

# COセンサー蛋白質CooAのCO結合およびDNA結合による

## 蛋白高次構造変化：紫外共鳴ラマン分光法による研究

久保稔<sup>1</sup>，稲垣さや香<sup>1,2</sup>，吉岡資郎<sup>1</sup>，内田毅<sup>1</sup>，水谷泰久<sup>3</sup>，青野重利<sup>1</sup>，北川禎三<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡崎統合バイオ，<sup>2</sup>総研大院，<sup>3</sup>神戸大分子フォト) E-mail: kubo@ims.ac.jp

【はじめに】CooAは，一酸化炭素（CO）を生理的なエフェクターとするガスセンサー蛋白質の1つであり，COの存在を感知するとそれに応答して支配下遺伝子の発現を活性化する転写調節因子である．結晶構造は，COフリー型（不活性型）についてのみ解かれている（図1）．ホモダイマーとして存在し，各サブユニットは，ヘムを含むセンサードメインとDNA結合ドメインとからなる．センサードメインとDNA結合ドメインは，1本の長い $\alpha$ -ヘリックス（C-ヘリックスとよぶ）で結ばれている．C-ヘリックスは，サブユニット間の界面にもなっている．

ヘムにはHis77（近位側）と隣のサブユニットのN末残基Pro2（遠位側）が配位している．CO雰囲気下ではPro2がはずれてCOが配位するが，このとき，ヘムはサブユニット間界面へとスライドし，COはC-ヘリックスが構成する結合ポケットにおさまると考えられている．したがって，CooAのダイナミクスのポイントは，ヘム-蛋白質間/ドメイン間/サブユニット間のjunctionであるC-ヘリックスの動きにあるといえる．

我々はこれまでに，紫外共鳴ラマン分光法を用いて，COの結合によるC-ヘリックスの動きを調べてきた．紫外共鳴ラマン分光法とは，紫外光に共鳴するアミドバンドや芳香族アミノ酸（主にTrpとTyr）のバンドから，部位特異的に蛋白構造を推定する分光法である．CooAはC-ヘリックス上にTrpを1個もっている（図1）．そのTrp由来のラマンバンドの解析から，C-ヘリックスはCOの結合によってホモダイマーの二回対称軸周りで回転する，という過去のモデルを支持する結果を得た．

本研究では，DNA結合型の構造解明へとさらに研究を進め，認識配列を含むDNAオリゴヌクレオチドを用いて，DNA結合型の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定することに成功した．本講演では，可視共鳴ラマン分光法による解析も加え，COの結合およびDNAの結合による一連の高次構造変化を，特にセンサードメインに焦点を絞って議論する．

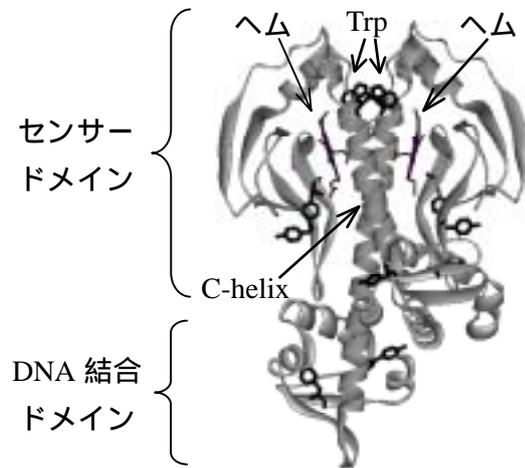


図1．*Rhodospirillum rubrum* 由来のCooAのCOフリー型構造．TrpとTyrをStick表示で示す．

【結果・考察】図2の(a)と(b)に, DNA結合型(+CO,+DNA)およびCO結合型(+CO,-DNA)のそれぞれの紫外共鳴ラマンスペクトルを示す. それらの差スペクトル(c)からDNA由来のバンド(d)を引き, CoxAのTrpとTyr由来のバンドの正味の差を示したものが, 差スペクトル(e)である. Tyrバンドには, DNAの結合による顕著な差は観測されなかったが, Trpバンド(W3, W16, W18)に, ラマン強度の増大が観測された. その他, 幾つかの点においても, DNAの有無による差スペクトル(e)は, 過去に測定したCOの有無による差スペクトルに酷似していたので, 我々は, DNAの結合によって, COの結合の場合と同様のC-ヘリックスの回転がさらに同方向に起こるのであろう, と予測した. この考えは, 可視共鳴ラマンスペクトルの解析結果とも一致した.

