3P093

リガンド脱離に伴う酸素センサータンパク質 (FixL) の構造ダイナミクス

○晝間 祐介¹、菊地 晶裕²、城 宜嗣²、水谷 泰久^{1,3} (¹神戸大院・自然科学、²理研・播磨、³神戸大・分子フォト)

FixLは根粒菌由来の酸素(O_2)センサーヘムタンパク質で、N末端側のヘムを含むセンサードメインと、C末端側のキナーゼドメインからなる。高酸素条件ではヘムは O_2 結合形になりキナーゼ不活性で、低酸素条件では O_2 解離形となりキナーゼ活性となる。FixLの機能発現機構を理解するためには、リガンドの脱着に伴ってどのような構造変化が誘起されるのかを明らかにすることが重要である。本研究では、全長タンパクおよびセンサードメインについて、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、 CO 光解離に伴うヘムの構造ダイナミクスを調べた。

全長タンパクについての CO 光解離後20ピコ秒と1000ピコ秒の時間分解スペクトルでは、デオキシ形のスペクトルに比べて、 γ バンドは数 cm^{-1} 高波数側にシフトし、 ν_8 バンドはバンド強度が弱く観測された。また、 $\delta(C_\beta C_\alpha C_\delta)$ バンドは、デオキシ形(365 cm^{-1})、 CO 結合形(386 cm^{-1})とは異なる380 cm^{-1} に観測された。センサードメインについても同じ測定を行ったところ、同様の傾向が観測された。全長タンパクについての CO 光解離後10ナノ秒の γ バンドと ν_8 バンドは、振動数、バンド強度ともデオキシ形のそれと一致したが、 $\delta(C_\beta C_\alpha C_\delta)$ バンドは依然として380 cm^{-1} であった。この結果は CO 脱離に伴いプロピオン酸基の構造変化が起こること、 CO 光解離後10ナノ秒ではプロピオン酸基の配向はデオキシ形まで緩和していないことを示している。FixLの機能発現機構を解明するためには O_2 脱離に伴うダイナミクスとの比較が重要であり、 O_2 結合形についても同様の時間分解測定を計画している。

Y.Hiruma, A.Kikuchi, Y.Shiro and Y.Mizutani : Structural dynamics of oxygen sensor protein FixL following ligand dissociation

3P094

ミトコンドリア・チトクロム bc_1 複合体の構造変化を可視化する試み

○三木 俊明¹、谷 知己²、原田 慶恵^{1,3} (¹都臨床研、²北大・電子研、³CREST, JST)

ミトコンドリアでの呼吸反応に関わるチトクロム bc_1 複合体は、ユビキノールからチトクロム c への電子伝達反応を触媒し、同時にプロトンをマトリックス側から細胞質側に能動輸送する。この bc_1 複合体は、11種のサブユニットから構成されているが、このうち鉄イオウタンパク質 (ISP) と名付けられたサブユニットの親水性ドメインは、 bc_1 複合体の電子伝達反応に伴って「首振り運動」と呼ばれるダイナミックな構造変化を起こすことが想定されている。我々は、このISPの「首振り運動」をISPに導入した蛍光色素の向きの変化として可視化すること試みている。ISPサブユニットに特異的に蛍光ラベルを導入するために、 bc_1 複合体の精製酵素標品からISPと、ISPを欠く bc_1 複合体を調製した。分離したISPとISPを欠く bc_1 複合体から、酵素活性を持つ bc_1 複合体を再構成することができる。分離したISPにアミノ基反応性の蛍光色素Cy3を反応させCy3ラベル化ISP (Cy3-ISP) を調製した。ラベル率90% (0.9 mol Cy3/mol ISP) のISPを用いた場合、90%以上の酵素活性を保持した bc_1 複合体を再構成することができた。Cy3-ISPを用いて再構成した bc_1 複合体をガラス基板上に固定し、水銀灯を光源とする落射照明蛍光顕微鏡によってCy3を1分子単位で観察した。カメラの直前に偏光ビームスプリッターを入れる事によって、Cy3の放つ蛍光を縦偏光と横偏光に分離し観察した。ISPの構造変化に伴ってCy3の向きが変化すると、その縦偏光と横偏光の明るさが変化することが予想される。現在、 bc_1 複合体の基質を加える前後、あるいは特異的阻害剤を加える前後で、ISPに導入したCy3の向きに変化が見られるかどうかを検討している。

