2P017

酸素センシング機能を持つヘム蛋白質 Dos の可視共鳴ラマン分光

○佐藤 亮¹、水谷 泰久²、笹倉 由貴江³、佐上 郁子³、清水 透³、北川 禎三⁴ (¹ 総研大先端科学、² 神戸大分子フォトサイエンス研、³ 東北大多元物質研、⁴ 岡崎研究機構統合バイオ)

【序】環境中の O₂、CO、NO 等の小分子のヘムへの脱着により、酵素活性や転写機能を制御するヘム蛋白質が数多く発見されている。Dos は大腸菌由来の蛋白質であり、酸素センサーとして機能するヘム結合部位とホスホジエステラーゼの酵素部位から構成されている。本研究では、ヘム及びヘム近傍の構造を議論するのに有効な手法である共鳴ラマン分光法により、Dos 蛋白質のヘム結合ドメイン (Dosh) を調べた。【結果及び考察】Dosh の酸化型及び還元型に対して、 ν_2 、 ν_3 バンドは各々 $\nu_2=1578\text{cm}^{-1}$ 、 $\nu_3=1506\text{cm}^{-1}$ (酸化型)、 $\nu_2=1579\text{cm}^{-1}$ 、 $\nu_3=1492\text{cm}^{-1}$ (還元型) に観測されたので、ヘムは六配位低スピンであることがわかった。また CO 結合体では $\nu_2=1580\text{cm}^{-1}$ 、O₂ 結合体においては $\nu_2=1581\text{cm}^{-1}$ 、 $\nu_3=1505\text{cm}^{-1}$ であり、両状態共ヘムは六配位低スピンと考えられる。さらに CO 及び O₂ の同位体置換に敏感なバンドを差スペクトル法で検出し、Fe-C、C-O の伸縮振動をそれぞれ 484cm^{-1} 、 1973cm^{-1} 、Fe-OO 伸縮振動を 561cm^{-1} と帰属した。これら実験事実から、CO 及び O₂ のヘム結合時に、元々配位していたアミノ酸残基の一方はヘムから離れ、ヘムポケットはかなり疎水であるが、ヘムに結合した O₂ は周辺アミノ酸残基と強く水素結合していることが示唆された。Fe-C と C-O の伸縮振動数の経験則から、CO のトランスリガンドは His と推定されるが、それを CO の光解離体で確認した。即ち、ピコ秒又はナノ秒のバルス光をポンプ光とした CO 光解離ポンプ・プローブ測定により Dosh 五配位中間体の検出に成功し、 214cm^{-1} に Fe-His 伸縮振動バンドを観測した。このバンドは H77A 変異体では観測されず、CO 結合体のトランスリガンドは His77 であると結論した。

A.Sato, Y. Mizutani, Y. Sasakura, I. Sagami, T. Shimizu, T. Kitagawa : Visible Resonance Raman spectroscopy of oxygen-sensing heme protein Dos.

2P019

実験腫瘍薄片の赤外線分光 (FTIR) 顕微鏡による蛋白質構造変化部位のバイオイメーjing

○三好 憲雄¹、山田 哲史²、小川 透²、佐藤 充彦³、赤尾 賢一⁴、阿部 和彦⁴、金内 美美子⁴、佐野 一雄²、馬場 久敏³、福田 優¹ (¹ 福井医大・医・病理 I、² 福井医大・医・歯科口腔外科、³ 福井医大・医・整形外科、⁴ 日本分光 (株))

腫瘍組織に含まれる生化学的成分の分子構造を顕微赤外分析により、いわゆる分子指紋としてバイオイメーjingして、その画像に機能的意味付けを試みたので報告する。

対象は実験扁平上皮癌 (Squamous Cell Carcinoma = SCC) 組織であり、凍結薄切片 (4-6 μm) を BaF₂ プレート上に載せて風乾後、FTIR 顕微鏡 (IRT-30/410M 型、日本分光) で計測した。測定条件は分解能: 8 cm^{-1} 、積算回数: 20 回、アパーチャサイズ: $50\times 50\ \mu\text{m}^2$ 透過モードとした。マッピング測定は自動 X-Y ステージを用いて、 $21\times 21=441$ ポイントの計測を行った。腫瘍組織内にはコレステロール成分の集積が報告されていることから、今回、コレステロール由来 CH₂ の C-H 伸縮振動に帰属される $2926\ \text{cm}^{-1}$ のピーク強度でカラー表示イメーjingを行った。また、ピーク 1651cm^{-1} のアミド I ($1600\text{--}1700\ \text{cm}^{-1}$) でのカーブフィッティングと 17 種の市販蛋白質の FTIR のデータおよび円偏光 (CD) と X 線回折データベースより、腫瘍組織内蛋白質の二次構造の解析を試みた。

その結果、腫瘍組織内での中心壊死部位にはコレステロール沈着が見られ、 β -シート構造への蛋白質変性が認められた。一方、退行性変化を示さない腫瘍実質は、 α -ヘリックス構造を示した。このことから、腫瘍組織中心のコレステロール沈着部位では脂質過酸化による自動酸化が蛋白質変性を惹起したものと予測できた。本法は極微量の生検組織から腫瘍組織内の質的变化を分子構造レベルで迅速に行うことができ、癌の診断、治療の効果判定において有用な臨床検査手段として進展していくものと考えられる。

