

## 酸素センサータンパク質 HemAT の

### 構造変化の時間分解測定

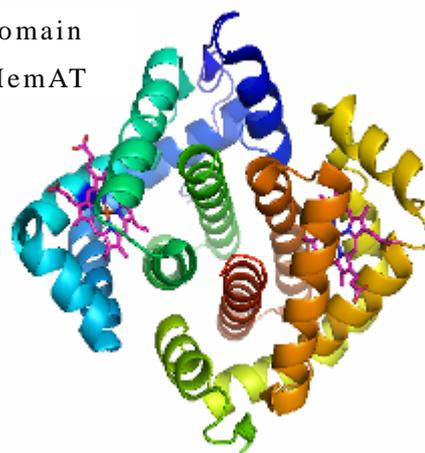
(京大院理<sup>1</sup>・分子研<sup>2</sup>・東工大院<sup>3</sup>)

栄木直子<sup>1</sup>・井上圭一<sup>3</sup>・吉村秀明<sup>2</sup>・西村宗十<sup>2</sup>・吉岡資郎<sup>3</sup>・青野重利<sup>2</sup>・寺嶋正秀<sup>1</sup>

**【序】** 気体センサータンパク質は、その生理的な重要性から、気体分子認識機構やダイナミクスが大変注目されている。例えば、HemAT は枯草菌の走気性をコントロールするセンサータンパク質として知られている。HemAT は酸素分子を認識し、さらにシグナル伝達を行う。これまで、共鳴ラマンや FTIR のような分光研究が行われてきているが、まだ構造変化に関するダイナミクスの時間分解測定の研究はほとんどない。また、

その酸素分子と他の気体分子を区別できる気体認識機構についてもまだあまり知られていない。今回、我々は過渡回折格子法(TG 法)を用いて、HemAT の溶液中でのダイナミクスについて研究した。さらに HemAT の全長のダイナミクスだけでなくセンサードメインのダイナミクスや、ヘム鉄が酸化された状態や還元された状態についても TG 法で測定した。TG 法では、その時間変化から体積変化や拡散係数変化などの時間分解測定を行う

Sensor domain  
of HemAT



ことができるため、ヘムの吸収をモニターするよりも、タンパク質部分の構造変化についての知見が得られることが期待される。

**【実験】** TG 測定では励起光として 532nm のパルス光、及びプローブ光として 840nm の連続光を用いた。試料として、全長の HemAT を溶液中(Tris-HCl, pH=8)に溶かしたものをを用いた(濃度: 430 $\mu$ M)。HemAT はセンサードメイン部分のヘリックスが中心に4つ集まり中心のようになってダイマー化して存在する。励起光によって、ヘムの Fe( )の d 電子が励起されることで、酸素との配位結合が切れる。溶液中の屈折率変化を時間分解測定することにより、酸素がヘムから離れることで起こる溶液中でのダイナミクスを TG 信号から得られる拡散係数を求めることで捉えた。

**【結果と考察】** 左図に HemAT の TG 信号を示す。マイクロ秒の時間に現れている強い減衰信号は、光励起により放出された熱エネルギーによるものである。この後に現れる、ミリ秒領域の山型の信号が、光励起により酸素分子がヘムか

ら外れたことによる信号である。格子波数を変化させた実験により、この信号の立ち上がりと減衰は、反応前の HemAT の拡散 ( $D_R=5.7\times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ) と光反応後の HemAT の拡散 ( $D_P=2.6\times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ) の信号であることがわかった。すなわち、酸素分子を光解離させることにより、拡散係数が大きく変わるような構造変化が起こっていることがわかる。また、HemAT の濃度を変化させて測定を行った結果、酸素分子の解離に伴う構造変化は濃度依存性を持たないことが分かった。

この拡散係数変化がどの部位から来ているのかを調べるために、HemAT のセンサードメインのみの TG 信号を測定した。その結果を図 2 に示す。まず、マイクロ秒の時間に現れている強い減衰信号は、光励起により放出された熱エネルギーによるものである。山型の拡散部分の成分に関しては、全長サンプルと異なり、構造変化に伴う成分が 3 成分存在することが分かった。格子波数を変化させた実験を行うことにより、その 3 成分が分子拡散によるものであることが分かり、拡散係数を決定した ( $D_{R1}=2.3\times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$   $D_{R2}=9.6\times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$   $D_P=5.1\times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ )。反応分子の拡散係数は全長サンプルとそう大きくは変わらないが、生成物の拡散係数が大きくなっていることがわかる。

また、ヘム鉄の酸化状態と、この拡散係数変化との対応を調べるために、吸収スペクトルで酸化還元状態を確認して、TG 信号を測定した。HemAT に Potassium hexacyanoferrate( )を加えてヘム鉄が酸化されると山型の信号は消え、拡散係数を変化させる構造変化は起こらないと分かった。また、HemAT に Sodium hydrosulfite を加えて還元すると山型の信号は確認でき、拡散係数を変化させる構造変化が起こっていると確認できた。これらの成分についてより詳しく知見を得るために、現在研究を進めている。

#### 【参考文献】

Shigetoshi Aono, Toshiyuki Kato, Mayumi Matsuki, Hiroshi Nakajima, Takehiro Ohta, Takeshi Uchida, and Teizo Kitagawa, *J. Biol. Chem.* 277,13528-13538(2002)  
 Eftychia Pinakoulaki, Hideaki Yoshimura, Vangelis Daskalakis, Shiro Yoshioka, Shigetoshi Aono, and Constantinos Varotsisi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103,14796-14801(2006)

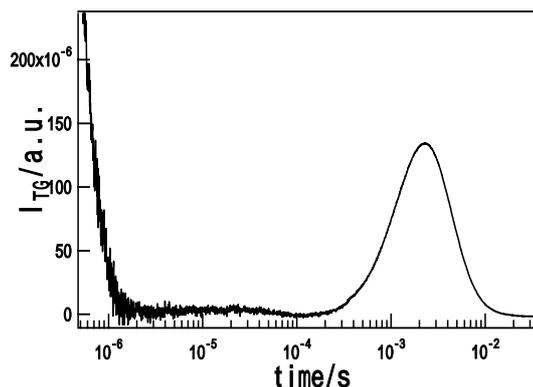


図 1 HemAT(全長)の TG 信号

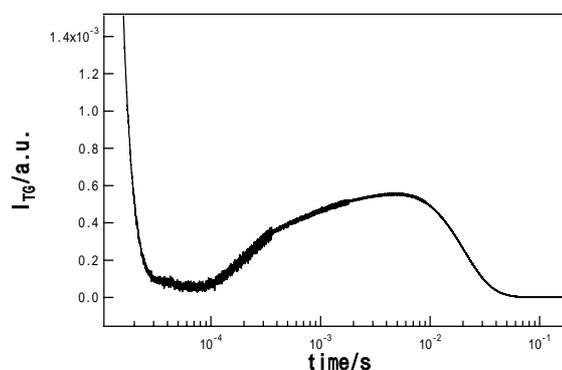


図 2 HemAT(sensor domain)の TG 信号