

酸素分子センサー蛋白質, *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

北 川 禎 三*

Structural Chemistry of Sensing Mechanism of Environment by Oxygen Sensor Protein, *EcDOS*: Resonance Raman Study

Teizo KITAGAWA

The direct oxygen sensor protein isolated from *E. coli* (*EcDOS*) is a heme-based signal transducer protein responsible for phosphodiesterase (PDE) activity. Binding of O₂, CO, or NO to a reduced heme significantly enhances the PDE activity towards 3', 5'-cyclic diguanylic acid. We report stationary and time-resolved resonance Raman (RR) spectra of the wild-type and various mutants of Trp (Trp110Ile, Trp53Phe), Tyr (Tyr55Phe, Tyr80Phe, Tyr125Phe, and Tyr126Phe) and other important residues (Glu93Ile and Met95Ala, Arg97Ile, Arg97Ala, Arg97Glu, Phe113Leu, and Phe113Thr) of the heme-containing PAS domain of *EcDOS*. The UVRR results show that heme discriminates different ligands, resulting in altered conformations in the protein moiety. Specifically, the environment around Trp53 that contacts the 2-vinyl group of heme, is changed to more hydrophobic by O₂ binding, whereas to more hydrophilic by CO-binding. In addition, the PDE activity of the O₂- and CO-bound forms for the Trp53 Phe mutant is significantly decreased compared with that of the wild type (WT). The time-resolved resonance Raman results revealed profound structural changes in the heme vicinities upon dissociation of CO and their dynamics. The mutation of Arg97 and Phe113 significantly influenced the transient rebinding of Met95 to the heme upon photodissociation of CO. This suggests that the electrostatic interaction of Arg97 and steric interaction of Phe113 are crucial for regulating the competitive recombination of Met95 and CO to the heme. On the basis of these results, we propose a model for the roles of the heme propionates in communicating the heme structural changes to the protein moiety.

1. 序 文

生物は生きるために環境に適応していかなければならない。そのためには環境変化を鋭敏に検出し、それに対応する生理作用を引き起こす必要がある。生理作用の元になる分子レベルリスポンスは、DNA に指令を与えて蛋白合成を始めた、酵素反応速度を変えて活性分子の数を変えたり、運動の仕方を変える情報伝達系のスイッチを ON/OFF したりするものである。環境因子としては色々あるが、本研究では酸素 (O₂), 一酸化炭素 (CO), 一酸化窒素 (NO) 等の 2 原子分子を特異的に検出して生理作用を生み出すものに注目した。それらを総称してガスセンサー蛋白質と呼ぶ。このタイプの蛋白は最近遺伝子解析を通して見つかったもので、一般にセンサー部、情報伝

達部、効果発現部の 3 つのドメインからなる。センサー部に鉄プロトポルフィリン (ヘムと呼ぶ) をもっていて、ヘム鉄に 2 原子分子が結合するところは共通である。しかし、生理作用はターゲット分子が結合した時にしか現れない。本研究では、酸素センサーとして機能しているとして名前のつけられた DOS 蛋白 (Direct Oxygen Sensor) について詳しく調べた。

大腸菌の DOS 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。リガンドフリーの Fe(II) 状態と比較して、O₂, や CO が結合すると活性は数

2009 年 2 月 11 日 受理

* 豊田理化学研究所フェロー

倍高くなるが, Fe(III) 状態にすると Fe(II) リガンドフリーと同程度になる²⁾. 元々この蛋白が発見されたときは, 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⁾. cAMP と c-diGMP のいずれを基質としても, *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変異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 (~147 残基, DOSH と略す) 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. X 線結晶解析は DOSH に対してのみ報告されており⁷⁾, その O₂ 結合形の構造を図 1 に示す.

2. 実 験

試料準備

全長の *EcDOS* 及び *EcDOSH* の cloning, 発現系及び全長の野生株の発現, 精製は文献⁴⁾⁸⁾ に従った. 部位特異的アミノ酸置換は, PCR 法に基づき Quik-Change™ キット (Stratagene) を用いた. 蛋白の純度は 95% 以上である事を SDS-PAGE で確認した. *EcDOSH* のラマン測定用試料は, 更に pH 7.5 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡にしたセファデックス G75 カラムでゲル濾過し, 蛋白

濃度を 100–300 μM にした. Fe(III) 形 *EcDOSH* サンプルは, 精製蛋白を過剰のフェリシアンカリで酸化した後, G-25 カラムでフェリシアンカリを取り除いた. Fe(II) 形サンプルは, 精製した蛋白に窒素雰囲気下で微量のナトリウムジチオナイトを加えた (最終濃度 0.5 mM). NO 錯体は Fe(II) *EcDOSH* を NO 飽和緩衝液中でインキュベートして得た.

ラマンスペクトル測定

EcDOSH の共鳴ラマンスペクトルは, 液体窒素冷却の CCD 検出器 (Spec10: 400BLN, Roper Scientific) 付きのシングル分光器 (SPEX750M, Jobin Yvon) で測定した. 静的スペクトルの測定にはクリプトンレーザーの 413.1 nm 線を用い, レーザーパワーは, 酸化形と NO 結合形には 1 mW, CO 結合形には 0.1 mW とした. ラマンシフトはインデン, アセトン, 及びフェロシアンカリ水溶液を標準として波数校正した. シャープなラマンバンドの波数精度は ±1 cm⁻¹ である.

