

ガスセンサー *CooA* と *FixL* と *Dos* に関する最近の研究

山下 沢

Recent Studies on Gas Sensors, *CooA*, *FixL*, and *Dos*

Taku YAMASHITA

*Laboratory of Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan*

(Received May 31, 2010)

Heme-containing proteins, the heme proteins, are known to have physiologic functions in humans, mammals, fish, plants, and bacteria. For example, hemoglobin and myoglobin, which belong to the globin family, have been studied in terms of their structures and functions with spectroscopic and mutagenic methods. Recently, a new class of heme proteins has been discovered, referred to as gas sensors. These are heme-based sensor proteins that play important roles in transcriptional activation, histidinekinase activities, phosphodiesterase activities, etc. *CooA* is a CO-sensing transcriptional activator derived from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FixL* is a rhizobial oxygen sensor protein, and we have targeted *Bj* *FixL* derived from *Bradyrhizobium japonicum*. *Dos* from *Escherichia coli* is an oxygen sensor protein, which senses oxygen in the heme-containing domain and induces phosphodiesterase activity in other domains. In previous work, we studied the axial ligands and C-helix of *CooA* to clarify the activation mechanism. Moreover, *FixL* and *Dos* were investigated using time-resolved spectroscopic methods. Whereas *FixL* has a pentacoordinate heme in the ferrous deoxy form, there are a proximal histidine (His 77) and a distal methionine (Met 95) as axial ligands to coordinate to the heme iron in *EcDos*. However almost all gas sensors show mono-exponential rebinding (6–7 ps), while *EcDosH* and full-length *Dos* show biexponential rebinding (7 ps and 35 ps) on the internal ligand. The results were also supported by molecular dynamic simulation. Here we discuss recent work on gas sensors with implications provided by our research.

Key words—gas sensor; *CooA*; *FixL*; *Dos*; time-resolved spectroscopy; molecular dynamics

1. はじめに

人類に限らず、生命が活動を営む上でガス分子の存在は必要不可欠である。このようなガス分子と結合するタンパク質として、鉄ポルフィリン錯体であるヘムを含有するタンパク質が非常によく知られており、その主なものに酸素の運搬体であるヘモグロビンや貯蔵を行うミオグロビンが存在する。これらタンパク質はグロビンフォールドと呼ばれる構造上の特徴を持ち、グロビタンパク質と総称され、1980年前後に研究が盛んとなり、今日までに多くの報告がなされている。また昨今では同様にグロビンフォールドを持つタンパク質として、サイトグロ

ビンやニューログロビンが相ついで発見されており、¹⁾ 分光学的手法を用いて各種測定が行われ、ヘムを含むタンパク質に関する研究はいまだに広がり続けている。このような背景の中、近年、ヘム含有タンパク質の中で新奇なグループが発見され、注目を浴びている。これらタンパク質はガス分子を感知してなんらかの生理学的な機能を発現することからガスセンサータンパク質と呼ばれ、細菌だけでなく植物や動物、ヒトにも存在することが報告されている。例えば、一酸化窒素については可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) がよく知られている。²⁾ 生体内で、NO合成酵素によって生じた一酸化窒素がsGCに作用すると、GTPからサイクリックGMPへの変換を促す。サイクリックGMPは心臓血管や神経系を含めた種々の生理学的機能に関与しているため、結果として、sGCはこれら生理学的機能に関与、つまり一酸化窒素によってこれらの機能が制

大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6)

e-mail: taku@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞(物理系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

御されていることになる。このような特定のガス分子によるタンパク質の機能制御は sGC のみでなく、今日までに一酸化炭素や酸素についても報告がなされており、ガス分子によって機能が制御される機構というもの非常に注目されている。しかしながら、これらガス分子の認識機構に関する詳細は不明であり、さらに機能を発現する活性化機構については未解明な部分が多い。そこで本稿では、ガスセンサータンパク質に関して今日までに筆者らが得た研究成果を主に紹介するとともに、昨今のガスセンサータンパク質に対する構造と機能に関する研究の進捗状況について概説する。

