2P081

大腸菌チトクロム *bo* の酸素還元部位に存在する Tyr288 の機能的役割の検討

○内田 毅¹、茂田 立志²、中村 寛夫³、北川 禎三¹ (¹ 岡崎機構・統合バイオ、² 東大・院理、³ 理研・播磨)

チトクロム *bo* は大腸菌の好気的呼吸鎖の末端酸化酵素で、ユビキノールの還元力を利用してプロトン細胞外にくみ出すプロトンポンプとして働いている。サブユニット I は二つのヘム (ヘム *b* と *o*) と一つの銅イオン (Cu_B) を結合し、ヘム *o*- Cu_B 複核中心で酸素分子が水に還元される。同じ酵素スーパーファミリーに属するチトクロム *c* 酸化酵素の結晶構造解析から Cu_B に配位するヒスチジン残基の一つ His284 と 1 ターン下の Tyr288 は側鎖間で共有結合を形成していると考えられており、Tyr288 は酵素分子の O-O 結合解裂に重要な役割を果たしている。本研究では、1 位または 4 位の炭素を ^{13}C で置換したチロシン ($1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$ 、 $4\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$)、フェノール環の 4 個の水素を重水素に置換したチロシン ($\text{D}_4\text{-Tyr}$) で安定同位体標識した野生型酵素、Y288F 置換変異体、 Cu_B 配位子変異体 H333A を用い、酵素活性、ヘム組成、分光学的性質を比較検討した。

精製酵素のユビキノール 1 酸化活性は、 $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$ 置換体では野生型レベル (100 %) であったが、 $4\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$ と $\text{D}_4\text{-Tyr}$ 置換体ではそれぞれ 50 % と 20 % に低下していた。吸収スペクトルおよび共鳴ラマンスペクトルから、 $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$ と $4\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}$ 置換体の酸化還元中心の構造は野生型とほぼ同様であったが、 $\text{D}_4\text{-Tyr}$ 置換体ではチトクロム *o* 量 (CO 結合量) が低下し、 Cu_B を欠失して酵素活性が 1 % 以下に減少する H333A や Y288F 変異体に類似していることが示された。以上の結果は、チロシンフェノール環の重水素化は His284-Tyr288 間の共有結合の形成を妨げ、酵素機能発現には複核中心の特異的な分子構造の構築が不可欠であることを示唆する。また、本研究に基づき His284-Tyr288 間で自己触媒的に共有結合が形成される機構を議論する。

T. Uchida, T. Mogi, H. Nakamura, T. Kitagawa : Role of Tyr288 at the dioxygen reduction site of cytochrome *bo* studied by stable isotope labeling and site-directed mutagenesis

2P083

大腸菌由来酸素センサータンパク質 Dos のヘム周辺構造

宇野 公之、○大嶋 美智子、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊本大・薬)

【序】Dos (direct oxygen sensor) は、大腸菌ゲノムの解析から、当初機能未知の ORF として発見されたヘムタンパク質である。全長 807 残基の C 末端側はホスホジエステラーゼとホモロジーをもつ一方、N 末端側 147 残基は根粒菌の FixL と約 60% の相同性を有する。また、N 末端部分はヘムを含むことから、Dos は FixL と同じく酸素センサータンパク質として機能していると考えられている。しかしながら、センサー部位からどのような機構で触媒部位へとシグナルが伝達されるのか、現在のところまったく不明である。そこで今回、センサー部位の構造を明らかにする目的で、Dos のヘム含有ドメイン (DosH) をクローニングした。そして、紫外可視吸収スペクトル、及び共鳴ラマンスペクトルを測定してヘムの周辺構造について調べた。【結果・考察】大腸菌株 JM109 から PCR を用いて *dosH* 遺伝子をクローニングしたところ、既報の塩基配列と完全に一致した。野生型標品の紫外可視吸収及び共鳴ラマンスペクトルから、DosH は酸化型・還元型ともに 6 配位低スピンヘムを含むことがわかった。この配位構造は、5 配位高スピンヘムを含む FixL とは明らかに異なる。しかしながら、シアン滴定の結果、DosH はミオグロビンと同程度の解離定数を示したことから、外来性配位子が極めて結合しやすいことがわかった。また、CO 結合型の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、 ν (Fe-CO) が 492 cm^{-1} 、 ν (C-O) が 1972 cm^{-1} に観測された。したがって、DosH は近位の軸配位子として His を持ち、遠位側には極性の低いヘムポケットが存在することがわかった。FixL との amino 酸配列の相同性から、DosH に含まれる 2 つの His 残基のうち、77 位の His がヘム鉄の軸配位子になっているものと考えられた。

