3P089

潜水哺乳類ミオグロビン・ヘモグロビンの酸素結合特性

○小柳 恵¹、長友 重紀²、藤瀬 良弘³、山田 格⁴、三田 肇²、山本 泰彦²、今井 清博^{1,5} (¹法政大院・工、²筑波大・化学系、³日本鯨類研、⁴国立科学博物館、⁵法政大・工)

ミオグロビン (Mb) やヘモグロビン (Hb) の生体中における濃度や酸素親和性は、棲息環境に依存して異なると考えられる。本研究では、生物の棲息環境と Mb、Hb の性質の関係を詳細に理解するために、各種潜水哺乳類の Mb、Hb の酸素親和性を酸素平衡曲線から、ヘム周辺の立体構造環境を ¹H NMR や円二色性分光法 (CD) により解析し、それらの結果をアミノ酸配列を基に作成した立体構造モデルを参考にして検討した。

本研究で扱った 10 種類の潜水哺乳類 Mb では、種によって酸素親和性が最大で約 2 倍異なっていた。立体構造モデルから、これらの Mb 間には主鎖構造に大きな差がないことが示唆された。一方、ヘム周辺のアミノ酸は種間でよく保存されているが、それらの側鎖の相対配置が異なることが立体構造モデルから示唆された。このことから、ヘムから離れた位置の非保存アミノ酸の種類の違いが少しずつ影響し、酸素親和性にわずかな違いを生じていると考えられる。これは、CD の測定結果で Oxy 型および Deoxy 型の Soret 帯領域のシグナル強度に有意な差があることから支持されるが、酸素親和性、Oxy 型の CD、Deoxy 型の CD の間に明瞭な相関を見いだすには至らなかった。また、シアノ型の ¹H NMR より、遠位 HisE7 のヘムに対する配向が、潜水哺乳類間で異なることが明らかになり、ヘム近傍立体構造の違いが示唆された。

潜水哺乳類が長時間の潜水が可能なのは、心臓や血液の特性が陸生哺乳類と異なるからではなく、筋肉組織の Mb 濃度が高いためだと考えられてきた。しかし、本研究により、少なくとも分子レベルでは陸生、潜水哺乳類の Mb 間に顕著な違いがないことが示された。現在、Hb の研究も進行中であり、併せて報告したい。

M. Koyanagi, S. Nagatomo, Y. Fujise, T. Yamada, H. Mita, Y. Yamamoto and K. Imai : Oxygen binding properties of myoglobin and hemoglobin of diving mammals

3P091

ヘムを有する転写調節因子 CooA の DNA 結合による構造変化：共鳴ラマン分光法による研究

○久保 稔¹、稲垣 さや香^{1,2}、内田 毅¹、青野 重利¹、北川 禎三¹ (¹岡崎統合バイオ、²総研大院)

CooA は光合成細菌が持つシグナルセンサー・ヘム蛋白質であり、一酸化炭素 (CO) の脱着により DNA への結合能が制御される転写調節因子である。ホモダイマーとして存在し、各サブユニットは、ヘムを含むセンサードメイン (N 末端側) と DNA 結合ドメイン (C 末端側) からなる。この 2 つのドメインは 1 本の長い α -helix (Helix C) で結ばれている。ヘムに CO が結合すると、ヘムは蛋白質内部へスライドし、CO は疎水性結合ポケットにおさまると考えられている。センサードメインの構造変化は、Helix C を介して DNA 結合ドメインに伝播し、DNA 結合ドメインの配向が変化することによって、CooA は標的 DNA に結合する。CO フリー型の結晶構造については 2000 年に報告されているが、CO 結合型の結晶構造はいまだに解かれていない。そこで本研究では、ヘム近傍構造を観測できる可視共鳴ラマン分光法と、蛋白構造を観測できる紫外共鳴ラマン分光法を用いて、CO の有無や DNA の有無による CooA の分子構造変化を調べた。CO フリー型および CO 結合型 CooA の紫外共鳴ラマンスペクトルの解析の結果、CO の結合によるヘムのスライドは Helix C の N 末領域の変位を伴って起こっていることが明らかになった。この Helix C の動きによって、DNA 結合ドメインに構造変化が誘起されるものと考えられる。さらに CO 結合型の DNA フリーと DNA 結合型の可視共鳴ラマンスペクトルの解析から、CooA は DNA に結合後も構造変化を起こすことがわかった。DNA 結合型では、ヘムが蛋白質内部にさらにスライドしている可能性が示唆され、CO 結合ポケットは狭くなり CO の結合がより安定化していることも明らかとなった。CooA は DNA に結合して初めて完全な活性型に遷移するのであろう。

M. Kubo, S. Inagaki, T. Uchida, S. Aono, and T. Kitagawa : Structural change of the heme-containing transcriptional activator CooA on DNA binding: A resonance Raman spectroscopic study