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, 分光器の詳細は別に述べた⁹⁾. 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 μM (229 nm 励起) 或は 100 μM (244 nm 励起) の濃度で加えた. UV ラマンスペクトルは Spex 1269 分光器に 3600 groove/mm の回折格子をつけ, ICCD (Princeton Instruments, mode ICCD-1024MG-E/I) で検出した. スペクトル分解能は 229 nm 励起で 7.8 cm⁻¹, 244 nm 励起で 6.9 cm⁻¹, レーザーパワーは 0.3 mW, 試料は回転セルに入れ, 5–10 分毎に新鮮な試料に交換した. 1 つのスペクトル当たりの積算時間は約 1 時間である. 波数校正にはシクロヘキサン, トリクロロエチレン, トルエン, 1, 2 ジクロロエタンを用いた. 時間分解ラマンスペクトルの測定には, 濃度 200 μM の酸化形試料約 100 μl を

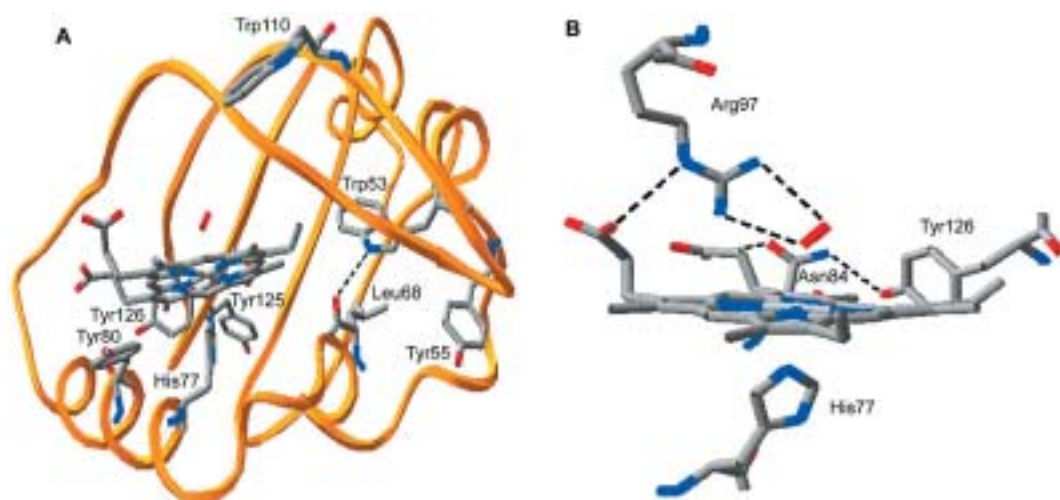


図 1. X-ray structure of the O₂-bound *EcDOSH* protein (PDB ID: 1 S 66; ref. 18). The heme and Trp, Tyr, Leu68, and His77 residues are shown in Fig. 1A. Hydrogen bond networks around iron-bound O₂ and heme propionates of *EcDOSH* are displayed in Fig. 1B.

密閉型ラマン回転セルに入れ, セル内を 0.01 mmHg に減圧した後 CO ガスを導入して 1 気圧にする操作を数回繰り返した. 最後に少量の脱ガスしたジチオナイト溶液を, 最終濃度 0.5 mM になるように添加した.

酵素活性

酵素活性は全長蛋白質に対し, O_2 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 の吸光度 (630 nm) でリン酸を定量する方法を採用した. ラマン測定及び活性測定の詳細は文献 5 に記した.

3. 結果と考察

3.1. リガンド結合による蛋白構造変化

229 nm 励起の *DOSH* WT の紫外共鳴ラマン生スペクトルと, (リガンドフリー形)–(リガンド結合形) の差スペクトルを図 2 に示す. WT の生スペクトル (a) はトリプトファン (Trp) とチロシン (Tyr) のバンドが主である. この蛋白質には Trp は 2 個 (#53 と 110), Tyr は 4 個 (#55, 80, 125, 126) 含まれる. スペクトル (a) では, それぞれのバンドを W と Y でマークし, それに続けてモード番号を書いた. それらの振動モードは既に報告さ

