

ガスセンサータンパク質 HemAT の酸素脱離に伴う構造変化と機能発現

(¹ 阪大院理、² 岡崎統合バイオ) ○吉田祐¹・石川春人²・青野重利²・水谷泰久¹

【序】

HemAT は、バクテリアなどの走化性シグナル伝達系において機能する、酸素センサーヘムタンパク質である。タンパク質内のヘムに酸素が結合/脱離することにより、タンパク質が構造変化し、その情報が走化性制御系へと伝達される。センシング機構の解明のためには、センサー部位であるヘムおよびその周辺の、酸素脱離に伴う構造変化を明らかにすることが重要である。そこで本研究では、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、これらの構造変化を調べた。

【実験】

HemAT は、ヘムを含むセンサードメインと、情報を次のシグナル伝達系へと受け渡すシグナリングドメインによって構成されており、本研究ではセンサードメインを試料に用いた。タンパク質は大腸菌中で発現した後、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによって精製を行った。

ナノ秒時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、ポンプ・プローブ法によって行った（ポンプ光波長 532 nm、プローブ光波長 436 nm）。酸素(O₂)結合形の試料は精製直後のものを用い、一酸化炭素(CO)結合形は、ヒドロサルファイドナトリウムで還元した後、CO 雰囲気下におくことで調製した。

【結果】

O₂ 脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトルでは、ヘム鉄-ヒスチジン伸縮振動[$\nu(\text{Fe-His})$]に由来するラマンバンドを観測した (図 1)。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは、O₂ 脱離後 10 ns から 100 μs にかけて 225 cm^{-1} 付近に観測され、これはデオキシ形（平衡状態においてリガンドが結合していないもの）の値 (227 cm^{-1}) よりも小さい値を示した。このことは、ヘム周辺構造の緩和に 100 μs 以上要することを示している。

一方、同様の時間分解測定を、CO をリガンドとして用いて行ったところ、上記のような波数シフトは観測されず、10 ns のスペクトルにおいて、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの波数はデオキシ形の値と一致した(図 2)。これは、CO 脱離においては、ヘム周辺の構造緩和が 10 ns 以内に完了していることを意味する。ピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルの測定から、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの波数は、CO 脱離後 1 ns でデオキシ形の値に一致することがわかっている¹。上記の結果はこの報告と矛盾しない。

これまでに、光解離の量子収率の低さや自動酸化の影響などの理由から、O₂ 脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトル測定の成功例はなかった。本研究では、その測定に初めて成功し、酸素脱離後のヘム周辺構造変化を検出することができた。

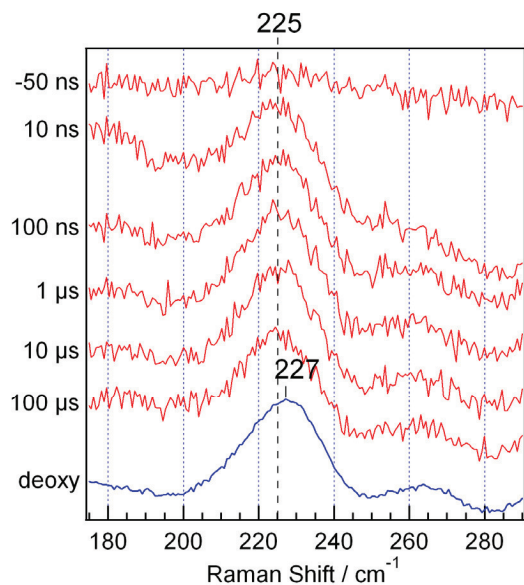


図1. O₂脱離に伴う時間分解
共鳴ラマンスペクトル

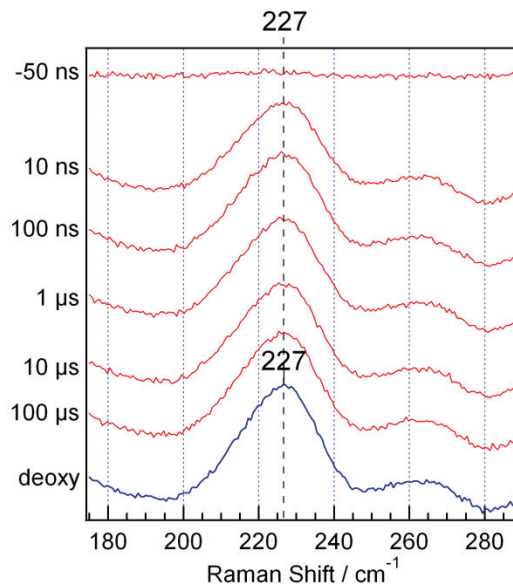


図2. CO脱離に伴う時間分解
共鳴ラマンスペクトル

【考察】

HemAT について、現在得られている結晶構造は、CN 結合形およびデオキシ形の二つのみである。これらの間では、ヒスチジンの側鎖であるイミダゾール環の面の配向が大きく異なっていることが報告されている²。一方、過去のミオグロビンなどの研究から、 $\nu(\text{Fe-His})$ 波数が、ヒスチジン側鎖面の向きに依存することが知られている³。これらのことから、タンパク質は、リガンドの脱着に伴って、このヒスチジン側鎖の面の回転を伴う構造変化を起こすことが示唆される。また、O₂とCO脱離とで波数シフトに違いが見られたことから、この動きがリガンド識別機構に関与している可能性も考えられる。

$\nu(\text{Fe-His})$ 波数シフトは、ヒスチジンがFヘリックスにあることから、Fヘリックスの構造変化を反映すると考えられる。一方で、一般的な走化性タンパク質において、GヘリックスとHヘリックスの動きが、タンパク質の機能発現に関与していることが知られている⁴。これらのことから、O₂の結合/脱離に伴って、ヘムからFヘリックスを介してGヘリックスへと構造変化が伝わり、さらにシグナリングドメインへとシグナル伝達が行われる、というモデルを考えることができる。

【参考文献】

1. Yoshimura, H., Yoshioka, S., Mizutani, Y., Aono, S. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 1053-1057.
2. Zhang, W., Olson, J. S., Phillips, G. N., Jr. (2005) *Biophys. J.* **88**, 2801-2814.
3. Bangcharoenpaupong, O., Schomacker, K. T., Champion, P. M., (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 5688-5698.
4. Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y., Koshland, D. E. Jr. (1999) *Science* **285**, 1751-1754.