2. CoxA

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来の CoxA は 20 世紀末に発見された最初のガス感知転写因子として注目され、その後、ヒト由来で同様に一酸化炭素を感知して転写を制御するタンパク質が 21 世紀初頭に発見されたことにより、その研究意義は飛躍的に上昇した。^{3,4)} 2000 年に構造解析がなされた結果、CoxA は通常の状態では同型二量体として存在し、単量体当たりには 1 つのヘムを含むヘムタンパク質であることが明らかとなった (Fig. 1)。⁵⁾ またヘム周辺構造に着目したところ、還元型ではアミノ末端である 2 位のプロリンと 77 位のヒスチジンとが配位しており、さらに興味深いことにこのプロリンはもう一方の単量体から供給されているという非常に特徴的な構造を有していた [Fig. 1(B)]。その一方、変異を導入した実験から、酸化型では 75 位のシステインが還元型での軸配位子である 77 位のヒスチジンに置き換わって配位するという軸配位子のスイッチが行われていることも示唆され、ヘム鉄の酸化状態変化に伴って生じる構造変化も非常に興味深く、これらアミノ酸の機能というものが非常に注目されていた。このような背景の下、筆者らは還元型の構造における 2 つの軸配位子にまず着目し、それぞれに変異を導入してヘム周辺に生じる構造変化を共鳴ラマン分光法により追跡した。また、一酸化炭素の結合親和性を評価するために、一酸化炭素を飽和溶液として調製して徐々に滴下していき、その変化を吸収スペクトルで測定するという新たな手法を確立した。⁶⁾ これらの結果から、一酸化炭素が結合した際に置換されるアミノ酸残基が 2 位のプロリンであることを同定し、77 位ヒスチジンの機能

と 2 位プロリンの機能それぞれについて、明確にすることに成功した。さらに、機能発現において二量体の界面が活性化機構にて重要であると考え、界面を形成している C ヘリックス上のアミノ酸に網羅的に変異を導入し、上記手法をもとに種々の測定を行った結果、116 位のロイシン、117 位のグリシン、120 位のロイシンが、還元型ではそれほど遠位側の軸配位子である 2 位のプロリンの近くには存在しないものの、結合した一酸化炭素の近傍に存在することが明らかとなったことから、活性化の機構として Roll-and-Slide モデルを提唱するに至った。⁷⁾ CoxA についてはほかの細菌由来のものも報告されており、イミダゾールを配位させて活性型を取ることを期待して結晶構造解析がなされた [Fig. 1(C)] が、⁸⁾ その構造は相同性の高さから類似性が指摘されている DNA と複合体を形成した CRP 活性型の構造⁹⁾ とは全く異なっており [Fig. 1(D)]、いまだ CoxA については活性型の構造が明らかとされていない。さらには、近年、ヒトの脳内においてもサーカディアンリズムに関与するものも発見され、^{3,10)} 物理化学的な側面のみならず、生理学的な機能を標的とした分野にもその対象は広がり、今日では関連する研究は多岐に渡っている。タンパク質としての機能を標的とした研究においては、後から発見された一酸化炭素感知転写因子についても活性化機構の詳細については分かっておらず、今後も CoxA が本研究領域において、その研究対象として非常に興味深いものであることは間違いない。

3. FixL

CoxA が一酸化炭素を感知して活性化されるタンパク質である一方、他のガス分子によって機能の活性化が引き起こされるものも存在する。その 1 つが枯草菌由来の FixL である。FixL は酸素を感知して機能を発現するタンパク質として知られており、ヒスチジンをリン酸化するヒスチジンキナーゼ活性を有する。その対象は FixJ であり、FixL と FixJ は二成分情報伝達系として呼ばれ、間接的に FixL は酸素の濃度を感知して FixJ による転写を制御している。FixL については、ガス分子が結合するヘム結合ドメインのみの FixLH と呼ばれる部分については構造が明らかとなっており、先に挙げた CoxA とは異なり、タンパク質部分からは 200 位のヒスチジンのみが配位した 5 配位構造のヘムを有している