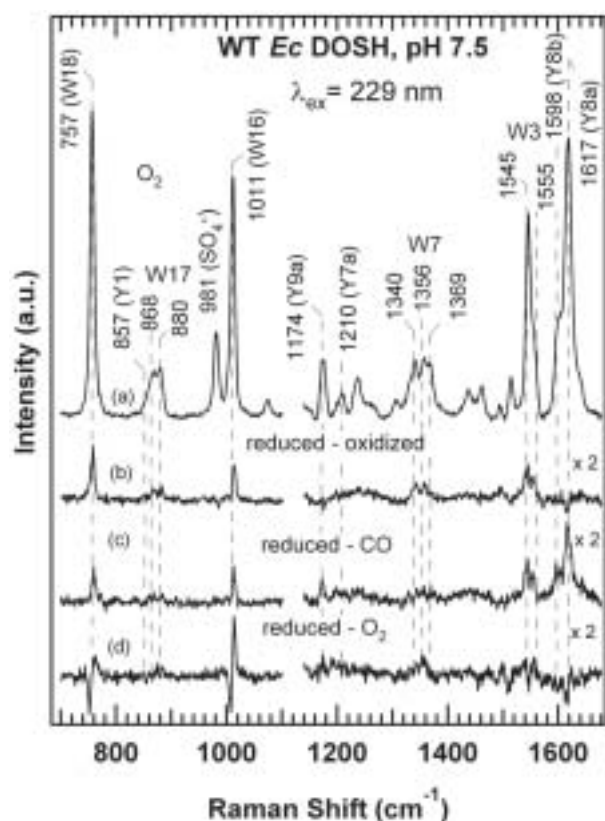


図 2. The 229-nm excited UVRR spectra of WT *EcDOS*. Shown are the raw spectrum for the O_2 -bound form of WT (a) and the following difference spectra for WT: (b) reduced-oxidized, (c) reduced-CO, and, (d) reduced- O_2 .

れている¹⁰. リガンド結合によるスペクトル変化は非常に小さいので, 差スペクトルでそれを表してあるが, 差スペクトル計算は, 強度の内部標準として加えた SO_4^{2-} のバンド (981 cm^{-1}) がゼロになるように計算した. 還元形と酸化形の差スペクトル (b) には, ピークが 757 (W18), $868/880$ (W17), 1011 (W16), $1340/1356$ (W7), 及び $1545/1555$ (W3) cm^{-1} に現れる. Trp のバンド強度が還元型で強い事を意味している. CO 結合形 (c) のスペクトルでは, それらの他に 1174 (Y9a), 1598 (Y8b), 1617 cm^{-1} (Y8a) にも正ピークを示し, CO 結合により Tyr の環境変化がある事を示す. 一方, O_2 結合形 (d) では, $752/763$ と $1006/1014\text{ cm}^{-1}$ に微分型にピークが現れ, W18 と W16 が振動数シフトを起こしている. このように, CO と O_2 では蛋白質に異なる構造変化を引き起こす事が明らかになった.

3.2. 変異体を用いたスペクトルの帰属

図 3 は WT(a), W110I(b) (#110Trp をイソロイシンに置換した部位特異的変異体をこのように表す) 及び W53F(c) の O_2 結合形 *DOSH* の生スペクトル (a-c) と,

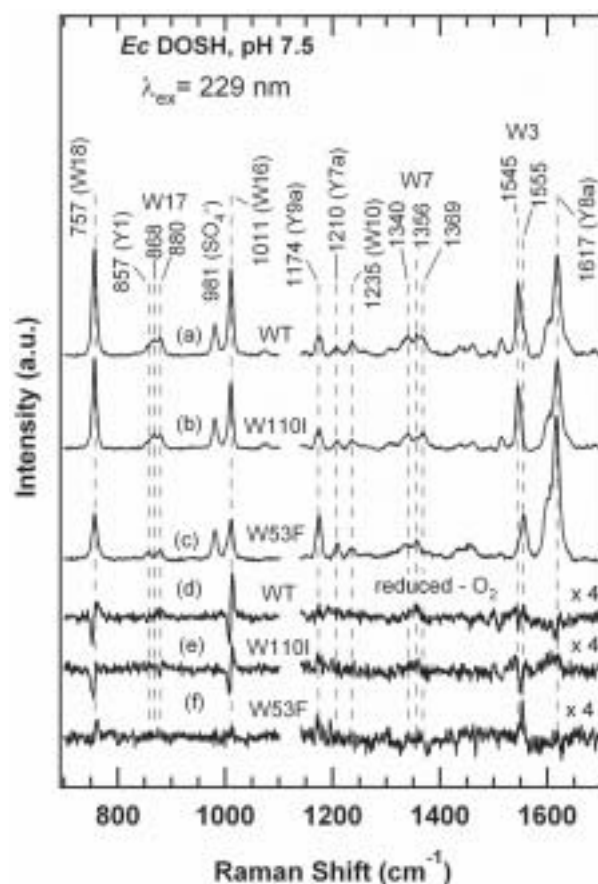


図 3. The 229-nm excited UVRR spectra of WT and Trp mutants of *EcDOS*. Shown are the raw spectra for the O_2 -bound form of WT (a), W110I (b), and W53F (c) and the reduced- O_2 difference spectra for WT (d), W110I (e), and W53F (f) mutants.