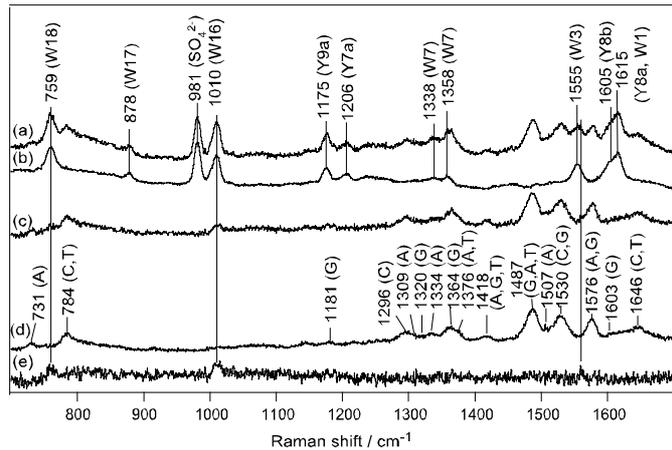


図2 DNA結合型 CoxA (a)およびCO結合型 CoxA (b)の229 nm励起紫外共鳴ラマンスペクトル(c) [(a)-(b)]. (d) 標的DNAのスペクトル. (e) [(c)-(d)] × 2.

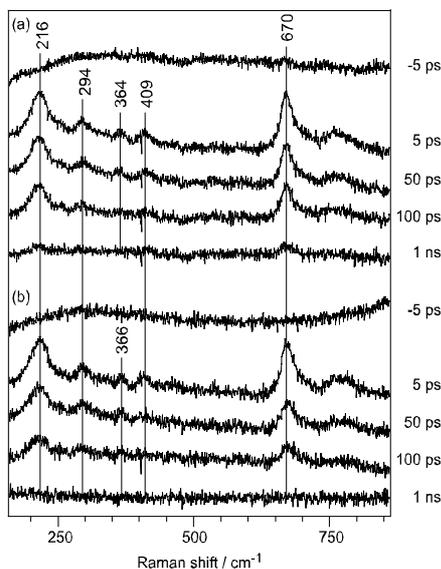


図3. CO光解離後のピコ秒時間分解可視共鳴ラマンスペクトル. (a) CO結合型 CoxA (b) DNA結合型 CoxA. Pump波長 540 nm, Probe波長 442 nm.

次に, DNAの結合によってヘムがスライドする可能性を検討するために, DNAの有無による $\nu(\text{Fe-His})$ の変化を調べた(図3).  $\nu(\text{Fe-His})$ は, CO結合型もDNA結合型も共に $216\text{ cm}^{-1}$ にあり, 波数シフトは観測されなかった. この結果から, DNAの結合によるヘムのスライドは否定された.  $\nu(\text{Fe-His})$ の強度はCOのgeminate再結合によりサブナノ秒で減少するが, その強度減少の速さから, DNA結合型ではCOのgeminate再結合速度が速くなっていることも, この実験から明らかとなった.

また, CW可視共鳴ラマン分光の実験から, DNA結合型では, Pro2のaffinityが著しく低下している可能性も示唆されている.

以上から, CoxAの構造変化はCOとDNAの両方が結合して初めて完結すること, DNA結合型では, C-ヘリックスの回転に伴ってヘム遠位側の構造が変化しており, したがってリガンド脱着のキネティクスも変化していることが明らかとなった.

【参考文献】M. Kubo, S. Inagaki, S. Yoshioka, T. Uchida, Y. Mizutani, S. Aono, T. Kitagawa (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 11271-11278.