ガスセンサータンパク質の 機能発現機構 —CooAにおける転写活性化機構の解明—

熊本大学大学院医学薬学研究部 山下 沢

1. はじめに

さまざまな生物が生命活動を営む上で、外界の影響はきわめて大きい。生物をとり巻く環境にはいくつかの因子が存在し、これらは生命の誕生や進化の過程において大きな影響をおよぼしてきたものと考えられる。環境因子の1つとしては、酸素や窒素、一酸化窒素などのガス分子があげられ、その多くが酵素反応に用いられ、あるいは反応生成物として生じ、環境の中で1つの大きなサイクルを形成しているといっても過言ではない。生物とガス分子との関係においては、ヘムタンパク質が大きな役割を演じている。たとえば、ミオグロビンやヘモグロビンは酸素と結合し、それを貯蔵・運搬するタンパク質として古くから研究され、その立体構造もよく知られている^{1),2)}。また、酸素を用いて一原子酸素添加反応を触媒するシトクロム P450³⁾、さらには過酸化水素を分解して酸素を発生するカタラーゼなどのような酵素⁴⁾も存在し、ガス分子とヘムタンパク質とのかかわり方は多岐に渡っている。近年、これらヘムタンパク質の中において、ガスセンサータンパク質とよばれる新しい一群が発見され、注目を集めている。ガスセンサータンパク質とは、文字通りガスを感知して機能を発現するタンパク質であり、おもなものとして一酸化窒素を感知する可溶性グアニレートシクラーゼ⁵⁾や、酸素を感知する FixL⁶⁾、HemAT⁷⁾、Dos⁸⁾などがある。ガスセンサータンパク質の詳細に関しては過去にも本誌にて紹介された⁹⁾ことがあるため、全体的な話はここでは省略させていただく。

今回、本稿で紹介するのは、CO を感知して機能を発現するセンサータンパク質 CooA である。CooA は、先に示したものと大きく異なり、酵素ではなく転写制御

因子として機能することが明らかとなった初めての例である。CO というわずか2つの原子で構成された単純な分子を認識し、それによってタンパク質の複雑な活性化を制御する機構とはいかなるものか。現在までに報告されているガス感知転写制御因子はきわめて少なく、活性化のメカニズムについても不明な点が多いのが現状である。そこで、著者らはこの CooA に着目し、その構造および活性化のメカニズムについて検討を行った。以下に著者らの最近報告したものを中心に、CooA に関する現在までの知見をまとめる。

2. 光合成細菌由来のCO感知転写因子CooA

2.1 ガスセンサーとしてのCOの結合親和性

CooA は20世紀末に光合成細菌中にて発見され、CO の酸化に関与する酵素群の転写を制御することから CO-oxidation activator、略して CooA と名付けられた。この転写因子は、1つのポリペプチド鎖あたり1つのヘムを含み、CO が結合することによって活性化されて DNA に結合できるようになるというきわめて稀な特徴をもつ。

発見当初からアミノ酸配列の相同性にもとづきサイクリック AMP 受容体タンパク質(以下、CRP)と似通った構造をとると考えられていたが、2000 年になって X 線結晶構造解析によって解かれた立体構造から、両者の構造が非常に近いことが明らかとなった (Fig. 1)¹⁰⁾。しかしながら、CooA の結晶構造は転写不活性型である還元型のものであり、転写活性型である CO 結合型の立体構造に関してはいまだ解明されておらず、詳細な反応機構も明らかとはなっていない。活性型への構造変化は CO の結合により誘起されると考えられるが、20 世紀末に行われた速度論的な検討により CO の結合過程は多段階を示すことが明らかとなり¹¹⁾、詳細な検討は困難をきわめた。そこで著者らは、還元型 CooA に CO を徐々に加えて吸光度滴定を行い、結合速度からではなく平衡状態を追跡することで、CO の解離定数を 11 μM と算出することに成功した (Fig. 2)。この値は、ミオグロビンなどのヘムタンパク質と比べると 100 から 1000 倍程度大きく(すなわち結合親和性が低く)、他のガスセンサータンパク質と非常に近い値を示した¹²⁾。光合成細菌が無光嫌気的条件下で CO をエネルギー生産のために用い、その際の CO の酸化に関与する酵素群の発現を CooA が制御している¹³⁾ことを考えると、ある程度高いレベルのガス分圧でのみ CooA が活性化さ