T. Miki, T. Tani and Y. Harada : Attempt of real-time visualization of the conformational change in mitochondrial cytochrome bc_1 complex

3P095

シミュレーションによるマシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの構造研究

○長尾 秀実^{1,4}、杉山 歩¹、山本 哲徳¹、高松 佑一郎¹、福森 義宏^{2,4}、沼本 修孝^{3,5}、三木 邦夫^{3,5} (¹金沢大・院自然・数物科学、²金沢大・院自然・生命科学、³京大・院理・化学、⁴金沢大・フロンティア科学機構、⁵理研・播磨)

最近、有鬚動物マシコヒゲムシ (*Oligobranchia mashikoi*) のヘモグロビンの立体構造がX線結晶構造解析により解明され、24個のグロビン鎖からなる超分子構造をもつことが明らかとなった。この巨大ヘモグロビンはマシコヒゲムシの血液中に存在し、硫化物と酸素を同時に運ぶ。本研究では解析された超分子構造をもとに分子動力学シミュレーションによる巨大ヘモグロビンのr状態における動的構造を考察する。マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビンは4種類のグロビン鎖を1ユニットとした6量体を構成し、結晶はR32の空間群に属する。このような超分子構造中のユニット間のダイナミクスを調べることは集団運動という観点から興味深い。シミュレーションではAmber03力場を用い、水分子にはTIP3Pを用いた。また24個のヘム部位付近の力場はクラスタモデルを用いて密度汎関数計算UB3LYP/6-31G**で決定した。ヘムおよびポルフィリン環付近のラマン (赤外吸収) スペクトルを計算した。また、ペプチド鎖中のC-Hをユニットベクトルとスペクトル密度を計算し、C-H結合からオーダーパラメータ S^2 を評価しbackboneダイナミクスを調べた。発表ではbackboneダイナミクスや残基のジャンプ運動を通して超分子構造中の各ポルフィリン環集団運動の考察結果について報告する。

H. Nagao, A. Sugiyama, T. Yamamoto, Y. Takamatsu, Y. Fukumori, N. Numoto and K. Miki : Simulation of giant hemoglobin of *Oligobranchia mashikoi*

3P096

ラットヘムオキシゲナーゼ1のヘム分解反応における電子伝達経路

○右田 たい子¹、富樫 智子¹、張 旭紅²、吉田 匡² (¹山口大農、²山形大医)

ヘムオキシゲナーゼ (HO) はヘムを1当量結合し、ビリベルディン、 CO 、および遊離の鉄イオンに分解する。HOのヘム代謝には酸素分子と共に電子が必要であり、動物のHOではNADPHの還元当量がシトクロムP450還元酵素(CPR)を介してHO複合体に伝達される。シアノバクテリアでは還元型フェレドキシンが直接の電子供与体と考えられる。動物とシアノバクテリアのイソ酵素HO-1では芳香族アミノ酸が極めてよく保存されており、直接の電子供与体は異なっても、HO-1表面からヘムへの電子伝達経路は同様なのではないかと予想される。本実験では、ラットHO-1におけるCPR結合サイトからヘムへの電子伝達経路を明らかにするために、結晶構造から電子伝達に係わると予想される芳香族アミノ酸を部位特異的に置換した変異体をいくつか合成した。大腸菌で発現させた際に、野生型HO-1では内因性ヘムの分解で生じるビリベルディンのため精製後もタンパクが青緑色になるが、F207L, F178L, F169L, Y137L変異体では無色に、またY182L変異体は淡い青緑色に着色していた。これらの変異体についてアスコルビン酸およびNADPH/CPRを還元系として用いてヘム分解を観測したところ、特にY137LとF207L変異体で野生型と比較して全く異なる傾向を示した。

Fig. 1 Aromatic amino acids as candidates for the residues participating in electron transfer from CPR.

C.T.Migita, S.Togashi, X.Zhang, T.Yoshida : Path(s) of the electron transportation from CPR to heme in rat heme oxygenase-1.