2P065

共鳴ラマン分光法を用いた CO センサー蛋白質 (NPAS2) のCO依存的な転写制御機構に関する研究

○内田 毅¹、佐藤 恵美子²、鴻渡 亮治²、向山 裕次²、黒河 博文²、佐上 郁子^{2,3}、清水 透²、北川 禎三¹ (¹ 岡崎統合バイオ、² 東北大・多元研、³ 京都府大院・農)

【序論】NPAS2は一酸化炭素 (CO) センサーとして新たに発見されたヘム蛋白質で、哺乳類の脳で発現し、転写調節因子として機能している。N 末端の basic helix-loop-helix (bHLH) ドメインと 2 つの PAS ドメイン (PAS-A, PAS-B)、及び C 末端の転写活性化部位からなる。各 PAS ドメインはそれぞれ 1 つのヘムと結合し、そこにシグナル分子である CO が結合する。NPAS2 は NADH による還元状態で BMAL-1 とヘテロダイマーを形成し、E-ボックスと呼ばれる配列に特異的に結合し、転写因子として作用するが、CO が存在すると BMAL-1 とのヘテロダイマーが解離し、DNA から遊離する。PAS ドメインへの CO の結合という情報がどのように BMAL-1 との界面に伝達され、蛋白質の構造変化を誘起するかと興味を持たれる。我々は既に、二つある PAS ドメインのうち、PAS-A の構造に関しては報告しているが、今回は PAS-B 及び bHLH/PAS-A 複合体に関して報告する。

【結果と考察】ヘムの酸化状態、スピン状態を表すマーカーバンドの振動数から PAS-B の酸化型は 6 配位高スピンと低スピンの混合物、還元型では 6 配位低スピンと 5 配位高スピンの混合物であった。PAS-A のマイナー成分であった 5 配位高スピンのバンドを除くと PAS-B は PAS-A と非常によく似たスペクトルを示した。また、CO 体の Fe-CO 伸縮振動は 497 cm⁻¹ と PAS-A と同じ位置に観測された。つまり、PAS-B は PAS-A と相同性は低いが、ヘムの環境は PAS-A によく似ていることが示唆された。一方、bHLH/PAS-A ドメイン複合体の酸化型と還元型は PAS-A とほぼ同じスペクトルを示したが、Fe-CO 伸縮振動は 3 cm⁻¹ 低波数シフトしていた。エフェクターである NADH は bHLH に結合すると考えられていることから、bHLH の構造変化が PAS-A に伝わりやすい機構が存在すると考えられる。

T. Uchida, E. Sato, R. Kodo, Y. Mukaiyama, H. Kurokawa, I. Sagami, T. Simizu, T. Kitagawa : Resonance Raman Study on the CO-dependent regulatory mechanism of NPAS2

2P067

NO 運搬タンパク質 NP4(ニトロフォリン 4) の外來性配位子結合機構

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

【序論】NP4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、X線結晶解析によりB型ヘムを含む8本の逆平行ストランドで形成されるβパレル構造をとることが報告されている。NP4は唾液腺内 (pH5) ではNOと結合しており、吸血の際、ヒトなどの宿主動物血管内 (pH7.4) に唾液が分泌されると、そこでNOを放出する。また、NP4は吸血により宿主から発生したヒスタミンを結合するという機能も併せつ。しかし、このpHに依存したNO放出とヒスタミン結合がどのような機構で成し遂げられているのかはまだ不明である。そこで本研究では、pH依存的な外來性配位子結合機構を明らかにするため、ヘム周辺アミノ酸残基に変異を施し、紫外可視吸収分光法や共鳴ラマン分光法を用いて検討を行った。【結果】変異体D30N、D70N、E32Qは全て野生型と同様、酸化型では6配位高スピンヘムを、結合型では6配位低スピンヘムを含むことがわかった。また滴定により解離平衡定数(Kd)を算出したところ、ヒスタミンに対するD30N、E32QのKdが野生型と比較して大きくなったことから、30位のAspと32位のGluはその側鎖がヒスタミンのアミノ基と静電的に相互作用することでヒスタミンの結合を安定化していることが示唆された。一方、NO滴定において、KdのpH依存性がD30NとE32Qでは野生型に比べて小さくなったことから、Asp30とGlu32のカルボキシル基がNO放出のpH依存性に関与していることがわかった。しかし、D70Nではヒスタミン及びNOに対するKdがともに野生型とほぼ同じであったため、近位側に存在するAsp70は外來性配位子の結合に直接的な影響を及ぼしていないことが示唆された。