The Activation Mechanism of Gas Sensor Proteins—Studies on the Transcriptional Activation Mechanism of CooA—
Taku YAMASHITA

The Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

Fig. 1 Structures of CooA and CRP. Effector-free inactive CooA (a) and effector-bound active CRP (b) are drawn. Dimer structures are shown, and each subunit is colored in dark and light gray. Residues surrounding the heme in ferrous CooA are shown (c). Asterisk (*) indicates the residue is provided by another subunit. All structures were drawn using PyMOL and data sets of 1ft9 and 1g6n in Protein Data Bank.

れることが説明可能である。また、解離定数が大きいことは、一般にガスセンサータンパク質はある一定の分圧までガスの濃度が上昇したときにだけ反応し機能発現に至るという考えを支持する。つまり、ガス分子に対する結合親和性が相対的に低いことはガスセンサータンパク質に共通の性質ではないかという仮説を立てることができる。今後、この点は、さらなるガスセンサータンパク質の発見によって検証されていくであろう。

2.2 活性化へとつながる軸配位子の配位構造

次に、本題である活性化機構について得られている知見を述べたい。先に述べたように、CooAは不活性型である還元型の立体構造のみがわかっているが、この構造から還元型ヘム鉄には2位のプロリンと77位のスチジジンが配位していることが明らかとなった。さらに驚くべきことに、2位のプロリンは同一のポリペプチド鎖内のヘムに配位するのではなく、同型2量体として存在するもう一方のポリペプチド鎖に含まれるヘムに対して相互に配位しあっていることが示された (Fig. 1)。ヘム鉄へのCOの結合が転写活性化に関与することから、ヘム鉄に配位している2つの軸配位子のうち、いずれかがCOによって置換されることで活性型へと移行するスイッチが入ると考えられたが、いずれが置換されるかという点については確定していなかった。そこで、著者らは2つの軸配位子それぞれの変異体を調製し、COの滴定による結合親和性の測定および共鳴ラマン分光法を用いて変異の影響を調べた¹²⁾。

その結果、2位のプロリンをスチジジンに置換した変異体 (以下、P2H) では、野生型と同様にヘム鉄1分子に対して1分子のCOが結合することが明らかとなっ

た (Fig. 2)。しかしながらCOの結合親和性については著しい変化が認められ、野生型と比較すると約200倍結合しやすくなった。このことは、野生型と比べてCOの結合サイト数には変化がないものの、結合部位の環境には大きな変化が生じ、COが結合しやすくなったためと考えられる。一方、77位のスチジジンをアラニンに置換した変異体 (以下、H77A) では、野生型やP2Hとは異なり、COの滴定による吸光度変化が2段階となった (Fig. 2)。このことは、野生型やP2HではCOの結合できるサイトが1つしか存在しなかったが、H77Aにおいては2つに増加したことを示唆している。また、共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、H77AではFe-CO伸縮振動に帰属されるラマン線が2本観測され、CO

Fig. 2 CO titration of ferrous CooA. Normalized absorbance changes of wild-type (gray circles), P2H (black circles), and H77A (open circles) are indicated, and theoretical curves are drawn assuming that one equivalent of CO molecule is related to the equilibrium. In the case of H77A mutant, two-step binding is apparent and each step was analyzed separately.

Fig. 3 “Roll-and-Slide model” for CO activation of ferrous CooA. The C-helix is drawn schematically as a helical wheel projection model in CO-free inactive (a) and CO-bound active (b) forms. Curved and straight arrows indicate the directions of helical movement by the CO-binding to the hemes. Perturbed residues were shown in bold black and gray, and the bold black residues are assumed to construct a heme pocket.

