B245

Zea mays cytochrome b561 の cDNA クローニングと DHFR 融合タンパク質の発現

瀧上 忠一¹、○中西 伸行^{1,3}、長谷 俊治²、鐸木 基成^{3,4} (¹ 姫路工大院・理・生命、² 阪大・蛋白研、³ 神戸大院・自然科学、⁴ CREST, JST)

cytochrome b561 は副腎髄質や脳内の神経内分泌小胞に存在し、アスコルビン酸由来電子伝達系の中心的役割を担っている。これまで b561 は動物の神経系細胞への局在が確認されてきたが最近になって高等植物においても b561 と相同性のある遺伝子配列が存在することがわかってきた。実際、還元型 α 帯吸収極大が 561 nm にあるヘムタンパク質が植物膜中に発現されている。しかし、遺伝子全長配列が決定されている植物 b561 はそれほど多くなく、機能上重要と思われる部位の同定もされていない。本研究では高等植物トウモロコシ b561 の cDNA 全長配列を決定し、他の生物種の b561 との一次構造を比較し、重要な部位を推定した。トウモロコシ b561 の一次構造はデータベース EST division に登録されていた部分配列をもとにして、cDNA ライブラリーから b561-cDNA の 3' 末端側断片を PCR クローニングした。部分決定した配列をもとに b561-cDNA 全長配列を決定した。他の生物種の一次構造と比較した結果、トウモロコシ b561 は *Arabidopsis* b561 と高い相同性をもっていたが、動物種の b561 とはそれほどではなかった。しかし、ヘム配位性と思われる His 残基や電子受容に重要と思われる Lys 残基等のアミノ酸残基は完全に保存されていた。また、完全ではないがアスコルビン酸とモノデヒドロアスコルビン酸ラジカルの結合部位の保存も見られた。ハイドロパシープロットを用いた解析により、6 回膜貫通型であることがわかった。こうした高い保存性のある部位や似通った膜貫通構造は、その生理機能においても重要な役割を担っていると考えられる。さらにトウモロコシ b561 の免疫組織化学研究に必要な抗原を作成した。全長 b561 の発現系の構築はできなかったが、DHFR と b561 の C 末端親水性部位との融合タンパク質を大腸菌に発現させて精製した。

T. Takigami, N. Nakanishi, T. Hase and M. Tsubaki : cDNA cloning of *Zea mays* cytochrome b561 and its expression

B247

IDO(Indoleamine 2,3-Dioxygenase) の基質結合性に対するヘム周辺アミノ酸残基の役割

宇野 公之、○細川 智子、松浦 明美、津本 麗奈、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊大院・薬)

【序論】IDO はヒト必須アミノ酸である L-Trp 代謝の第一段階であり、かつ律速段階を触媒するヘムタンパク質である。生体内では肝臓組織以外に広く分布しており、ウイルス感染や慢性炎症などに応じてインターフェロン γ によって誘導されることが解明されている。しかし、分子レベルでの L-Trp 代謝機構や立体構造は未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では紫外可視吸収分光法や共鳴ラマン分光法を用いて、ヘム周辺構造や基質結合性、及び反応機構について検討を行った。【結果・考察】アミノ酸配列の相同性、及び pH 滴定により、遠位軸配位子は水であり、His がその水を安定化していることが示唆された。また、共鳴ラマンスペクトルにおいて、 ν (Fe-His) が 233 cm⁻¹ という高い波数に観測されたことから、IDO の近位軸配位子である His の近傍には負電荷をもつアミノ酸残基が存在し、水素結合を形成している可能性が示唆された。CO 結合型 IDO の共鳴ラマンスペクトル測定、及び基質 (L-Trp, 5-OH-L-Trp, D-Trp, Serotonin, 1-Me-L-Trp) 滴定を行った結果、L-Trp の 5 位はヘム鉄から離れた場所に存在し、5 位に対応する位置には基質結合の障害となるアミノ酸残基が配置されていることが示唆された。また、L 型のカルボキシル基とアミノ基を安定化するアミノ酸残基がヘム周辺に存在しており、1 位プロトンは基質の固定化に関与していることが示唆された。さらに、酸化型、CN 結合型、還元型、CO 結合型を用いて L-Trp との親和性を検討したところ、CN 結合型が最も L-Trp との親和性が高いことが分かった。IDO の反応機構には様々なモデルが提唱されているが、本研究の結果から、CN 結合型と同じく酸化型ヘムに 2 原子からなるアニオンが結合したスーパーオキシド型が活性型であることが示唆された。現在、各種変異体を調製し、ヘム周辺に存在するアミノ酸残基や、その役割について検討中である。

T. Uno, T. Hosokawa, A. Matsuura, R. Tsumoto, Y. Tomisugi, Y. Ishikawa : The role of heme proximate amino acids in the substrate binding to IDO.