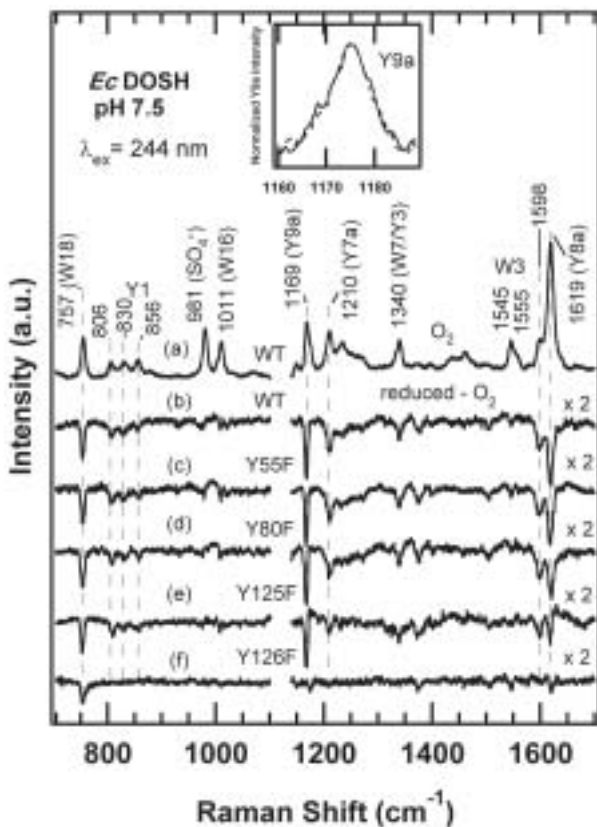


図 4. The 244-nm excited UVRR spectra of WT and Tyr mutants of *EcDOS*. Shown are the raw spectrum of O_2 -bound WT (a), and the reduced- O_2 difference spectra for WT (b), Y55F (c), Y80F (d), Y125F (e), and Y126F (f). The inset shows the enlarged raw spectra of the Y9a mode in the intensity normalized spectra. The spectra of reduced (solid line) and O_2 -bound forms (dotted line) of Y126F mutant are overlaid.

それらの (リガンドフリー)–(O_2 結合形) の差スペクトル (d-f) を示す. W110I と W53F のスペクトルはそれぞれ Trp53 と Trp110 のスペクトルである. W17 バンドは Trp のインドール環の水素結合を反映するが¹⁰, WT と W110I は 868 と 880 cm^{-1} に 2 本のバンドを与えるのに, W53F は 1 本しか与えない. 868 cm^{-1} のバンドは強く水素結合した Trp に由来し, 880 cm^{-1} は水素結合してない Trp から生じる事が経験的にわかっている. この結果は, Trp53 は水素結合したものとしてないものの 2 種があるが, Trp110 は水素結合してないもの 1 種である事を示す.

W7 バンドは Fermi doublet と呼ばれ, 普通の蛋白では $\sim 1360/\sim 1340\text{ cm}^{-1}$ に 2 本のバンドが観測される. しかし WT 形は余分に 1369 cm^{-1} にもバンドを与えた. 変異体のスペクトルから, Trp 53 が 1369 cm^{-1} に異常なバンドを与えるが, Trp110 は 1339 と 1357 cm^{-1} に通常のダブルットを与えた. そのような高い振動数に W7 バンドを与える蛋白についてこれまでの報告を調べて

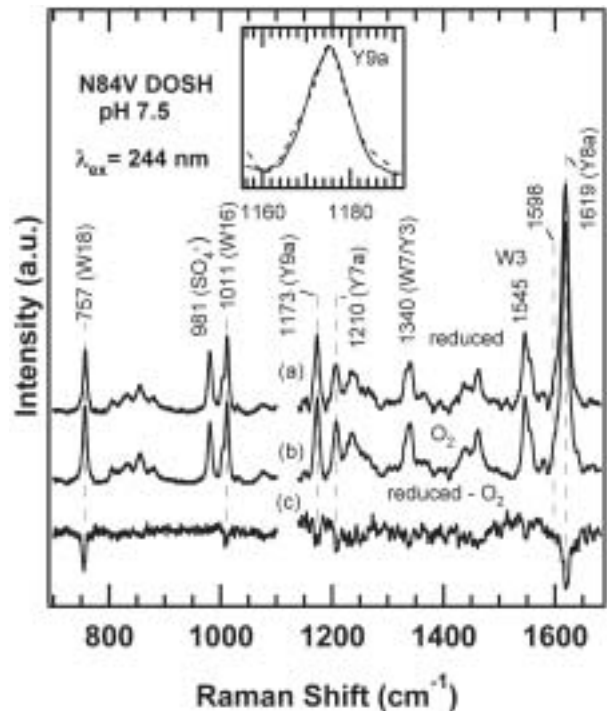


図 5. The 244-nm excited UVRR spectra of N84V mutant of *EcDOS*. Shown are the raw spectra of the reduced (a) and O_2 -bound (b) forms of N84V mutant and the reduced - O_2 difference spectrum (c) of N84V mutant. The inset shows the enlarged raw spectra of the Y9a mode in the intensity normalized spectra. The reduced (solid line) and O_2 -bound forms (broken line) of N84V mutant are overlaid.