の結合環境は2種類存在することが明らかとなった。このことから、77位への変異導入によってCOの結合サイトが新規に構築されたことがわかるとともに、COが置換するのは2位のプロリンの配位している側（以下、遠位側）であることが明らかとなった。また各軸配位子の機能として、2位のプロリンはCOの結合親和性を制御しており、77位のヒスチジンは活性化に重要な遠位側へCOが配位するように導く役割を担っていることもわかった。さらに、77位のヒスチジンをアラニン以外に置換した変異体数種を調製して同様に測定を行ったところ、そのいずれにおいてもCOの分圧が高い際には2分子目のCOの結合が認められ、その親和性や2本のFe-CO伸縮振動の相対強度は、アスパラギン酸やグルタミン酸などの酸性残基への置換により特に顕著な影響を受けた。CooAは酸化型では77位のヒスチジンに代わり75位のシステインがヘム鉄に配位しているが、この軸配位子の置換についてはこれまであまり論じられていなかった。今回の結果から、77位のヒスチジンが75位のシステインのチオール基と極性相互作用することにより軸配位子置換を制御していることが示唆された。

2.3 Cヘリックスを介した活性化機構

前項で述べたCOの結合に関する知見にもとづき、さらに活性化のメカニズムについて検討した。活性化機構に関しては、国内外を問わず多くの研究グループによって研究が進められている。なかでも国内においては、X線小角散乱を用いた方法によって、CooAの活性型の立体構造がやはりCRPと非常に近い構造をとっているという興味深い結果が2004年に秋山らによって報

告されている¹⁴⁾。しかしながら、活性化機構に関する明確な解答は未だ得られていないのが現状である。

ここで改めてCooAの構造を見てみる（Fig. 1）。COが結合するヘムを含むエフェクテッドメインと、標的DNA配列に結合するDNA結合ドメインとは離れて位置しており、前項で示したように2位のプロリンがCOによって置換されることが活性化につながるならば、遠位側に結合したCOの近傍にDNA結合ドメインへと構造変化のシグナルを伝達する何らかの機構が存在することが考えられる。それを踏まえて遠位側に注目すると、そこには2量体の界面を形成しているCヘリックスとよばれる長いヘリックスが存在している。そこで著者らはこのCヘリックスに着目し、サブユニット間でヘム鉄に近い距離に存在するアミノ酸残基10個に対して網羅的に変異を導入し、分光学的測定により変化を追跡した¹⁵⁾。

その結果、116位のロイシン、117位のグリシン、120位のロイシンの変異体において、他とは著しく異なる変化が認められた。まず、共鳴ラマンスペクトルにおいて、Fe-CO伸縮振動に帰属されるラマン線が 6 cm^{-1} 高波数シフトした。さらにCOの結合親和性については、先に示した野生型のものと比較すると10倍程度上昇していた。このことは、これらの残基がヘム鉄へ配位したCOの近傍に存在することを示している。しかしながら、還元型の結晶構造を見てみると、COの近傍に位置するにはこれら残基は距離的に遠い位置に存在することがわかる。そこで著者らは、他のアミノ酸残基の変化についても検討した。その結果、112位のロイシンと115位のイソロイシン、121位のスレオニンの変異体

においてはCOの結合親和性のみ顕著な変化が認められた。このことは結合したCOの近傍には存在しないものの、COの結合過程に対してはこれらの残基が影響することを示唆している。さらに114位のアラニンを置換することで、ヘム鉄とCOの伸縮振動に帰属されるラマン線にはほとんど影響が見られなかったにもかかわらず、COの解離定数は200 μM となり、結合親和性が大きく低下した。ヘリックス上の同じ面にはアラニンと同じように側鎖の小さなグリシンなどが存在しているにもかかわらず、114位のアラニンの変異体についてのみ上記のような変化が見られたことから、この残基がCO結合型へと移行する際の支点的役割を担っていると推測した。

以上の点から著者らは1つの仮説にたどり着いた。つまり、還元型へCOが結合することにより、Cヘリックス同士の間における構造変化が生じ、その結果CooAが活性化されるのではないかという仮説である。上述した、COの近傍に位置している3つの残基、またCOの侵入に対して影響をおよぼす残基や転写活性化に非常に重要な役割を果たしている残基など、上記の結果を総合すると、Cヘリックスがわずかに回転し、さらに相互にスライドすることで、各アミノ酸残基の位置的条件を満たすことを発見した。過去に124位のメチオニンの変異によりヘム鉄の配位構造が影響を受けたとの報告がある¹⁶⁾が、今回の結果をもとに124位のメチオニンの位置を検証したところヘム近傍に存在することがわかり、以前の報告との間に何ら矛盾は生じなかった。このことから、著者らの考えたCヘリックスの動きが、COによる転写活性化機構の解明に対する重要な手がかりになると判断し、“Roll and Slide”モデルとして提唱した (Fig. 3)。