N.Miyoshi, T.Yamada, T.Ogawa, A.Sato, K.Akao, K.Abe, F.Kaneuchi, K.Sano, H.Baba and M.Fukuda : Bioimaging of Protein Secondary Structure from Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Experimental Tumor Tissue

2P018

DsbA-DsbB 間のジスルフィド交換反応における酸化還元電位の「逆転」現象

○稲葉 謙次¹、伊藤 維昭^{1,2} (¹ 京大ウイルス研、² 科技団 CREST)

生体内には、分泌蛋白質に対しジスルフィド結合を導入するシステムが備わっている。大腸菌ペリプラズム空間中では、可溶性蛋白質 DsbA が分泌された蛋白質のシステイン残基を酸化することによりジスルフィド結合を導入し、その組合せが誤っているときには、さらに DsbC が正しいものへ組み換える。DsbA がジスルフィド結合導入因子として機能するためには、その活性部位 CPHC モチーフは酸化型に保たれていなければならない。基質を酸化し還元型となった DsbA を再酸化する機能を担っているのが、内膜蛋白質 DsbB である。DsbB は、DsbA を特異的に認識し、呼吸鎖の成分であるキノンと共役して効率よく酸化する。本研究では、この DsbA-DsbB 間のジスルフィド結合交換反応機構を解明するため、DsbA と DsbB の活性部位の酸化還元電位について詳細な解析を行った。一連のシステイン/シスチンレドックス緩衝液中で平衡状態にある還元型・酸化型蛋白質の比を、AMS 修飾・SDS PAGE・Image Scanner による定量により見積もり、Nernst's Equation により DsbA 及び DsbB の酸化還元電位を決定した。その結果、pH8.0、25 度中で DsbA は -0.12V、DsbB の DsbA 酸化に直接関わる活性部位は -0.25V の酸化還元電位をもつことが判明した。この結果は、DsbA 酸化因子である DsbB の酸化還元電位は DsbA より高いであろうとの予測とは全く反するものである。DsbA と DsbB の酸化還元電位が逆転しているにもかかわらず、DsbB による DsbA 再酸化反応が進行するのは何故であろうか？おそらく DsbA-DsbB 間の高い親和性、さらには酸化還元電位が +0.12V と高いキノン分子と DsbB とのカップリングがこれを可能にしていると考えられる。本発表では、この一見異常な DsbA-DsbB 間のジスルフィド結合交換反応機構について、DsbB 活性部位変異体を用いた実験結果をもとに考察する予定である。

K. Inaba and K. Ito : Reversal of the intrinsic redox potentials of the redox active sites in the disulfide exchange reaction between DsbA and DsbB

2P020

X 線結晶構造解析による超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 PLP 酵素 PH0054 の触媒能

餅蔵野 愛子、尾瀬 農之、姚 関、本間 守、田中 勲 (北大・院理・生物科学)

超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 PH0054 は、塩基配列の相同性から ACCD (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase; EC 4.1.99.4) とアサインされる。ACCD は環状アミノ酸 ACC の脱アミノ化反応を触媒する PLP (ピリドキサル-5'-リン酸) 酵素である。我々は既に酵母由来 ACCD (yACCD) の立体構造を 2.0 Å で決定し、反応に関わるアミノ酸残基を推定している。

PH0054 の一次構造は、yACCD と約 30% の相同性を示し、反応に関与すると推定されたアミノ酸残基もほぼ保存されていた。しかし、遺伝子クローニングにより大腸菌で発現させた PH0054 は、ACCD 活性を示さず、吸収波長変化は、ACC と PLP が結合した状態で反応が停止していることを示した。さらに PH0054 は yACCD では基質阻害剤として働く L-Ala、L-Ser を分解することができる。すなわち、PH0054 は yACCD と異なる触媒活性を有している。

PLP 酵素はアミノ酸代謝に関わる様々な反応を触媒するが、その反応特異性は活性部位周辺の立体構造に決定される。我々は、PH0054 と yACCD の触媒能の差異が活性部位周辺のアミノ酸残基のわずかな違いに起因していると考え、PH0054 の触媒能と立体構造の因果関係を調べるため、X 線結晶構造解析を行った。

PH0054 の構造は Se を用いた MAD 法で得られた。現在 2.5 Å の Native データを用いて精密化を行っている。PH0054 は単量体あたり 1 分子の PLP が Lys57 残基と結合し、二量体で存在していた。yACCD の構造と比較して、大きく異なっているのは、yACCD において cavity の出入り口を形成しているループ 1 領域である。また活性部位周辺の構造は、保存されていない His86 (yACCD では Gln80) 以外よく似ていることから、His86 が PH0054 の触媒活性に重要な残基であることが予想される。

A.Fujino, T.Ose, M.Yao, M.Honma and I.Tanaka : Catalytic activity analysis of PLP dependent enzyme PH0054 from hyperthermophilic archaeobacteria P.horikoshii OT3 by X-ray crystallography