みると, バクテリオロドプシンただ一つに見つかり, それが Trp182 に由来して, その Trp182 が非常に疎水環境に置かれている為に, そのような高い振動数 (1370 , 1357 , 1339 cm^{-1}) にこのピークを与えたと説明されている¹². したがって, *EcDOS* の Trp53 は非常に hydrophobic な環境に置かれているものがあると考えられる. 図 1 の構造を見ると, Trp53 はヘムの 2-ビニル基の近くにあり, ビニル基の構造変化が起ると, Trp53 の環境が変わると思われる. 実際可視光励起の共鳴ラマンスペクトルで 2-ビニル基の変角振動が $\sim 410\text{ cm}^{-1}$ に見られるが, そのバンド形は O_2 の脱着により変化し, その変化は W53F 変異で影響を受けた. また, Trp53 は検出ドメイン表面にある Glu59-Lys104 の塩橋の近くにあり, その塩橋が一般のシグナル伝達蛋白に重要な役割を果たしていると云われている.

励起波長を少し長波長シフトして 244 nm にすると Tyr のバンドが強くなる. 図 4 に O_2 結合形 WT の生スペクトル (a) と WT 並びに Tyr 変異体の (リガンドフリー)–(O_2 結合形) の差スペクトルを示す. スペクトル (b) では, 負ピークが 1169 , 1210 , 1545 , 1598 cm^{-1} に現れ, それらは Y9a, Y7a, W3, Y8b に帰属される. すなわち Tyr のラマンバンドの強度は O_2 結合により強くな

表 1. Comparison of the PDE activities for WT and Mutant *Ec DOS*

Mutation	Activity*			
	Fe(III)	Fe(II)	Fe(II)-O ₂	Fe(II)-CO
WT	4.9	4.3	19.2	18.5
W53F	3.7	4.5	6.8	6.6
N84V	10.1	6.7	6.2	9.9
Y126F	2.7	3.6	ND#	9.6

* In terms of nmol phosphate/nmol DOS/min. The activities were calculated from the average slope of the linear region of the turnover vs. time curves. Each curve included at least three points and gave an $R^2 > 0.90$.

Not determined, because Y126F mutant was unstable under the reaction conditions.

る。どの Tyr が強度変化を示したかを明らかにする為に 4 個の Tyr (#55, #110, #125, #126) を順次置換して、同種の測定をした。その結果をスペクトル (c)-(f) に示す。Y55F(c), Y80F(d), Y125F(e) は WT(b) とよく似たパターンを示すが、Y126F(f) はそれらと違って Y9a や Y7a の負ピークを与えない。此の事は、スペクトル (b)~(e) で強い負ピークを与えていたものは I_B ストランドに含まれる Tyr126 である事を意味する。

3.3. 情報伝達経路

O₂ の結合により Tyr126 が強い水素結合を作る結果ラマン散乱の強度増を起こしたと思われるが、その水素結合相手を同定する為に、可能性のある残基を変異させた。図 5 に、F ヘリックスのアスパラギン 84(Asn84) をバリン (Val) に置換した DOSH の 244 nm 励起のリガンドフリー形 (a) と O₂ 結合形の生ラマンスペクトル (b) とその差スペクトル (c=a-b) を示す。図 4 に見られた Y9a と Y7a の強い負ピークは見られなくなっている。つまり Asn84 が無ければ、O₂ 結合による Tyr126 の強い水素結合はできない事を意味している。図 1(B) に示した X 線結晶解析の結果を見ると、Asn84 は片側でヘム側鎖プロピオン酸基のカルボキシルと水素結合し、もう一方で Tyr126 の水酸基と水素結合している。従って、Asn 84 が無ければ、Tyr126 の水素結合は存在しない事になる。ヘムに O₂ が結合するとヘム側鎖のプロピオン酸基の配向が変り、Asn84 との水素結合を形成する。同時に Asn84 は Tyr126 と水素結合を作り、ヘム鉄に O₂ の結合した事を知って、蛋白の他の構造変化を誘起していく、という蛋白内の情報伝達の道筋が構造化学的に明らかになった。

3.4. 変異体の酵素活性

このように、*EcDOSH* の紫外共鳴ラマンの実験から、Trp53, Asn84, Tyr126 が酸素脱着により大きな環境変化を受ける事が明らかになったが、それらのヘム近傍の構造変化が C 末端での酵素活性に本当に関係しているかどうかを調べるために、全長の W53F, N84V, Y126

F 変異体蛋白を作り、嫌気条件下で c-di-GMP に対する PDE 活性を調べた。その結果⁹⁾を表 1 に示す。Fe(II) の状態に O₂ や CO が結合すると活性は数倍高くなる。しかし、W53V, N84V, Y126F 変異体では O₂ や CO の結合により PDE 活性はほとんど変わらない。そしてそれら変異体の Fe(II) および Fe(III) 状態の活性は WT のそれとあまり変わらないことは、C 末端側の触媒部は、検出部の指令とは無関係にその程度の活性を常に持っている事を意味している。

3.5. 構造変化のダイナミクス

ところで、図 1 に示した構造はヘムに O₂ の結合したもので、それではヘムに結合した O₂ と Arg97 が水素結合している。しかしリガンドフリーの状態では、Arg97 は蛋白の外側に向いていて、Met95 の S 原子が鉄に結合している⁷⁾。従ってリガンド結合は蛋白に大きな構造変化をもたらす事になるが、そのダイナミクスを調べるために、リガンド結合状態からリガンドフリー状態に移っていく過程を時間分解ラマン分光法で追跡した。Fe-CO 結合は、レーザー照射でフェムト秒オーダーで切断される事がわかっているので、リガンドとして CO を用い、Fe-CO 結合をレーザー光で切断した時を時刻ゼロとして、その t 秒後のスペクトルを測定して、刻々と変わっていく構造を具体的に語る事を狙う。その変化の様子が、要となる残基の置換によりどのように変わるかを見るために、変異体 (Glu93→Ile, Met95→Ala, Arg97→Ile, Arg97→Ala, Arg97→Glu, Phe113→Leu, Phe113→Thr) についても同じ測定をした。