B246

NO 運搬タンパク質 NP4 の外來性配位子結合に対するアミノ酸残基の役割

宇野 公之、○浜辺 由紀、森山 友美子、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊本大・薬)

【序論】NP4 (ニトロフォリン 4) は吸血性サシガメ *Rhodnius prolixus* の唾液腺中に存在するヘムタンパク質で、宿主動物 (人間など) の生体反応に影響してサシガメの吸血を促進する作用を示す。NO 運搬、ヒスタミン結合の機能を持ち、B 型のヘムを含む 8 本の逆平行ストランドで形成される β バレル構造を持つことが X 線結晶解析により示されている。これまで、野生型 NP4 の共鳴ラマンスペクトル、紫外・可視吸収スペクトル測定、pH 滴定、さらにヒスタミン類似化合物やシアンを用いた滴定を行い、これらの解離平衡定数 (Kd) を算出した。今回さらに NO やヒスタミンの結合機序を明らかにするため、ヘム周辺に存在する Asp30 と Asp70 に変異をほどこした D30N と D70N を調製し、比較検討を行った。【結果・考察】変異体 D30N、D70N は野生型と同様、酸化型では 6 配位高スピンヘムを、ヒスタミン、NO 結合型は 6 配位低スピンヘムをふくむことが分かった。また、D30N の場合ヒスタミンの Kd が野生型に比べて大きくなったことから 30 位のアスパラギン酸はヒスタミンの配位を安定化していることが示唆された。さらに、ヒスタミン類似化合物による滴定において D30N、D70N 共に野生型同様 Kd は配位子の pKa とよく相関し、塩基性の強い配位子ほどヘム鉄に対する親和性が低いことがわかった。これは、近位軸配位子のヒスチジンからヘム鉄への強い電子供与を示唆している。結晶構造より 70 位のアスパラギン酸から水を介したチャージリレーによって近位軸配位子であるヒスチジンからの強い電子供与が起こっていると考えられたが、D70N の結果に変化が見られなかったことよりその電子供与には Asp70 以外のアミノ酸が関与している可能性が示唆された。

T. Uno, Y. Hamabe, Y. Moriyama, Y. Tomisugi and Y. Ishikawa : Role of the amino acid residues in the exogeneous ligand binding to an NO carrier protein, NP4.

B248

CO 結合型ヘム-ヘムオキシゲナーゼの光解離による生成物阻害回避機構の解明

○杉島 正一¹、坂本 寛²、野口 正人²、福山 恵一¹ (¹ 阪大院・理・生物科学、² 久留米大・医・医化学)

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は 3 段階の酸素添加反応によってヘムのポルフィリン環を開裂する。この反応でヘムは基質であると同時に酸素を活性化する補酵素でもある。この反応において CO が一分子放出されるが、CO は通常ヘムに対して非常に強く結合するため、放出される CO は酸素の競合阻害剤となりうる。しかし、*in vitro* の反応において CO による阻害は見られないので、それを回避するメカニズムが HO にあると考えられる。昨年度の本学会において、我々は CO 結合型ヘム-HO と NO 結合型ヘム-HO の立体構造を決定し、それらの比較から、HO では遠位側ヘムポケットは非常に狭く、CO 結合状態では遠位側ヘリックスと CO が立体的衝突を避けるように、ヘムと遠位側ヘリックスがそれぞれ逆方向に並進することを示した。今回、我々は実際に HO において CO が放出された場合、どのような現象が起こるかを研究する目的で CO 結合型ヘム-HO 結晶の光解離実験を行った。冷却ヘリウムガス吹き付け条件下 (35K-45K) で結晶に赤色光を連続照射することにより、CO が光解離した中間状態のデータを収集し、その結晶構造解析を行った。光照射によりヘム鉄に結合した CO が解離すると共に、Phe 37、Phe 47、Val 50、Met 51、Leu 54、Leu 147、Phe 167、Phe 214 からなる疎水的 cavity の中に電子密度が新たにあらわれ、光解離した CO の一部がこの部位にトラップされたと解釈できる。この事は HO 反応において放出された CO が一時的にこの部位にトラップされることによる生成物阻害の回避を示唆する。その他に CO と Asp 140 間の水素結合ネットワークを形成する水にも変化が見られたが、タンパク部分では大きな構造変化は見られなかった。この事は HO が遠位側配位子の解離、結合において比較的 rigid であることを示唆する。

M. Sugishima, H. Sakamoto, M. Noguchi, and K. Fukuyama : Elucidation of the mechanism for preventing the product inhibition by photolysis of CO-heme-heme oxygenase