T.Uno, M.Oshima, Y.Tomisugi and Y.Ishikawa : Heme coordination structure of Dos, an oxygen sensor protein from *Escherichia coli*

2P082

シアノバクテリア由来ヘムオキシゲナーゼの大量発現とヘム-酵素複合体の分子特性

○右田 たい子¹、張 旭紅²、吉田 匡² (¹ 山口大・農、² 山形大・医)

Heme oxygenase (HO) は、動物のみならずバクテリア、藻類でも見出されている酵素タンパクであり、heme を酸化的に分解し biliverdin (BV) を生成する。哺乳動物における HO の主要な役割は不要な heme の代謝と鉄の回収であり、BV はさらに bilirubin へと転換される。高等植物においては、heme 代謝の生成物である BV が、光応答性制御に関与する phytochrome 中の chromophore である phytochromobilin の合成中間体であるため、HO は phytochromobilin 合成の前半の段階を担っていることになる。シアノバクテリア (藍藻) や紅藻では、光合成色素 biliprotein 中の光受容色素 phycobilin が、やはり HO の生成する BV から合成される。本研究では、シアノバクテリア *Cynechocystis* sp. PCC6803 の既報の塩基配列 (全長 720 bp) をもとに化学合成した 9 つの DNA 断片をつなぎ合わせ、これを大腸菌の発現 vector に組み込み発現系を確立した。6L の培養液から得られた発現タンパク質を SDS PAGE 上 single band まで精製し、20mg の精製酵素が得られた (SynHO-1, 分子量 27 kD)。SynHO-1 は heme を 1 対 1 で結合し、複合体の光吸収スペクトルは mammalian HO と同様であり Myoglobin のものとよく似ている。Heme-酵素複合体の極低温 EPR は heme が軸対称的 high-spin 状態であることを示し、g 値は ratHO-1 や bacterial Hmu O の値と同様であった。還元型 heme-酵素複合体溶液に NO を作用させると NO 付加体の EPR spectrum が得られ、窒素原子核による超微細分裂から、His が proximal ligand であることが確認された。またその g 値の異方は ratHO-1 > Hmu O > SynHO-1 の順に小さく、酵素タンパクがつくる heme 近傍の環境が異なっていることが示唆される。pH 依存性からも同様の結果が得られた。

C.T.Migita, X.Zhang and T.Yoshida : Heme oxygenase from cyanobacterium *Synechocystis*: expression and characterization of the heme-enzyme complex

2P084

共鳴ラマン分光法による酸素センサー蛋白質 HemAT の構造と機能に関する研究

○太田 雄大¹、北川 禎三¹、松木 真由美²、中島 洋²、青野 重利² (¹ 岡崎共同統合バイオ、² 北陸先端大材料)

HemAT 蛋白質は枯草菌の酸素に対する走化性制御系において、酸素センサーとして機能する情報伝達蛋白質と推定されている。これまでに HemAT 蛋白質は、分子中にプロトヘムを含むことが明らかにされている。本研究では、HemAT による酸素感知機構および情報伝達機構を解明するために、共鳴ラマン分光法により HemAT 中に含まれるヘム配位構造およびヘム周辺の局所構造の解析を行った。大腸菌中で発現した HemAT を精製し吸収スペクトルを測定すると、酸素化型ミオグロビンのスペクトルに類似した、6 配位低スピン型ヘム蛋白質に特徴的なスペクトルが観測された。また、精製した HemAT に CO を吹き込むと CO 結合型 HemAT が生成したことから、精製した HemAT のヘム鉄は 2 価の状態であることが示された。これらの結果から、精製した HemAT は酸素化型であることが示唆された。さらに、精製した HemAT を励起波長 413.1 nm の Kr⁺ レーザーで共鳴ラマンスペクトルを測定すると、 560 cm^{-1} のバンドが $^{18}\text{O}_2$ 下では 540 cm^{-1} へ波数シフトした。したがって、 560 cm^{-1} のバンドは Fe-O_2 伸縮振動と考えられ、大腸菌で発現した HemAT は酸素化型として単離されることが明らかになった。 560 cm^{-1} の Fe-O_2 伸縮振動数は酸素化型ミオグロビンのそれ (569 cm^{-1}) と比べて低いことから、遠位側ヘムポケットのアミノ酸残基が、ヘム鉄に配位した酸素分子中の鉄イオンに近い側の酸素原子に水素結合していることが推察された。実際に、 560 cm^{-1} のバンドが重水中では 567 cm^{-1} へ波数シフトしたことから水素結合の存在が示された。部位特異的変異導入法により、アミノ酸残基の特定を試みた結果については講演で述べる。

T. Ohta, T. Kitagawa, M. Matsuki, H. Nakajima, and S. Aono : A Resonance Raman Study of the Oxygen Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus subtilis*