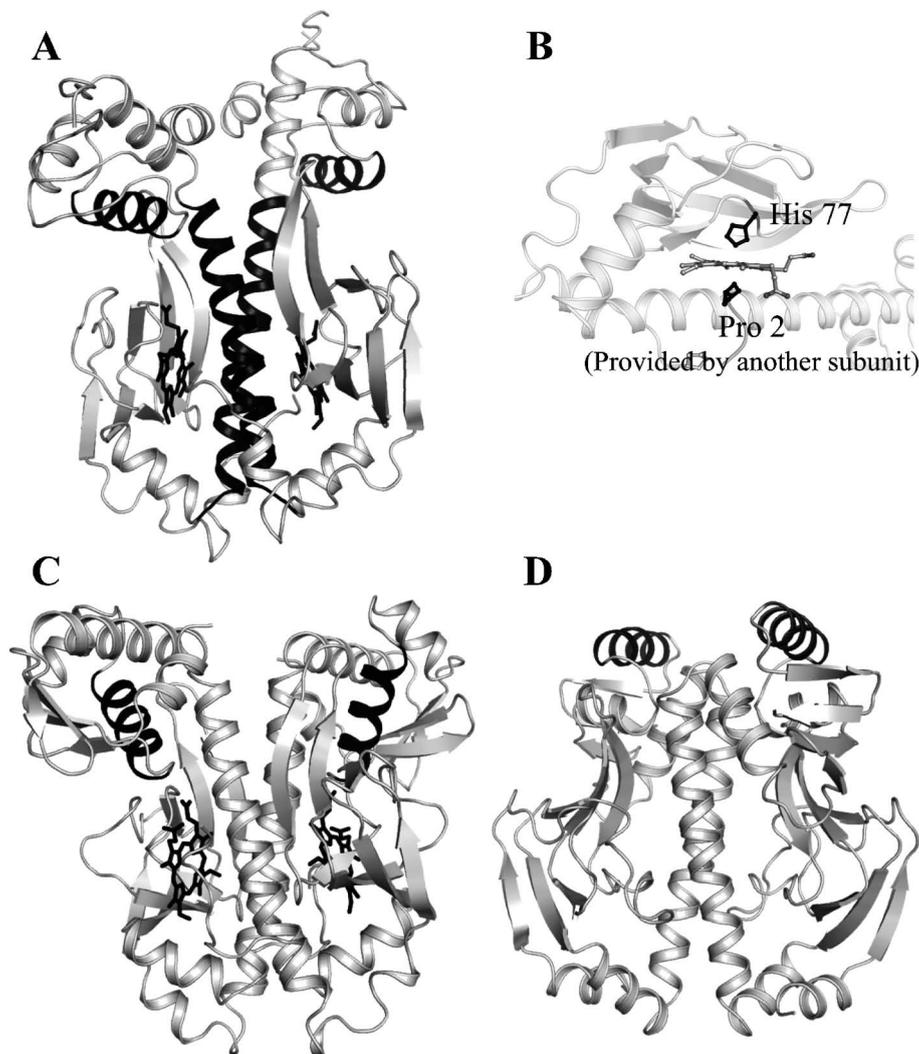


Fig. 1. Crystal Structures of Transcriptional Activators

A: The crystal structure of *Rr* CooA in the ferrous state (PDB : 1FT9). Hemes, C-helices, and the DNA recognition helices were colored in dark gray. B: The enlarged heme environment of *Rr* CooA in the ferrous state. Two axial ligands and a heme in the ferrous state were depicted as sticks. C: The crystal structure of *Ch* CooA in the imidazole-bound form (PDB : 2FMY). The contained hemes and the DNA recognition helices were colored in dark gray. The helices were folded toward to the heme-binding domains. D: The solved crystal structure of Catabolite gene activator protein (Cyclic AMP receptor protein) and oligo DNA complex (PDB : 1CGP). The bound DNA was hidden in order to compare the whole structure with CooAs. The recognition helices were colored in dark gray.