3P090

類似したヘム近傍構造を持つ珊瑚由来アレンオキサイド合成酵素とカタラーゼ；機能の相違を決定している因子

○当倉 武彦¹、内田 毅¹、Brash Alan R.²、北川 禎三¹ (¹岡崎統合バイオ、²ヴァンダビルト大)

珊瑚由来アレンオキサイド合成酵素 (cAOS) は、過酸化脂質からアレンオキサイドを合成するヘム酵素で、H₂O₂ の分解を触媒するカタラーゼと類似のヘム近傍構造を持つものの、カタラーゼ活性を示さない。cAOS での構造機能相関、特に cAOS がカタラーゼ活性を持たない理由を理解するため、cAOS とカタラーゼのヘム近傍構造を比べると、カタラーゼ活性に必須なヘム遠位空間の His(遠位 His) に隣接したアミノ酸が、カタラーゼでは Val であるのに対し、cAOS では Thr(Thr66) であった。しかも、この Thr66 は、遠位 His と水素結合しており、その結果、遠位 His はカタラーゼと比べ、180 度反転した配向をしている。これは、cAOS での遠位 His-Thr66 間の水素結合が、cAOS でカタラーゼ活性が観測されない理由であることを示唆している。そこで、本研究では Thr66 を Val に置換した T66V 変異体を作成し、その酵素活性およびヘム近傍構造を検討することで、cAOS での構造機能相関の解明を試みた。変異に伴う機能の変化を検討するため、T66V でのアレンオキサイド合成活性を調べたところ、その速度は野生型 (WT) の約 1/7 に低下していた。一方、WT はカタラーゼ活性を示さないが、T66V では H₂O₂ と混合すると、カタラーゼ反応の中間体である Compound I の生成を伴い、H₂O₂ の消費が観測された。次に、T66V での酵素活性の変化と構造の相関を調べるため、ヘム近傍構造の変化に敏感な共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、休止状態 (Fe³⁺) で WT は 6 配位高スピンのヘムを持つのにに対し、T66V では、副成分として 5 配位高スピンの成分が観測された。これは、カタラーゼが 5 配位高スピンであることから、変異によりヘム近傍構造がカタラーゼ型に変換されたことを示唆している。つまり、cAOS とカタラーゼでは、遠位 His と隣接するアミノ酸残基間の水素結合の有無により、それぞれ固有の酵素活性を持つに至っていると推察できる。

T. Tosha, T. Uchida, A. R. Brash and T. Kitagawa : Origin of Functional Difference in Tyrosinate-ligated Homologous Enzymes, Coral Allene Oxide Synthase and Catalase

3P092

酸素の脱離に伴うヘムの構造ダイナミクス：ミオグロビンに関する研究

○村川 由佳¹、水谷 泰久^{1,2} (¹神戸大院・自然科学、²神戸大・分子フォト)

ミオグロビン (Mb) のリガンド脱着に伴うダイナミクスの研究では、測定上の困難さゆえに、リガンドとして、生理的なリガンドである酸素 (O₂) の代わりに一酸化炭素 (CO) がこれまで多く用いられてきた。しかし、Mb の本来のダイナミクスを明らかにするためには、生理的なリガンドである O₂ を用いた実験を行うことが不可欠である。我々は、これまでに O₂ 脱離に伴うピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトル測定を試みてきたが、今回、高い S/N 比のスペクトル測定に初めて成功した。

得られた Mb の O₂ 脱離と CO 脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトル、デオキシ形のスペクトルを比較した。CO 脱離の場合では、10 ps と 1 ns のヘム由来のラマンバンドにほとんど違いは見られなかったが、O₂ 脱離の場合には、 ν_1 バンドおよび ν_2 バンドにわずかながらバンド形の変化が見られた。CO 脱離では、10 ps と 1 ns の間で、 ν (Fe-His) バンドが、222 cm⁻¹ から 220 cm⁻¹ にシフトすることが既に報告されている。O₂ 脱離においても類似のシフトが観測された。また、O₂ 脱離後 1 ns のスペクトルとデオキシ形のスペクトルとの間では、ヘム由来のラマンバンドにほとんど違いはなかった。一方で、同じく O₂ を生理的なリガンドとするヘモグロビン (Hb) の場合には、リガンド脱離後 1 ns のスペクトルとデオキシ形のスペクトルとの間に差があり、O₂ と CO との間でヘムの構造緩和速度に違いが見られている。以上の実験結果は、いずれのリガンドの場合も Hb においては 1 ns でヘムの構造緩和が完了していないのに対し、Mb においては完了していることを示している。発表では、Mb のリガンド脱離後のダイナミクスをヘム周辺構造と合わせて議論する。

Y. Murakawa and Y. Mizutani : Dynamics of heme structure following dissociation of dioxygen: a study on myoglobin