T.Uno, Y.Moriyama, Y.Hamabe, Y.Tomisugi, Y.Ishikawa : Investigation of exogous ligand binding mechanism of Nitrophorin4

2P066

X線溶液散乱法で見たCooAの転写調節メカニズム

○秋山 修志¹、藤澤 哲郎¹、石森 浩一郎²、森島 績²、青野 重利³ (¹ 理研・播磨研究所、² 京大院・工、³ 自然科学研究機構・統合バイオ)

紅色非硫黄光合成細菌は、COを酸化して生育に必要なエネルギーを得る。COの酸化反応に関わる酵素の発現量は、COセンサー蛋白質CooAにより転写レベルで制御されている。CooAはヘムを含むヘムドメインとDNA結合ドメインで構成され、前者がCOを感知するセンサー部位として機能する。これまでの研究から、COの結合に伴ってDNA結合ドメインの相対位置が劇的に変化する仮説が提唱されてきた。しかし、ドメインの位置変化を検証した研究例は少なく、CooAの転写調節メカニズムは良く理解されていない。そこで我々は、CooAの溶液構造をX線溶液散乱法により検証した。散乱強度の濃度依存勾配から求めた+CO型の第2ペリアル係数は (-5.48 ± 0.13x10⁻⁴ ml mol g⁻²)、-CO型の約14倍にも達する負の値であった (-0.39 ± 0.25x10⁻⁴ ml mol g⁻²)。これは、-CO型よりも+CO型の方が2分子間で互いにより強く引き合うことを示し、CO結合に伴って分子表面の疎水性度や電荷分布が変化するものと推測される。分子間相互作用は単粒子解析の妨げとなるため、測定した散乱曲線を無限希釈へと外挿した。その結果、-CO型 (*R_g* = 25.3 ± 0.5 Å) と+CO型 (*R_g* = 25.8 ± 0.6 Å) の散乱は無限希釈において類似していた。この類似性は、両者の分子形状が似ていることを意味する。散乱曲線に合致する溶液構造をモデリングしたところ、-CO型の段階で既にDNA結合ドメインがヘムドメインの近傍に位置していることが明らかとなった。COの結合に伴い、DNA結合ドメインが分子の2回転対称軸まわりに約8度回転しつつ、僅かにヘムドメインから離れることが示唆された。以上の結果は、CooAの転写調節機構が繊細にデザインされており、表面電荷分布の変化や、DNA結合ドメインに存在する認識ヘリックスの僅かな配向変化により制御されていることを示す。

S. Akiyama, T. Fujisawa, K. Ishimori, I. Morishima, S. Aono : Activation Mechanisms of Transcriptional Regulator CooA Revealed by Small-angle X-ray Scattering

2P068

ヒト脳由来ニューログロビンの外來性配位子の結合性

宇野 公之、○堤 紘子、龍 大輔、清田 浩平、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊本大院・薬)

【序】ニューログロビン (Ngb) は、主に脊椎動物の脳や他の神経組織において発現している分子量約17,000の単量体ヘムタンパク質である。Ngbの機能は未だ明らかでないが、脳虚血状態時にはNgbの発現が促され、低酸素の障害から脳を保護する役割を担うと考えられている。Ngbは酸化型・還元型ともに6配位低スピンヘムを含み、His96およびHis64を軸配位子としてもつ。NgbはO₂やCOとの結合に際し大きな結合速度定数と小さな解離速度定数を示す。これらの結合反応には第6配位子であるHis64の解離が必要であるが、O₂の親和性はミオグロビンとほぼ同等であることから、ミオグロビンとは異なるヘム周辺環境をもつと考えられる。そこで、ヘム周辺に位置し外來性配位子の結合に関与するアミノ酸残基とその役割を明らかにすることを目的に、各種変異体を調製して結合性についての検討を行った。【結果】CO結合型Ngbの共鳴ラマンスペクトルを測定したところF28L、F42Lでは野生型同様にν (Fe-CO) が495cm⁻¹と522cm⁻¹に観測されたが、これらピークの強度比は野生型とは異なり、低波数成分が強く出現した。またCO滴定を行ったところ両変異体は野生型よりも大きな解離定数を示した。一方、N45FではCOの解離定数がさらに大きくなり、COの結合が容易でない環境が形成されていることがわかった。2本のν (Fe-CO) ピークは、COと置換したHis64の空間的位置の多様性を反映すると考えられていることから、Phe28、Phe42及びAsn45はHis64の可動性を制御することで外來性配位子の親和性に影響を与えていることが示唆された。

T.Uno, H.Tsutsumi, D.Ryu, K.Kiyota, Y.Tomisugi and Y.Ishikawa : Exogenous ligand binding properties of human neuroglobin