ことが分かっている [Fig. 2(A)].¹¹⁾ この配位構造は酸素貯蔵タンパク質として知られるミオグロビンと同じであり、事実、ミオグロビンの還元状態及び酸素結合時のスペクトルと、FixLHの還元型及び酸素結合型のスペクトルは酷似しており、構造上の特徴を反映している。しかしながら、タンパク質の性質について着目した場合、酸素の親和性などはミオグロビンと明らかに異なることも分かっている。筆者の共同研究グループはこれらの性質を踏まえ、今日まで外来性の軸配位子つまり酸素の結合に重要である遠位側のアミノ酸残基の中で、特に220位のアルギニンに着目し、その変異が与える影響を精査

してきた。¹²⁻¹⁴⁾ さらに、筆者らは時間分解の共鳴ラマン分光法を用いることで、酸素解離後の再結合時にミオグロビンでみられたヘムの緩和状態がFixLHでは認められなかったこと、さらに220位のアルギニンを置換した変異体であるR220Qにおいては、ミオグロビンと同様に緩和状態が観察されたことを報告し、この残基が結合した酸素と水素結合を形成し、ヘムポケット内に止める役割を担っていることを明らかとした。¹⁵⁾ この水素結合から、酸素がヘムの方へ押されるように歪んだ状態で維持されていることが示唆されており、そのことは以前の分子動力的シミュレーションの結果とも一致した。¹⁴⁾

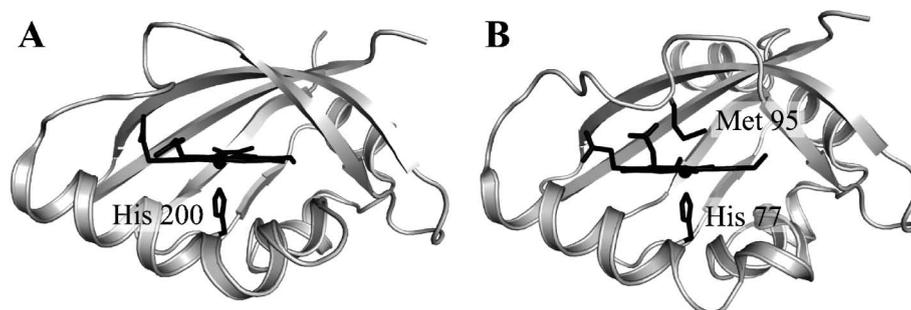


Fig. 2. Crystal Structures of *Bj* FixLH (PDB : 2VV7) (A) and *Ec* DosH (PDB : 1S67) (B)

Both axial ligand(s) and heme were depicted as sticks and colored in dark gray. Although FixLH has His 200 solely as an axial ligand, His 77 and Met 95 coordinate the heme iron in the ferrous state of DosH.

以上のように、FixLについては完全長の発現が困難であることから、主にそのヘム結合ドメインのみのFixLHに対して変異を導入し、その影響を分光学的手法によって追跡し解明を試みるという手法が取られてきた。このような背景の中、昨年、RIKENの城らによって、FixL/FixJを代表とする二成分情報伝達系に属するタンパク質の1つであるThkAのヘム結合ドメイン、ヒスチジンキナーゼを含む触媒ドメイン、さらにFixJに相当するTrrA単独の構造に加え、ThkAとTrrAの複合体に関してX線結晶構造解析が行われ、その立体構造が明らかとなった。¹⁶⁾ ThkAによるシステムがかならずしもFixLにおける機構とは相関しないと考えられるものの、構造解析が行われたことで、未解明のFixLによる二成分情報伝達系の機構についても、近い将来に解明されることが期待されている。

4. Dos

最後にDosについて述べる。Dosは先に述べたFixLと同様、酸素を感知して酵素活性を示すヘム含有タンパク質として、大腸菌で発見された。¹⁷⁾ Dosはヘム結合ドメインにおいてはFixLと60%程度の高い相同性を示すにもかかわらず、ヒスチジンキナーゼではなくホスホジエステラーゼ活性を示すこと、また酸素のみでなく他のガス分子によっても酵素活性を示すことから、ヘム鉄の酸化状態によって酵素活性が制御されている可能性も示唆されるなど、FixLとは異なることも示唆されていた。¹⁸⁾ 2004年、Parkらによって行われたX線結晶構造解析から、Dosのヘム結合ドメインのみであるDosH立体構造において、ヘム鉄への配位が77位のヒスチジンと95位のメチオニンが配位した6配位構造であり、先に述べたFixLHの配位構造とは全く異

