

3 C 1 3

酸素分子センサー蛋白, *EcDOS*, のセンシング機構の構造化学： 共鳴ラマン分光法による研究

(¹豊田理研、²King Khalid 大、³東北大多元研)

O北川禎三,¹ Samir, F. El-Mashtoly,² 清水 透³

[序] 大腸菌の Direct Oxygen Sensor 蛋白(*EcDOS*)はヘムをもつシグナル伝達蛋白で, 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-diGMP) に対して phosphodiesterase(PDE)活性をもっている[1]。N 末端側にある Fe(II)ヘムに O₂, CO, 或は NO と云った 2 原子分子が結合すると、C 末端側にある触媒部位での c-diGMP に対する PDE 活性は高くなるが[2]、高くなり方は結合する分子種によって異なる。元々この蛋白は、O₂ 依存的に cAMP に対して PDE 活性を示したので DOS という名前が付けられたのであるが[3]、cAMP には CO や NO の結合したもの、或は Fe(III)ヘムをもつものは不活性であった[4]。いずれを基質としていても、*EcDOS* は O₂, CO, 或は NO と云った、大きさの良く似た 2 原子分子を識別しているという事である。蛋白質はどのようにして 2 原子分子を識別し、それを検出したという情報をどのようにして触媒部位へ伝えているかを構造化学的に明らかにするために、我々はその可視及び紫外共鳴ラマンスペクトルを調べた。その戦略としては、活性のある野生株蛋白と、重要と思われるアミノ酸残基を一つずつ別のアミノ酸に置換した蛋白のラマンスペクトルを比較し、一方でその蛋白の活性を見るという方法をとるが、ラマンスペクトルの測定にはヘムを含有するドメイン (DOSH と略す、X 線結晶解析は DOSH の O₂ 結合形に対してのみある) を用い、活性測定には全長の蛋白を用いている事を最初にことわっておく。結果の詳細は 2 報の論文[5,6]として報告した。

[実験] *Ec* DOSH の cloning、発現系及び全長の野生株の発現、精製は文献 4 に従い、蛋白の純度は 95%以上である事を SDS-PAGE で確認した。ラマン測定用試料は更にセファデックス G25 でゲル濾過し、蛋白濃度を 100-300 μM にした。紫外共鳴ラマン散乱の励起には Ar レーザーの倍波を用いた。差ラマンスペクトル計算のために強度標準として Na₂SO₄ を 400 (229nm 励起) 或は 100 mM (244nm 励起) の濃度で加えた。UV ラマンスペクトルは Spex1269 分光器に 3600 groove/mm の回折格子をつけ、ICCD で検出した。レーザーパワーは 0.3mW で回転セルを用い、5-10 分毎に新鮮な試料に交換した。酵素活性は全長蛋白に対し、O₂ 濃度 10 ppm 以下のグローブボックス中 25 °C で熱量測定法で決めた。Biomol Green の 630nm 吸光度でリン酸を定量する方法をとった。ラマン測定及び活性測定の詳細は文献 5 に記した。

[結果と考察] 紫外共鳴ラマンスペクトルでは Trp と Tyr の側鎖モードが観測され

る。DOSHには2個の Trp (#53, #110)と4個の Tyr (#55, #110, #125, #126)がある。その帰属に当って次の部位特異的変異体を用いた ; Trp53→Phe, Asn84→Val, Tyr126→Phe, Glu93→Ile, Met95→Ala, Arg97→Ile, Arg97→Ala, Arg97→Glu, Phe113→Leu, Phe113→Thr。X線結晶解析から、His77がへムに配位し、へムビニル基の近くに Trp53 がある、へムポケットに Tyr80 と Tyr126 のある事がわかっている。へムは異なるリガンドの結合を、蛋白に異なるコンフォメーション変化を起こさせてリガンドを区別している。具体的には、Trp53はO₂結合でより疎水的環境に移るがCO結合ではより親水的環境に移る[5]。O₂及びCO結合形のPDE活性はTrp53Pheでは野生株より低い。一方、野生株にO₂或はCOが結合するとTyr126のスペクトルが大きく変わる[5]。この事からO₂或はCOが結合するとAsn84がTyr126と水素結合をつくるが、リガンド無しでは水素結合はできてない、と考えられた。Asn84ValやTyr126Phe変異体で活性が落ちるのは、その水素結合がへムのプロピオン酸側鎖とAsn84との水素結合を通してTyr126にシグナル伝達が起こる経路にあるためと思われる。

CO結合形とNO結合形に対しては、水素結合型と非水素結合型の両方が共存している事がわかった。前者に対してはArg97がへムリガンドと水素結合していた。またArg97とPhe113がへム結合リガンドと重要な相互作用をしている事がスペクトルで示され[6]、Phe113の変異はPDE活性に影響を与えた。CO結合形からCOを光解離させるとへムプロピオン酸側鎖の構造変化が観測され、Met95が光解離後過度的にCOの代りに配位する様相が、Arg97とPhe113の変異によりかなり変えられた[6]。この事は、Arg97の静電相互作用とPhe113の立体障害が、Met95とCOの競争的配位を制御している事を示唆する。これらを基に、へム側鎖プロピオン酸基と、それに繋がる水素結合が情報伝達に重要な役割を果たしているモデルを提案する。

【文献】

- 1) Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., and Gomelsky, M. *J. Bacteriol* **2005**, *187*, 4774-4781.
- 2) Takahashi, H. and Shimizu, T. *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 970-971.
- 3) Delgado-Nixon, V.M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.A., *Biochemistry*, **2000**, *39*, 2685-2691.
- 4) Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 23821-23827.
- 5) El-Mashtoly, S.F., Takahashi, H., Shimizu, T, and Kitagawa, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3557-3563.
- 6) El-Mashtoly, S.F., Nakashima, S., Tanaka, A., Shimizu, T. and Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **2008**, in press.