

# 1B07

## ガスセンサータンパク質 CooA の一酸化炭素脱離に伴う構造ダイナミクスの観測

(阪大院理<sup>1</sup>, 岡崎総合バイオ<sup>2</sup>) 大友章裕<sup>1</sup>, 石川春人<sup>1</sup>, 水野操<sup>1</sup>, 青野重利<sup>2</sup>, 水谷泰久<sup>1</sup>

### Protein Dynamics of CooA upon Carbon Monoxide Dissociation

(Osaka Univ.<sup>1</sup>, Okazaki Institute<sup>2</sup>) Akihiro Otomo<sup>1</sup>, Haruto Ishikawa<sup>1</sup>, Misao Mizuno<sup>1</sup>, Shigetoshi Aono<sup>2</sup>, Yasuhisa Mizutani<sup>1</sup>

【序】CooAは光合成細菌に含まれるガスセンサータンパク質であり、一酸化炭素(CO)を感知し、COの代謝に関与する酵素群の転写を制御している。図1にCooAの、不活性形である還元形の結晶構造(a)と、反応スキーム(b)を示す。CooAは2つのサブユニットから成るホモダイマーである。各サブユニットはヘムを含み、COを感知するセンサードメインと、DNA結合ドメインで構成されている。ヘムに結合したCOが近傍のPro残基と置換することで、CooA全体の構造変化が誘起され、DNAとの親和性が変化すると考えられている。しかし、その構造変化の機構は明らかになっていない。本研究では、時間分解共鳴ラマン分光法によって、ヘム-近位ヒスチジン(His77)部位と、Cヘリックスに存在するTrp残基(Trp110)の構造変化の関連を調べた。

【実験】CooAは大腸菌中で発現し、陰イオン交換カラムを用いて精製した。この試料に還元剤としてヒドロサルファイトナトリウムを加え、CO雰囲気下にする事で、CO結合形CooA(CO-CooA)を得た。試料のバッファーには、pH 8.0の50 mM Tris-HClを用いた。紫外共鳴ラマンスペクトルの測定試料には、内部強度標準として、硫酸イオンを180 mM加えた。時間分解共鳴ラマンスペクトルの測定は、ポンププローブ法によって行った。COの光解離を引き起こすポンプ光には、波長532 nmのパルス光(パルス幅20 ns)を用いた。ヘムに由来するスペクトルの観測には波長436 nmのプローブ光(パルス幅30 ns)を用い、Trp残基のスペクトルの観測には波長233 nmのプローブ光(パルス幅20 ns)を用いた。

【結果】図2にCO-CooAの時間分解可視共鳴ラマンスペクトルを示す。図1(b)に示すように、CO-CooAの光解離後、ヘムにはCOの再結合もしくはPro残基の配位が生じる。そのため、各遅延時間におけるスペクトルは、それら再結合およびPro残基が配位した成分の寄与を引いた、差スペクトルとして示している。215 cm<sup>-1</sup>に5配位のヘム由来の振動バンドである、鉄-ヒスチジン伸縮振動[v(Fe-His)]バンドが観測されたため、時間分解スペクトルは解離形CooAの寄与を示していることがわかる。この測定から、CO脱離後10 nsから1 μsの間に、v(Fe-His)バンドは波数シフトや強度変化をほとんど示さないことがわかった。過去の研究で、

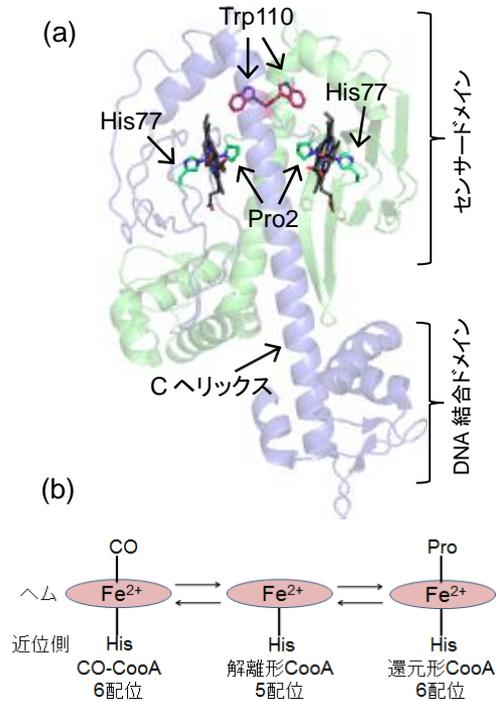


図 1. (a) 還元形 CooA の結晶構造。(b) CooA の CO 脱離に伴うヘムと軸配位子の変化。

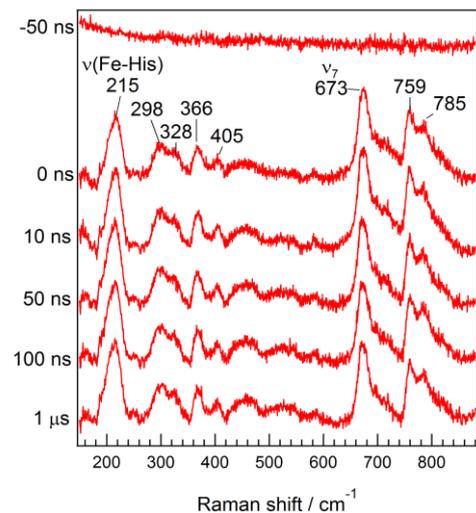


図 2. CO-CooA の時間分解可視共鳴ラマンスペクトル。解離形 CooA のスペクトルは、CO の再結合および、Pro 残基の配位による寄与を差し引くことで算出した。