3. おわりに

本稿では、ガスセンサータンパク質に注目し、特に、その中でも数少ない転写にかかわるCooAをとり上げた。最近、COを利用して転写を制御するタンパク質が新たに報告されている。たとえば昨年、CooAと同様に、ヒスチジンとアミノ末端の残基が配位した六配位型ヘムを含むものが発見された¹⁷⁾。また、ヒトの脳内で発見されたCO感知転写因子NPAS2は、CooAと同様、酸化還元状態の変化によってヘム鉄軸配位子の置換が起こると推測された¹⁸⁾。これらCO感知転写因子の新たな発見により、今まで比較対照の存在が乏しかったCooAの配位構造の研究に対して、一筋の光明が差してきたといえる。しかし、CooAの本当の意味での機構解明という点から述べるならば、COの結合した立体構造を明らかにする必要がある、これが明らかとなってい

ない今、活性化機構を論じる上では、分光学的な測定に頼らざるを得ないのが現状である。

近年、ガスセンサータンパク質に関する研究は、日本国内においてもさかんに行われており、興味深い報告がいくつかなされている。本執筆にあたり、タンパク質を活性化するというガス分子の新しい役割について1人でも多くの読者が興味を示し、結果として、日本国内での本研究分野のより一層の発展につながってくれることを期待している。

文 献

- 1) Perutz, M. F., Rossman, M. G., Cullis A. F., Muirhead, H., Will, G. and North, A. C. T. (1960) *Nature* **185**, 416-422.
- 2) Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davis, D. R., Phillips, D. C. and Shore, V. C. (1960) *Nature* **185**, 422-427.
- 3) Guengerich F. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022.
- 4) Bravo, J., Verdaguier, N., Tormo, J., Betzel, C., Switala, J., Loewen, P. C. and Fita, I. (1995) *Structure* **3**, 491-502.
- 5) Krumenacker, J. S., Hanafy, K. A. and Murad, F. (2004) *Brain Res. Bull.* **62**, 505-515.
- 6) Gong, W., Hao, B., Mansy, S. S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A. and Chan, M. K. (1998) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 15177-15182.
- 7) Hou, S., Larsen, R. W., Boudko, D., Riley, C. W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G. W. and Alam, M. (2000) *Nature* **403**, 540-544.
- 8) Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G. and Gilles-Gonzalez, M. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 2685-2691.
- 9) 青野重利 (2002) 生物物理 **42**, 230-235.
- 10) Lanzilotta, W. N., Schuller, D. J., Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Roberts, G. P. and Poulos, T. L. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 876-880.
- 11) Uchida, T., Ishikawa, H., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., Ohkubo, K., Nakajima, H. and Aono, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19988-19992.
- 12) Yamashita, T., Hoashi, Y., Watanabe, K., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y. and Uno, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21394-21400.
- 13) Aono, S., Nakajima, H., Saito, K. and Okada, M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 752-756.
- 14) Akiyama, S., Fujisawa, T., Ishimori, K., Morishima, I. and Aono, S. (2004) *J. Mol. Biol.* **341**, 651-668.
- 15) Yamashita, T., Hoashi, Y., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y. and Uno, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 47320-47325.
- 16) Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Youn, H., Conrad, M., Serate, J., Staples, C. R. and Roberts, G. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26807-26813.
- 17) Inagaki, S., Masuda, C., Akaishi, T., Nakajima, H., Yoshioka, S., Ohta, T., Biswajit, P., Kitagawa, T. and Aono, S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 3269-3274.
- 18) Kaasik, K. and Lee, C. C. (2004) *Nature* **430**, 467-471.

山下 沢（やました たく）

熊本大学大学院医学薬学研究部機能分子構造解析学分野産学官連携研究員

連絡先：〒862-0973 熊本県熊本市大江本町5-1

E-mail: takuyama@gpo.kumamoto-u.ac.jp