図 6 に実測スペクトルの 1 例として、WT *EcDOSH* の結果を示す。A は高振動数側、B は低振動数側のスペクトルで、1 番上 (a) と 1 番下のスペクトル (l) はそれぞれ CO 結合形とリガンドフリーの普通に測定したスペクトルである。他のスペクトルは、2 本のレーザー光を用い、最初に入れる光 (ポンプ光, 532.0 nm) で Fe-CO 結合を光切断し、それより Δt_d 秒後にもう 1 本のレーザー光 (プローブ光, 435.7 nm) を入れてラマンスペクトルを測

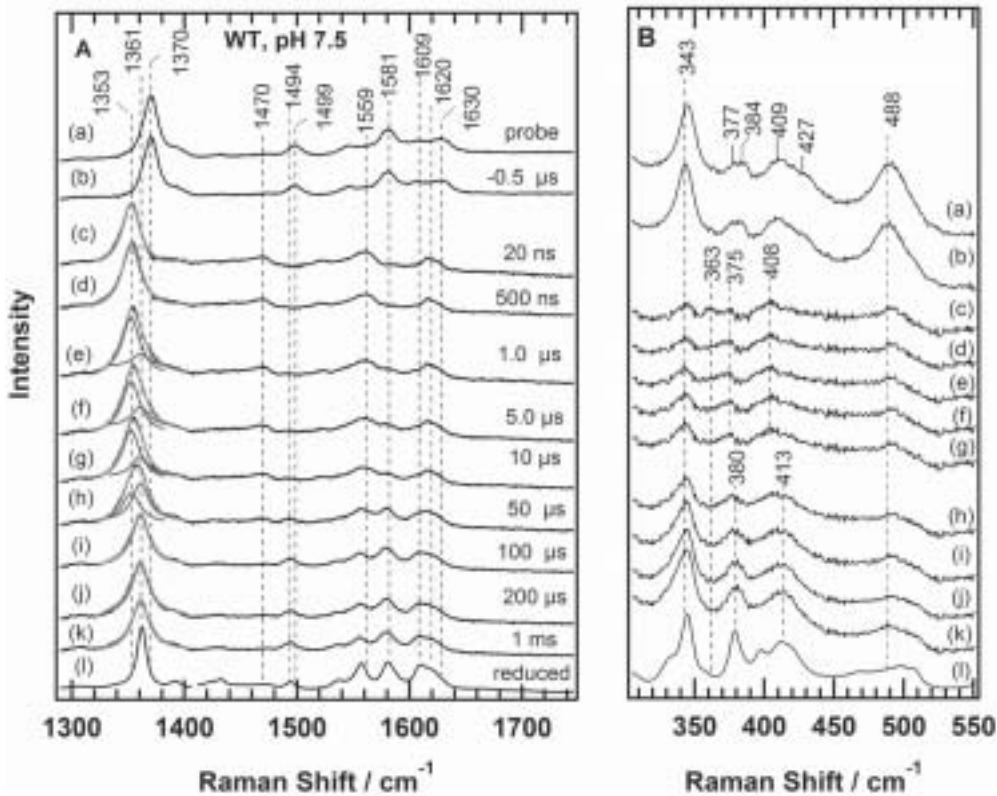


図 6. TR³ spectra of photodissociated WT *EcDOSH* in the 1290–1745 cm⁻¹ (A) and 300–550 cm⁻¹ (B) regions. The delay times (Δt_d) of the probe pulse from the pump pulse are specified at the right side of panel A; in both panels $\Delta t_d = -0.5$ (b), 0.02 (c), 0.5 (d), 1.0 (e), 5.0 (f), 10 (g), 50 (h), 100 (i), 200 (j), and 1000 (k) μ s, whereas spectra (a) and (l) denote the stationary spectra for equilibrium CO-bound and reduced forms, respectively. The sample concentration was 200 μ M in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The ν_4 frequency is fitted with the minimum number of Gaussian functions.

