2P061

マウスの目に発現する SOUL タンパク質へのヘム結合性とその配位構造

○佐上 郁子¹、佐藤 恵美子²、内田 毅³、佐藤 亮³、北川 禎三³、五十嵐 城太郎²、清水 透² (¹京都府大院・農、²東北大・多元研、³岡崎統合バイオ)

SOULは網膜や松果体に発現するタンパク質で、アミノ酸配列上は肝臓のヘムタンパク質 p22 HBP とホモロジーを示すが、その構造や生体における役割についてはよくわかっていなかった。そこで本研究では、SOULの構造と機能を理解するために、マウス SOUL の大腸菌での大量発現系を構築し、精製タンパク質を用いてこのタンパク質がヘムタンパク質であることを明らかにした。さらに、吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトル、CD スペクトルを用いてヘム結合性やヘムの配位構造などについて検討した。その結果、(1) SOUL タンパク 1 分子に 1 つのヘムが結合する。(2) アポタンパク質は溶液中で 2 量体であるがヘム結合によって 6 量体となる。(3) ヘム鉄の配位子の 1 つは His42 である。(4) SOUL は、肝臓のヘムタンパク質 p22 HBP とホモロジーを示すが、ヘム配位構造は互いに異なる。(5) CD スペクトルの結果から、アポ SOUL の α -helix 及び β -sheet 含量はそれぞれ 33% と 18% で、これらの値はヘムの結合によって変化しない。(6) ヘムに対する K_d 値は、 $4.8 \times 10^{-9} \text{M}$ である。などが明らかになった。以上のことから、SOUL は網膜や松果体でヘム結合タンパク質として機能していることが示唆された。

Fig. 2 Inverse correlation between the ν_{FeCO} and $\nu_{\text{C-O}}$ frequencies

I. Sagami, E. Sato, T. Uchida, A. Sato, T. Kitagawa, J. Igarashi, and T. Shimizu : Characterization of SOUL in Mouse Eyes: Optical Absorption, Resonance Raman Spectral and Heme Binding Properties.

2P063

鉄濃度制御蛋白質 IRP2 におけるヘムの結合とその配位環境

○遠藤 良輔¹、石川 春人²、岩井 一宏²、森島 績¹、石森 浩一郎¹ (¹京大院・工、²大阪市大・医)

IRP2 (Iron Regulatory Protein 2) は、高等生物において鉄代謝系蛋白質の発現を制御することで、生体内の鉄濃度を調節している RNA 結合蛋白質である。この IRP2 は、鉄が過剰になるとヘムに依存して起こる酸化修飾がシグナルとなってユビキチン-プロテアソーム系分解を受け、RNA 結合能を失うことが知られている。この酸化修飾は IRP2 にヘムが結合して起こるとされており、IRP2 におけるヘムの配位様式はその酸化修飾機構を考える上で重要である。そこで本研究ではヘム近傍構造に敏感な紫外可視吸収分光法、磁気円偏光二色性 (MCD) 分光法を用いて、IRP2 へのヘムの結合と配位環境を分光学的に解析することを目指した。酸化型ヘム存在下、IRP2 は他のヘム蛋白質ではほとんど報告のない 370nm 付近に幅広の吸収極大を示す特徴的な吸収スペクトルを示し、その MCD スペクトルからは主成分として 5 配位 Cys、副成分として 6 配位 Cys/His でヘムが配位していることが明らかとなった。この軸配位子である Cys としては、ヘムセンサー蛋白質に特徴的な CP motif 内の 201Cys である可能性が考えられたため、201Cys 変異体の吸収および MCD スペクトル測定を行ったところ、いずれのスペクトルにおいても有意な変化が観測され、IRP2 の軸配位子の一つは 201Cys であり、CP motif が IRP2 のヘム結合に関与していることが示された。一方、鉄 2 価である還元型ヘム結合 IRP2 の吸収および MCD スペクトル測定からは、ヘムは還元型において主に bis-His 型 6 配位で IRP2 と結合していることが示された。酸化型ヘムと還元型ヘムとで軸配位子が異なることは、IRP2 はヘム鉄の還元によって軸配位子が置換されることを示しており、これらの特徴は IRP2 での特異なヘム環境を反映していると考えられる。

R. Endo, H. Ishikawa, K. Iwai, I. Morishima, K. Ishimori : Spectroscopic Characterization of Heme Binding and Coordination Structure in Iron Regulatory Protein 2 (IRP2)

