B249

Effects of Imidazole on Structure and Function of Soluble Guanylate Cyclase

○ Pal Biswajit¹、竹中 重雄²、津山 信吾²、北川 禎三¹ (¹岡崎研究機構・統合バイオ、²大阪府大院・農学生命)

Soluble guanylate cyclase (sGC), a physiological receptor of nitric oxide (NO), converts GTP into cyclic GMP (cGMP), which acts as a second messenger in many cell signaling pathways. Native sGC contains a ferrous heme and its catalytic activity increases up to 200 times by the formation of a five-coordinate (5c) species when NO binds to heme. YC-1, a benzanidazole derivative, also activates the CO-bound sGC. Imidazole is known to bind to the heme of sGC as well as of model compounds. Imidazole serves as the sixth ligand and binds to the heme in the distal side of a heme-binding domain of truncated rat lung sGC [1]. However, there is no report of effect of imidazole on the structure and function of native sGC. We present resonance Raman characterization of effects of imidazole on sGC. Our results suggest that imidazole changes the heme pocket polarity of CO-sGC without affecting its activity. Imidazole and YC-1 synergistically activate sGC upto a certain point. However, at higher concentration of imidazole, heme iron of native sGC is probably oxidized to its ferric state and YC-1 and GTP facilitates this oxidation.

1. Zhao, Y., Hoganson C., Babcock G. T. and Marletta M.A. (1998) *Biochemistry*, 37, 12458-12464

B. Pal, S. Takenaka, S. Tsuyama and T. Kitagawa : Effects of Imidazole on Structure and Function of Soluble Guanylate Cyclase

B251

マウスの日周リズムに関連する転写因子 NPAS2 の PAS A ドメインの構造とヘム結合

○佐上 郁子、佐藤 恵美子、清水 透 (東北大・多元研)

NPAS2 は BMAL1 とヘテロダイマーを形成し、哺乳類の日周リズムに関する時計遺伝子の発現を制御する転写因子である。ごく最近、実は NPAS2 はヘムを結合しておりヘムへの CO の配位によってヘテロダイマー形成が抑制されることが報告された。NPAS2 は、N 端側に DNA 結合ドメインの bHLH モチーフと PAS ドメイン A, B を持つ。ヘムはどちらの PAS ドメインにも結合すると言われていたが、ヘムの結合様式と機能については良くわかっていない。そこで私達は、マウス脳の RNA より RT-PCR 法を用いてマウス NPAS2 の cDNA をクローニングし、大腸菌での発現系を構築した。PAS A ドメインの発現では、ヘムの結合しないアポタンパク質として精製された。精製した PAS A ドメインとヘムとの再構築を行い解析したところ、PAS A タンパク質 1 モルあたり 1 モルのヘムが結合し、その Fe (III) 錯体は典型的な 6 配位低スピン型の可視吸収スペクトルを示すことがわかった。また、SDS-PAGE とゲルろ過の結果から、アポタンパク質もヘム結合型 PAS A も溶液中では二量体であることがわかった。さらに、ヘムの内部配位子を同定するために変異体を作成し解析中である。

I. Sagami, E. Sato and T. Shimizu : A new heme-binding transcription factor NPAS2 which regulates circadian rhythm

B250

大腸菌由来のヘムに制御されるホスホジエステラーゼ (Ec DOS) のヘム結合、4 量体形成と活性との関係

○吉村 登紀子、佐上 郁子、笹倉 由貴江、清水 透 (東北大・多元研)

大腸菌由来の DOS, EcDOS は、N 末端側の PAS ドメイン (PAS-A, 及び PAS-B) と、C 末端側のホスホジエステラーゼドメインから成る 807 アミノ酸残基のタンパク質である。ヘムが結合している PAS-A は根粒菌の FixL と 60% の相同性を示し、ホスホジエステラーゼドメインは酢酸菌の AxPDEA1 と 50% の相同性を示す。本研究室において、この酵素は 93kDa の 4 量体であり、それぞれの単量体当たり 1 個のヘムが結合していることが明らかになっている。可視吸収スペクトルより、Fe (III) 錯体、及び Fe (II) 錯体ともに低スピン型 6 配位ヘムであることが示された。ヒスチジン 77 を他のアミノ酸に変異するとヘムの結合が消失したことより、ヒスチジン 77 が軸配位子の 1 つでないと考えられる。また EcDOS は、ヘムが Fe (II) の時にのみ cAMP に対するホスホジエステラーゼ活性を示し、ヘムが Fe (III) の時は活性を示さなかった。反応の至適 pH は 8.5 であり、Mg²⁺ を必要とした。又、cGMP は基質にはならなかった。今回、ヘム結合、多量体形成と活性との関係について明らかにするため、7 種類の欠損変異体を作成した。又、ヒスチジン 77 をアラニンに変異させた変異体も作成し、構造と活性の関係を調べた。その結果、4 量体形成部位及び基質結合部位を特定することができた。また、ヘムは多量体形成には影響を及ぼさないこと、三価のヘムが活性を阻害的に制御していること、及び 4 量体形成は活性に不可欠であることが示唆された。

T.Yoshimura, I.Sagami, Y.Sasakura and T.Shimizu : Heme Incorporation, Tetramer Formation and Catalysis of a Heme-regulated Phosphodiesterase, EcDOS

B252

Tn 球状領域結合部位 150-180 に変異を入れた Tm の性質

○佐久間 紹子、志鷹 裕司、木邑 智恵子、任 華、三木 正雄 (福大・工)

筋収縮制御タンパク質である Tm は、細いフィラメント中 7 つの Actin と結合し、それに対応して 7 つの相同領域を持つ。2,3,4 領域削除型 Tm (D234Tm) は、Actin・Tn に結合することはできるが、Ca 添加による acto-S1 ATPase の阻害の解除が行われない。このことから削除領域中に筋収縮制御に重要な部分があると推測した。トロポニン・トロポニン複合体の結晶構造解析から、トロポニン球状領域 (TnI & TnC) はトロポミオシンの 150-180 に結合していることが報告されている (White et al., (1987) *Nature* 325, 826-828)。D234Tm や Tm の領域 1 と領域 4 のそれぞれ対応する場所でのアミノ酸配列を比べると、領域 4 は領域 1 に比べて正電荷のアミノ酸が多い。そこで、163、164 番目のアミノ酸 (グルタミン酸; E) を、無電荷のアミノ酸に変えたもの、逆電荷に変えたもの (TmE163VE164K・TmE163KE164G・TmE163VE164G) を作製し、acto-S1 ATPase 活性を測定した。これらの mutant の Ca 添加時の ATPase 活性は、wild-type Tm に比べ、若干の減少がみられた。さらに広範囲のアミノ酸の影響を調べるため、Full-length Tm の領域 4 の C 端側 18 アミノ酸残基を領域 1 の C 端側 18 アミノ酸残基に置換した mutant (18aaTm) を作製し、ATPase 活性を測定した。また、反対に D234Tm の領域 1 の C 端側 16 アミノ酸残基を領域 4 の C 端側 16 アミノ酸残基に置換した mutant (16aaD234Tm) も作製し、これについても ATPase 活性を測定した。これらの結果をもとに、Tm の Tn 球状領域結合部位の制御に対する役割について考察を述べる。

A.Sakuma, Y.Shitaka, C.Kimura, H.Ren and M.Miki : Studies of Tm mutated in the Tn globular region binding site