なることが明らかとなった [Fig. 2(B)].¹⁹⁾ 日本国内において、東北大学の清水らは、この配位している95位のメチオニン、及び、先に述べたFixLにおける結合した酸素に影響を及ぼす遠位側のアルギニンに相当する97位のアルギニンに着目し、種々の変異体を調製し、各種分光学的測定を行うことで、変異導入に伴うヘム周辺構造への影響を検討し、各残基の役割を検証した。^{20,21)} 時を同じくし、筆者らも95位のメチオニンに着目し、95位のメチオニンをヒスチジンに置換したM95H変異体を調製し、時間分解スペクトルの測定を行った。その結果、野生型でみられた7ピコ秒と35ピコ秒という二段階の結合が、M95H変異体において8ピコ秒のみの一段階へと変化したことから、二段階の再結合が95位のメチオニンに由来することを明らかとした (Fig. 3)。さらに、分子動力的シミュレーションを用いて95位メチオニンについて精査した結果、メチオニンが光解離前と後いずれにおいても、結晶構造からでは同定できなかった2つのコンフォメーションを取ることが明らかとなり、先の時間分解スペクトルの結果から、コンフォメーションと再結合速度との関係をFig. 4のように結論づけた。²²⁾

以上のように、DosHに関して95位のメチオニンに着目して精査した結果、機能に関する知見を得ることに成功した。さらに筆者らは昨年、完全長Dosの獲得にも成功し、DosHと同様、各種分光学的手法によるヘム周辺構造の変化を調べた結果、大きな変化は認められなかった。一方、時間分解スペクトルの測定においても、完全長のDosがDosHと同様に二段階の再結合を示したことから、この95位のメチオニンの動きが機能に重要であり、特

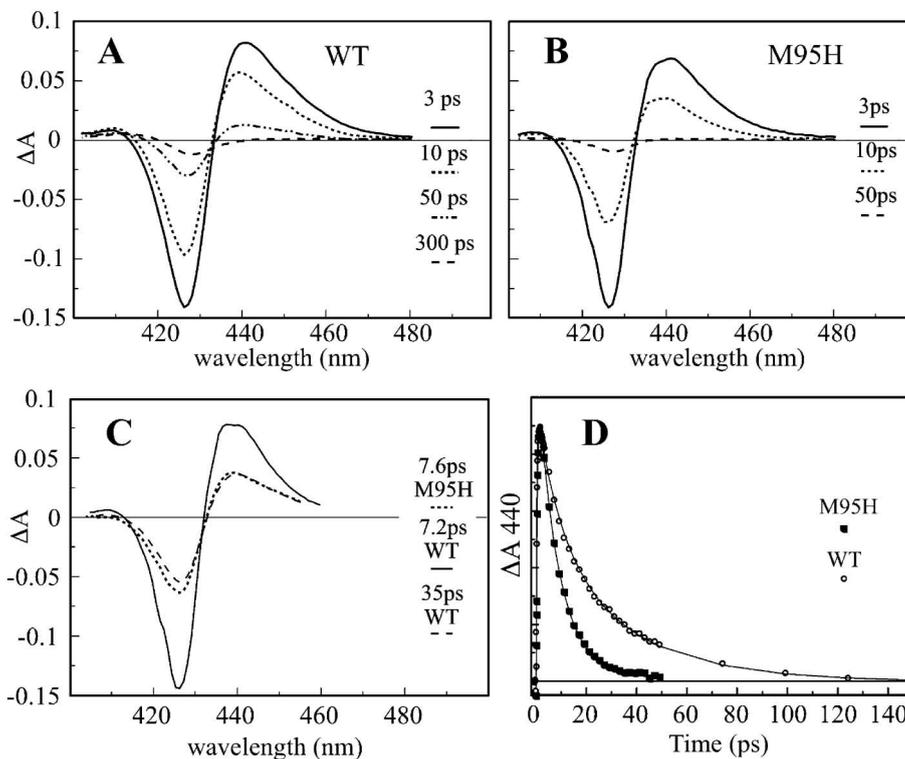


Fig. 3. Internal Ligand Rebinding in Reduced DosH

Transient spectra with different delay for WT (A) and M95H (B). C: Decay associated spectra for the recombination phase (s) of the proteins normalized to similar total bleaching. D: Normalized kinetics at 440 nm. Solid lines were fitted either bi- or mono-exponentially.