表 2. Raman frequencies of porphyrin skeletal and peripheral group modes, coordination states of heme iron, and delay times after photodissociation of CO for WT *EcDOSH*

WT	ν_1 (cm ⁻¹)	ν_3 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	$\delta(C_\beta C_c C_d)$ (cm ⁻¹)	$\delta(C_\beta C_a C_b)$ (cm ⁻¹)	Coordination	Delay time (Δt_d) (μ s)
reduced	1361	1494	1581	380	413	6c-1s (Met95)	
CO	1370	1499	1581	377/384	409/427	6c-1s (CO)	
Transient	1353	1470	1559	363	408	5c-hs	0.02
	1353	1470	1559	375	408	5c-hs	1.0
	1361	1494	1581	380	413	6c-1s (Met95)	100

定したものである。スペクトル (b) は、ポンプ/プローブ法で得たがプローブ光の方がポンプ光より先に来ている。すなわち、光切断前の状態を反映している。これが (a) と同じである事は、この測定に用いている回転セルのスピードではセルの 1 回転の間に蛋白は光切断前の状態に戻っている事を意味する。

(B) の 488 cm⁻¹ のバンドは Fe-CO 伸縮振動に由来する事が CO 同位体置換の実験で確認された。そのバンド

は (a) と (b) で観測されるが、他のスペクトルには見られない。つまり CO は Fe に結合していない。ヘム蛋白の ν_4 と呼ぶラマンバンド¹³⁾ は 1 番強いラマンバンドで、リガンドフリーで 1361 cm⁻¹, CO 結合形で 1370 cm⁻¹ に観測される。20 ナノ秒後のスペクトル (c) ではそれが 1353 cm⁻¹ に現れ、ヘムが 5 配位高スピン状態にある事を示す。そのバンドの成分スペクトルを同時に示しているが、例えば 1.0 μ s 後 (e) には 1361 cm⁻¹ にもピーク

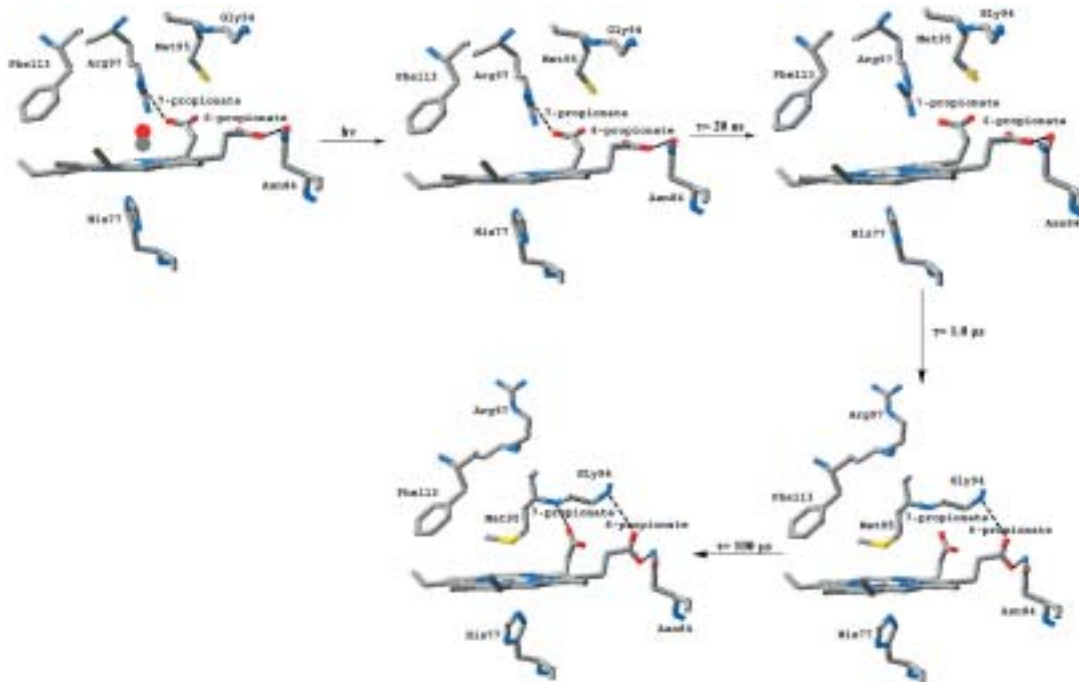


図 7. Proposed scheme for the structural changes in the heme active site of WT *EcDOSH* following CO dissociation. Hydrogen bonds are represented with black broken lines.

表 3. Raman frequencies of porphyrin skeletal modes, heme iron coordination, and delay times after photodissociation of CO for different variants of *Ec DOSH*

Proteins	ν_1 (cm ⁻¹)	ν_3 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	coordination	delay time (μ s)
M95A	1353	1470	1561	5c-hs	0.02-1000
	1370	1498	1582	6c-1s (CO)	100-1000
R97I	1351	1471	1559	5c-hs	0.02-1000
	1369	1497	1580	6c-1s (CO)	50-1000
R97E	1355	1472	1557	5c-hs	0.02-1000
	1362	1494	1581	6c-1s (Met95)	0.02-1000
R97A	1353	1471	1559	5c-hs	0.02-10
	1361	1497	1580	6c-1s (Met95)	10-1000
	1370	1497	1580	6c-1s (CO)	50-1000
F113L	1353	1471	1559	5c-hs	0.02-200
	1361	1497	1581	6c-1s (Met95)	10-1000
	1372	1497	1581	6c-1s (CO)	100-1000
F113T	1352	1471	1557	5c-hs	0.02-1000
	1360	1497	1580	6c-1s (Met95)	5.0-1000
	1370	1497	1580	6c-1s (CO)	50-1000