2P062

鉄濃度センサー蛋白質 Irr におけるヘムの親和性とその機能発現機構

○中垣 恵実¹、馬場 藍¹、石川 春人²、岩井 一宏²、Mark O'Brian³、森島 績¹、石森 浩一郎¹ (¹京大院工、²大阪市大医、³ニューヨーク州立大学)

マメ科の根粒菌内に存在する鉄濃度センサー蛋白質 Irr は、ヘムの生合成経路の初期段階における酵素の発現を抑制的に制御することで、細胞に光毒性のあるポルフィリンが蓄積しないように調節している。つまり、細胞内の鉄イオンが十分量存在すると、Irr はヘムと結合して分解されることで、酵素の発現の抑制が消失すると考えられている。この Irr はヘム結合により活性が制御される蛋白質に特徴的な Cys-Pro 配列 (CP-motif) をその配列上に含み、鉄 3 価のヘムはその 29 番 Cys に結合すると報告されているが、Irr の機能発現機構において重要なヘムに対する親和性やその結合様式については十分検討されていない。そこで、紫外可視吸収および蛍光スペクトルによるヘム滴定を行い、Irr のヘムに対する結合様式や、その親和性を検討したところ、Irr は 2 個のヘムが結合可能であること、およびその解離定数は Irr 濃度が上昇すると増大し、Irr 濃度 $0.4 \sim 4 \mu \text{M}$ の範囲において、それぞれ $60 \sim 400 \text{nM}$, $100 \sim 1000 \text{nM}$ であることが示された。さらに、ゲルろ過などの結果から Irr 間には会合体の形成が示され、Irr 濃度が高くなると、会合体の割合が増加したことから、Irr は会合することで見かけの結合能が低下することが考えられた。以上の結果より、単量体 Irr の解離定数は 10^{-10}M 程度と概算され、ミオグロビンのような一般的なヘム蛋白質の解離定数 10^{-14}M 程度と比較すると、そのヘム結合能は非常に低いことが明らかとなった。このような低いヘム親和性は、CP-motif 内の Cys のヘム鉄への配位においては、P450cam などの多くの Cys 配位のヘム蛋白質とは異なり、Cys のヘム鉄への配位を安定化する相互作用がないことを反映していると考えられる。

M. Nakagaki, A. Bamba, H. Ishikawa, K. Iwai, M. O'Brian, I. Morishima, K. Is : Heme Binding Affinity of Iron Response Regulator (Irr) and its Regulation Mechanism

2P064

ヘム PAS センサーの酸化還元にとまなう構造変化

○小林 一雄¹、田川 精一¹、横田 奈緒²、黒河 博文²、清水 透² (¹阪大・産研、²東北大・多元研)

酸素、光、酸化還元等のシグナルに応答するセンサー機能を持つ酵素として PAS ドメインと呼ばれる特徴的な三次元構造を持つ蛋白質が、広く生物界に存在している。これら PAS ドメインを持つ蛋白質は、on/off に伴う特徴ある構造変化が誘起されることが提唱され、注目されている。本研究では、その中でも PAS ドメイン内のヘム鉄の酸化還元に応答する大腸菌由来ホスホジエステラーゼ EcDOS をとりあげた。我々はすでにその X 線構造解析により、酸化型では第 6 配位子として H₂O がヘム鉄に配位し、還元されると H₂O が解離して、代わりに FG ループに存在する Met が配位することを明らかにした。この配位子の交換に伴って FG ループが flexible な構造から rigid な構造に変化することにより、タンパク質の構造変化がおくと考えられている。本研究ではパルスラジオリシス法を用いて、酸化還元に伴う構造変化のダイナミクスを追跡することによりヘムを介するシグナル伝達の機構を明らかにすることを目的とした。DOS 中のヘム鉄はパルスラジオリシス法により生成する水和電子により 1 マイクロ秒以内に効率良く還元し 425nm に吸収極大を示す中間体を生成した。その後 10 マイクロ秒領域で安定な還元型が生成することが分った。この過程がタンパク質の構造変化と考えられる。この構造変化の速度はすでに報告した CO センサーである CooA と比較してかなり速いことが分った。さらに構造変化に重要と思われるアミノ酸置換変異体のダイナミクスを研究することにより、構造とシグナル伝達の間関係を系統的に調べた。

K. Kobayashi, S. Tagawa, N. Yokota, H. Kurokawa, and T. Shimizu : Redox-controlled conformational change of heme PAS sensor