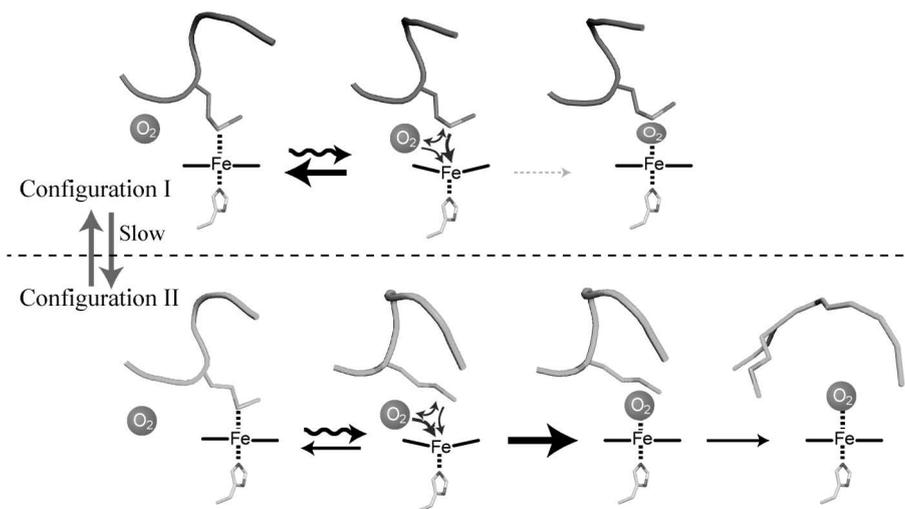


Fig. 4. Proposed Schematic Model of the Interaction of External Ligands (here O_2), M95 and Heme in Two Configurations under Conditions Where External Ligands Are Present in the Heme Pocket

All drawings are based on simulated or crystal structures (PDB : 1VB6). Thermal dissociation is indicated by wavy arrows. Interactions between O_2 , M95 and heme are indicated by curved arrows. Differences in thickness of arrows qualitatively indicate differences in rates. M95, H77, and the solvent-exposed FG loop were depicted using PYMOL.

に二量体間の相互作用に寄与していることが強く示唆された。一方、一酸化炭素や酸素のヘム鉄への親和性は、DosH と完全長 Dos では 10 倍ほど異なることが明らかとなった。このことから、酵素ドメイ

ンを有するとガス分子の結合によってタンパク質の構造になんらかの変化が生じ、それによって親和性に影響を及ぼすようなアロステリックな構造変化が誘起されると考えられた。²³⁾ 完全長 Dos については

昨年ようやく精製に成功したばかりであり、今後、様々な検証を行うことで、更なる興味深い結果が得られるものと考えている。

5. おわりに

本稿で概説した研究領域以外においても、筆者らのグループでは冒頭で触れたグロビンタンパク質に関しても興味深い結果を得ており、既に数報の論文として投稿中又は投稿準備中である。また、今回では触れなかった他のタンパク質についても構造と機能の関係について検討を行っている。従来考えられていたヘムを含有するタンパク質の単なるガス分子の運搬や貯蔵、また電子伝達への関与のみならず、複雑な活性化機構に対する研究はまだ発見の歴史が浅く、研究もそれほど進んではない。このような背景の中、近年、ガスセンサータンパク質に関する研究は、海外はもちろん日本国内においても盛んに行われており、興味深い報告がいくつもなされている。また、その多くがヒトを始めとした哺乳類の生体内であり、ポストゲノム時代である昨今においては、今後も同様のタンパク質に関する報告が増加していくと考えられる。本執筆にあたり、薬学という領域においても、転写因子や酵素を活性化するというガス分子の新しい役割について1人でも多くの読者が興味を示し、結果として、日本国内での本研究分野のより一層の発展につながってくれることを期待している。