が現れ出し, 100 μ s 後には成長してそれ 1 本になっている. そのスペクトルはスペクトル (l) に近く, ν_2 が 1581 cm⁻¹, コアマーカースバンドの ν_3 が 1494 cm⁻¹ に現れ, 6 配位低スピンヘムの特色¹⁴⁾を示している. 低振動数側 (B) においては, 343 cm⁻¹ (ν_8), 380 cm⁻¹ (プロピオン酸基変角振動 $\delta(C_\beta C_c C_d)$), 413 cm⁻¹ (ビニル基変角振動 $\delta(C_\beta C_c C_d)$) のバンドが現れる. それらのバンド

は CO 結合形では, それぞれ 343, 377/384, 409/427 cm⁻¹ にシフトする. プロピオン酸基変角振動 $\delta(C_\beta C_c C_d)$ は, 光乖離後 0.02 (c), 1.0 (e), 100 μ s 後 (i) では, それぞれ \sim 363, \sim 375, \sim 380 cm⁻¹ にシフトしており, 3.3 の Asn84 との相互作用の項で述べた事と合致する. またビニル基変角振動も 0.02 μ s (c) で 408 cm⁻¹, 100 μ s で \sim 413 cm⁻¹ と変化し, Trp 53 の環境変化とつじつまが

合う。それら振動数を表 2 にまとめ、その意味するところをモデル的に図 7 に示す。すなわち、CO が光乖離すると Met95 が 1 μ s 秒後から配位し始め、100 μ s 秒後にはその構造変化は終了している事を意味する。ミリ秒の時間帯になると、再び CO がヘムポケットに入ってきて元の Fe-CO 結合体を作る。

色々な変異体で同種の実験をした結果を表 3 にまとめる。Met95 を非配位性残基の Ala に置換すると、光乖離した CO が 100 μ s 秒後には戻って再結合する事がわかった。Arg97 のカルボン酸側鎖を短くしてグルタミン酸にすると、Met95 の戻りが非常に早くて 20 ns 後には Met95 配位体になっているが、その側鎖を高いイソブチル基にすると Met95 は配位できず、光乖離した CO が 10 μ s 後に結合する。嵩の小さいメチルに置換した R97 A では、Met95 の配位したものが 5 μ s 後からできると同時に CO の結合したのも 50 μ s 後からで並行的に進行する。このように要となるアミノ酸残基を一つ置換するだけで蛋白全体のダイナミクスは大きく変わるものである事がこの研究から明らかになった。

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⁵⁾。前者に対しては Arg97 がヘムリガンドと水素結合していた。また Arg97 と Phe113 がヘ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 を光解離させるとヘムプロピオン酸基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、ヘ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事が本研究から推察された。

感謝 本研究を実施するに当り、ラマンスペクトルの測定に関しては、現サウジアラビアのキング・カーライド大学の Dr. S. F. El-Mashtoly, 時間分解ラマン測定に関しては兵庫県立大学の中島聡博士、試料の準備に関して、東北大学多元科学研究所の清水透教授、高橋泰人博

士、田中敦成博士のお世話になった。これらの人達に感謝する。

文 献

- 1) A. J. Schmidt, D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky, *J. Bacteriol.*, **187**, (2005) 4774-4781.
- 2) H. Takahashi, and T. Shimizu, *Chem. Lett.*, **35**, (2006) 970-971.
- 3) V. M. Delgado-Nixon, G. Gonzalez, and M. A. Gilles-Gonzalez, *Biochemistry*, **39**, (2000) 2685-2691.
- 4) Y. Sasakura, S. Hirata, S. Sugiyama, S. Suzuki, S. Taguchi, M. Watanabe, T. Matsui, I. Sagami, and T. Shimizu, *J. Biol. Chem.*, **277**, (2002) 23821-23827.
- 5) S. F. El-Mashtoly, H. Takahashi, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, (2007) 3557-3563.
- 6) S. F. El-Mashtoly, S. Nakashima, A. Tanaka, T. Shimizu, and T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, **283**, (2008) 19000-19010.
- 7) H. J. Park, C. Suquet, J. D. Satterlee, and C. Kang, *Biochemistry* **43**, (2004) 2738-2746.
- 8) A. Tanaka, H. Takahashi, and T. Shimizu, *J. Biol. Chem.*, **282**, (2007) 21301-21307.
- 9) M. Aki, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Phys. Chem. B*, **104**, (2000) 10765-10774.
- 10) I. Harada, and H. Takeuchi, In *Spectroscopy of Biological Systems*; R. J. H. Clark, & R. E. Hester, Eds.; *Advances in Spectroscopy 13*, John Wiley & Sons, U. K. Chichester, (1986) pp. 113-175.
- 11) H. Takeuchi, *Biopolymers*, **72**, (2003) 305-317.
- 12) S. Hashimoto, K. Obata, H. Takeuchi, R. Needleman, and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **36**, (1997) 11583-11590.
- 13) T. Kitagawa, M. Abe, and H. Ogo, *J. Chem. Phys.*, **69**, (1978) 4516-4526.
- 14) T. Kitagawa, Y. Kyogoku, T. Iizuka, and M. Ikeda-Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, (1976) 5169-5173.