に伴う構造変化が保存されていることがわかる。

ここまでの結果は、アカエイ Hb の結晶構造から得られた知見と一致している。しかし、アカエイ Hb ではヒト Hb と詳しく構造を比較した結果、機能調節部位 (ヘム近傍、ポーアプロトン放出部位、有機リン酸結合部位、 $\alpha_1\beta_2$ 界面) に重要と思われる変化が見つまっている。これらの部位が厳密に保存されているわけではなく比較的自由に変わり得ること、遠くの置換が重なって機能上重要な位置に変化をもたらしていることを示唆している。

この点に注目して、ヒトとアカエイ、シロザメ Hb の立体構造比較および考察をおこなう。

Y. Naoi, C. K. Tee, H. Hori, H. Morimoto, S. Y. Park:
 The Structure of *Mustelus griseus* hemoglobin

2PA094

転写調節因子 CooA の機能発現に関与する

ヘム軸配位子の研究

○山本克彦¹、石川春人¹、高橋聡¹、石森浩一郎¹、森島績¹、中島洋²、青野重利² (¹京大院・工、²北陸先端大・材料科学)

CooA は、光合成細菌 *Rhodospirillum Rubrum* 中において、細菌が嫌気下で活動するために必要な CO 代謝系の発現を制御する転写調節因子である。CooA はその中にヘムを含んでおり、CO がヘムに配位することをトリガーとして DNA に結合し、転写活性が発現すると考えられている。

CooA のヘム鉄は常に 6 配位であり、酸化型 (鉄 3 価) では Cys75、還元型 (鉄 2 価) では His77 の配位が示唆され、ヘム鉄の配位状態により配位子が交換されることが示されているが、両方に共通なヘム軸配位子 L は同定されていない²。機能発現型である還元型 CO 体では L と CO が置き換わることから、このヘム鉄から解離した L による蛋白質の構造変化によって DNA 結合能が与えられと推測されている。

天然型の還元状態の ¹H-NMR スペクトルから、L として Lys が推定されたので、ヘムドメインに位置する Lys を Ala に置換した変異体 (K26A、K30A、K101A) を作製した。得られた変異体の還元型での ¹H-NMR スペクトルは天然型と比べて大きな変化は観測されず、Lys が L であるとは考えにくいことが明らかとなった。Lys 以外のアミノ酸残基による L の可能性を検討するために、酸化型と還元型の反応中間体の有無についても検討を行った。Stopped-flow rapid scan により酸化及び還元反応をモニターしたところ、吸収スペクトルには等吸収点を確認された。従って、この反応は中間状態を経由しない、もしくはその存在寿命は短いと考えられ、Cys75、His77 以外の配位子についての情報は得られなかった。現在、還元型におけるヘム軸配位子である His77 を置換した変異体を用いて ¹H-NMR 等の測定を行い、ヘム鉄に L と CO が配位した状態を捉えることによって L の同定を進めている。

1) Uchida, T., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19988-19992

2) Aono, S., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 25757-25764

2PA096

共鳴ラマン分光法による酸素センサータンパク質 FixL の CO 結合状態の研究

○向井政博、宮武秀行、中村寛夫、城宜嗣、飯塚哲太郎*
 (理化学研究所、法政大*)

序) 酸素センサータンパク質 FixL は、酸素センサー部分の heme 部分とリン酸結合部位を含む kinase 部分から構成されている。最近 heme 部分のみの X 線結晶構造が報告され、heme の近傍に存在するアミノ酸残基が同定された。我々は以前から 209 番目と 210 番目のイソロイシン (Ile) の変異体が heme 鉄の状態に大きな影響を与えることを見だしていたが、結晶構造からこれらのアミノ酸残基が heme の distal 側にあり、heme 鉄と非常に近い位置に存在することがわかった。

一方、一酸化炭素結合型 (CO) heme 鉄の Fe-CO 結合の強さは、その結合角および heme ポケットにおけるアミノ酸残基の極性で敏感に変化することが知られている。そこでいくつかの変異体 FixL の CO 結合型について、その結合の強さを調べた。

結果) まず最初に野生型の FixL について heme 部分のみのタンパク質 (FixLN) と kinase 部分を含むタンパク質 (FixL*) の CO 結合型における共鳴ラマンスペクトルを測定した。Fe-CO および C-O 伸縮振動数は、FixLN では 502 cm^{-1} 、 1956 cm^{-1} 、一方 FixL* では 498 cm^{-1} 、 1962 cm^{-1} に変化した。このことは以前 EXAFS 法により測定した CO 結合型 FixL の Fe-CO 結合角が、FixLN では 171° 、FixL* では 157° 度と変化している事実とよく一致している。つまり、FixL* では kinase 部分の heme 部分への何らかの相互作用のため、heme ポケットが狭まり Fe-CO 結合角が曲がり、そのため heme 鉄からの CO への電子の流れ込みが減少し、Fe-CO 結合強度が減少したと考えられる。このことは kinase 部分が heme の distal 部分に影響を与える位置にあることを示唆している。

一方 FixL* の 209 番目または 210 番目の Ile をヒスチジンおよびチロシンに変えた変異体の CO 結合型における Fe-CO および C-O 伸縮振動数は、野生型に比べほとんど変化を示さなかった。このことはミオグロビンにおける研究から類推すると、209、210 番目の位置のアミノ酸は、CO 結合状態でヘム鉄からかなり離れた位置に移動してしまっていると考えられる。この原因が疎水性のアミノ酸残基を親水性の物に変えたためなのか、野生型でも同じ事が起こっているのか現在検討中である。

M. Mukai, H. Miyatake, H. Nakamura, Y. Shiro, T. Iizuka