謝辞 今回紹介させて頂いた研究は、筆者が単独でなし得たものではなく、これまで筆者が在職した研究室で行ってきたものであり、日本だけでなく、世界中の多くの研究者に支えられて行うことができたものである。この場をお借りし、終始御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科の宇野公之教授、フランス Ecole Polytechnique の Marten H. Vos 博士、Ursula Liebl 博士に深甚なる感謝の意を表します。また、研究の遂行に際し、御協力と御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科の青山浩准教授、熊本大学大学院医学薬学研究部の山縣ゆり子教授、池水信二准教授、中村照也助教、池鯉鮒麻美研究員、静岡県立大学大学院薬学研究科の石川吉伸准教授に心より感謝申し上げます。さらに、所属した各研究室でともに研究を行い、日夜有意義な議論を交わし切磋琢磨してくれた皆様に

も心より御礼申し上げます。最後に、研究者としての生活に何より理解を示し、日々支えてくれた妻と子供達に感謝します。

REFERENCES

- 1) Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T., *Nature*, **407**, 520–523 (2000).
- 2) Arnold W. P., Mittal C. K., Katsuki S., Murad F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3203–3207 (1977).
- 3) Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C., *Cell*, **111**, 41–50 (2002).
- 4) Dioum E. M., Rutter J., Tuckerman J. R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., McKnight S. L., *Science*, **298**, 2385–2387 (2002).
- 5) Lanzilotta W. N., Schuller D. J., Thorsteinsson M. V., Kerby R. L., Roberts G. P., Poulos T. L., *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 876–880 (2000).
- 6) Yamashita T., Hoashi Y., Watanabe K., Tomisugi Y., Ishikawa Y., Uno T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 21394–21400 (2004).
- 7) Yamashita T., Hoashi Y., Tomisugi Y., Ishikawa Y., Uno T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 47320–47325 (2004).
- 8) Komori H., Inagaki S., Yoshioka S., Aono S., Higuchi Y., *J. Mol. Biol.*, **367**, 864–871 (2007).
- 9) Schultz S. C., Shields G. C., Steitz T. A., *Science*, **253**, 1001–1007 (1991).
- 10) Rutter J., Reick M., Wu L. C., McKnight S. L., *Science*, **293**, 510–514 (2001).
- 11) Gong W., Hao B., Mansy S. S., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., Chan M. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15177–15182 (1998).
- 12) Liebl U., Bouzhir-Sima L., Negrier M., Martin J. L., Vos M. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12771–12776 (2002).
- 13) Balland V., Bouzhir-Sima L., Kiger L., Marden M. C., Vos M. H., Liebl U., Mattioli T. A., *J. Biol. Chem.*, **280**, 15279–15288 (2005).
- 14) Jasaitis A., Hola K., Bouzhir-Sima L., Lambry J. C., Balland V., Vos M. H., Liebl U., *Biochemistry*, **45**, 6018–6026 (2006).
- 15) Kruglik S. G., Jasaitis A., Hola K., Yamashita

- T., Liebl U., Martin J. L., Vos M. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7408–7413 (2007).
- 16) Yamada S., Sugimoto H., Kobayashi M., Ohno A., Nakamura H., Shiro Y., *Structure*, **17**, 1333–1344 (2009).
- 17) Delgado-Nixon V. M., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., *Biochemistry*, **39**, 2685–2691 (2000).
- 18) Sasakura Y., Hirata S., Sugiyama S., Suzuki S., Taguchi S., Watanabe M., Matsui T., Sagami I., Shimizu T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 23821–23827 (2002).
- 19) Park H., Suquet C., Satterlee J. D., Kang C., *Biochemistry*, **43**, 2738–2746 (2004).
- 20) Tanaka A., Takahashi H., Shimizu T., *J. Biol. Chem.*, **282**, 21301–21307 (2007).
- 21) Ishitsuka Y., Araki Y., Tanaka A., Igarashi J., Ito O., Shimizu T., *Biochemistry*, **47**, 8874–8884 (2008).
- 22) Yamashita T., Bouzahir-Sima L., Lambry J. C., Liebl U., Vos M. H., *J. Biol. Chem.*, **283**, 2344–2352 (2008).
- 23) Lechauve C., Bouzahir-Sima L., Yamashita T., Marden M. C., Vos M. H., Liebl U., Kiger L., *J. Biol. Chem.*, **284**, 36146–36159 (2009).