ピコ秒領域の時間分解共鳴ラマンスペクトルは報告されているが、COの光解離後、数百ピコ秒以内に約90%が再結合してしまうため、ナノ秒以降の解離形の構造は不明であった<sup>1</sup>。10 nsでの $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数はピコ秒領域で観測された振動数と一致することから、CO脱離後、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は1  $\mu\text{s}$ に至るまで変化していないことが明らかになった。

図3に芳香族アミノ酸水溶液、CO-CooAおよび還元形CooAの紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。(a)、(b)のスペクトルと(c)、(d)のスペクトルとの比較からわかるように、CO-CooAと還元形CooAには、Trp残基やTyr残基由来のラマンバンドが観測された。また、(e)はCO-CooAと還元形CooAの差スペクトルである。W3, W16, W18に強度増大が、Y8aバンド強度減少がみられ、CO-CooAと還元形CooAとの間では、Trp残基およびTyr残基の環境が異なることがわかる。そこで、CO-CooAと解離形CooAとの間で、Trp残基がどの時間帯で変化するかを調べるために時間分解測定を行った。その結果を図4に示す。時間分解スペクトルでは、100 nsから100  $\mu\text{s}$ の間で、Trp残基のスペクトル変化はみられず、Trp110の環境変化はこの時間領域では起きていないことがわかった。

【考察】過去の研究と合わせて、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数はピコ秒領域から1  $\mu\text{s}$ まで変化していないことがわかった。 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は、ヘム周辺の構造変化を敏感に反映することが知られている。したがって、ヘム-His77部位の構造変化は、ピコ秒領域で完了し、その後1  $\mu\text{s}$ に至るまで構造変化は起きないことが明らかになった。

CooAの各サブユニットにはTrp残基は1つ存在し、センサードメインとDNA結合ドメイン間のCヘリックスに位置する。過去の研究から、還元形CooAとCO-CooAでは、Trp残基のラマンバンドに変化があることがわかっており<sup>2</sup>、プローブ波長が異なる本実験でも同様の変化が再現された。したがって、CO脱離後、還元形に至る過程のどこかの段階でTrp残基周辺の構造が変化すると考えられる。この変化は、Trp110の位置から、CO脱離後ヘム周辺に起きる構造変化が、DNA結合部位まで伝播する中間状態の変化であると推測される。今回の時間分解測定において、100  $\mu\text{s}$ までにTrpのバンドがみられなかったことから、Trp110近傍の構造変化は、ヘム構造がCO-CooAから解離形に変わったことによって起きているのではなく、解離形から還元形に変わったことによって起きる可能性が高いと考えられる。

【参考文献】1. Uchida, T., Ishikawa, H., Ishimori, K., Morishima, I., Nakajima, H., Aono, S., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2000) *Biochemistry* **39**, 12747-12752  
2. Kubo, M., Inagaki, S., Yoshioka, S., Uchida, T., Mizutani, Y., Aono, S., and Kitagawa, T. (2006) *J. Biol. Chem* **281**, 11271-11278

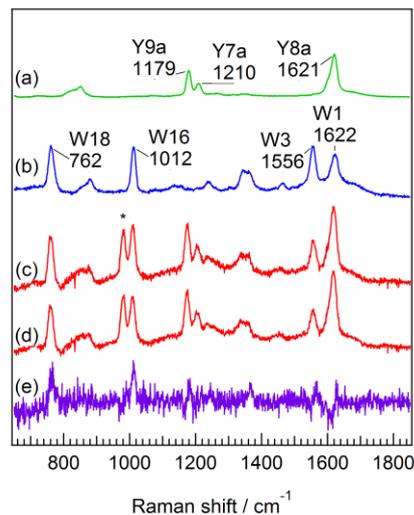


図3. 芳香族アミノ酸水溶液およびCooAの紫外共鳴ラマンスペクトル。(プローブ光233 nm, \*は内部強度標準の硫酸イオンによるバンド)  
(a) Tyr水溶液 (b) Trp水溶液 (c) CO-CooA (d) 還元形CooA (e) [(c)-(d)] × 5

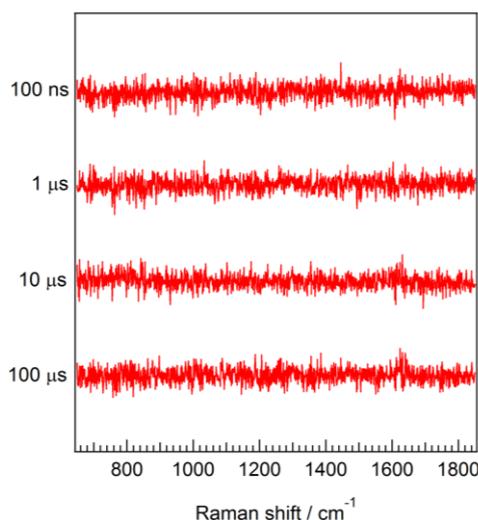


図4. CO-CooAの時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。CO-CooAと解離形CooAとの間の構造変化の寄与を示した差スペクトルである。