

遷移金属イオンとガス分子の協奏による生理機能制御

青野 重利 自然科学研究機構 生命創成探究センター・分子科学研究所 教授

2002年に岡崎統合バイオサイエンスセンター（着任時は、統合バイオサイエンスセンター）・分子研に着任してから、あっという間に20年以上が経過してしまいました。2025年3月には定年を迎えることとなります。この間、恵まれた研究環境で研究を進めることができたことを感謝しております。



遷移金属イオンを含む金属タンパク質は、生物のエネルギー代謝、物質代謝、情報伝達など様々な生理機能制御に重要な役割を果たしている。我々の研究グループでは、金属タンパク質の中でも特に、気体分子をシグナル分子とするセンサータンパク質を研究対象とし、それらの構造機能相関の解明、およびセンサータンパク質生合成機構の解明を目的として研究を行なっている。

環境中に存在、あるいは生体中で合成される酸素、一酸化炭素、一酸化窒素等の気体分子は、生体中におけるシグナル分子として機能し、様々な生理

機能制御に関与している。生体において気体分子がシグナルとして機能するためには、それをセンシング（気体分子の存在を感知）するためのセンサータンパク質の存在が必須である。しかしながら、アミノ酸のみから構成される単純タンパク質は、気体分子と相互作用することは無いため、気体分子センサータンパク質は、気体分子と相互作用可能な遷移金属イオン、あるいは遷移金属含有補欠分子族をセンサーモジュールとして利用している。本稿では、センサータンパク質そのものではないが、水素センサーとして機能する

NiFe型ヒドロゲナーゼの活性中心を構築するための一連の生合成反応の中で、活性中心で利用されるCOの生合成反応を触媒するHypXタンパク質、および酸素をシグナル分子とする酸素センサータンパク質HemATについて、我々の研究成果を紹介する。

1. HypXタンパク質によるCO生合成反応

水素ガスの酸化反応・プロトンの還元反応を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、バクテリアなどによる水素代謝において中心的な役割を果たしている他、最近では燃料電池用触媒としての利用も期待されている金属酵素である。活性中心の構造の違いにより、[NiFe]型、[FeFe]型、[Fe]型の3種のヒドロゲナーゼが存在するが、いずれの場合も活性中心のFeには、COが配位している（図1）。また、[NiFe]型ヒドロゲナーゼには、酵素ではなく水素ガスをシグナル分子として利用し、水素依存的な遺伝子発現制御機能を有するタイプのヒドロゲナーゼが存在することも報告されている。ヒドロゲナーゼの活性中心に含まれるCOは、酵素反応により生合成されることが分かっているが、CO生合成反応の分子機構は

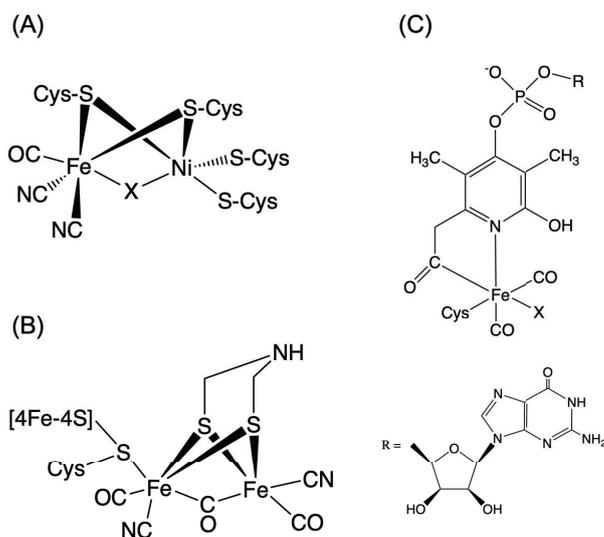


図1 (A) [NiFe]型ヒドロゲナーゼ、(B) [FeFe]型ヒドロゲナーゼ、(C) [Fe]型ヒドロゲナーゼ中に含まれる活性中心の構造。

不明な状況であった。我々は、[NiFe]型ヒドロゲナーゼが利用しているCOの生合成に関わる酵素 (HypX) の結晶構造を決定し、HypXがこれまでに全く例の無い反応によりCOを合成していることを明らかにした。

HypXは二つのドメイン (N末ドメインとC末ドメイン) から構成されており、分子内部にはこれら二つのドメインにまたがる形でキャビティーが存在している (図2)。また、C末ドメイン側のキャビティーには、補酵素A (Coenzyme A: CoA) が結合していることが分かった。HypXのN末ドメインは、 N^{10} -ホルミル-テトラヒドロ葉酸 (N^{10} -formyl-THF) を基質とし、 N^{10} -formyl-THFからのホルミル基転移反応を触媒する酵素 (これらの酵素

は、 N^{10} -formyl-THFのホルミル基を、アシルキャリアタンパク質中に含まれるパンテインの末端-SHに転移する。図3に示すように、パンテインは、CoAにも含まれる構造である) と構造相同性を有している。また、ホルミル基転移反応の触媒残基として機能する三つのアミノ酸残基も、HypX中の対応する位置 (H74, D80, D109) に保存されている (図4B)。HypXにテトラヒドロ葉酸 (THF) をソーキングすると、これら触媒残基の近傍に存在する基質結合部位にTHFが結合することもわかった (図4A)。

これらの結果を基に、次に示すようなCO生合成反応機構を提唱した。HypXのN末ドメインとC末ドメインでは、それぞれ異なる二つの化学反応

が進行すると考えられる。N末ドメインでは、反応基質としてN末ドメイン中のキャビティーに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸からCoAへのホルミル基転移反応が進行する。この時、キャビティー中のCoAは直鎖状に伸びたコンフォメーションを取り、CoAの末端にある-SH基はN末ドメインに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸中のホルミル基の側に位置する必要がある。図2に示した構造では、CoAは折曲がったコンフォメーションをとっており、末端の-SH基はC末ドメイン中に位置している。したがって、上記で述べたようなホルミル基転移反応が進行するためにはCoAのコンフォメーションが変化し、末端の-SH基がN末ドメインに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸

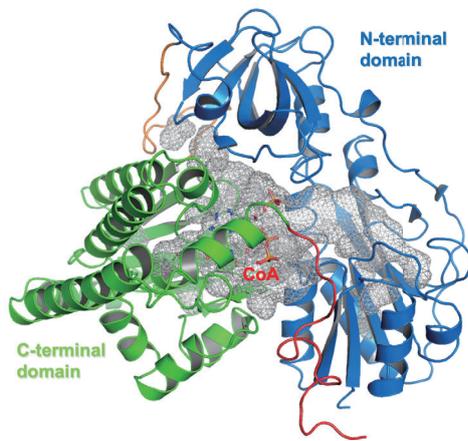


図2 HypXの結晶構造。N末ドメイン (青色) とC末ドメイン (緑色) の分子内部を連結する形でキャビティ (灰色のメッシュで表示した部分) が存在している。キャビティ中に補酵素A (Coenzyme A: スティックモデルで表示) が結合している。

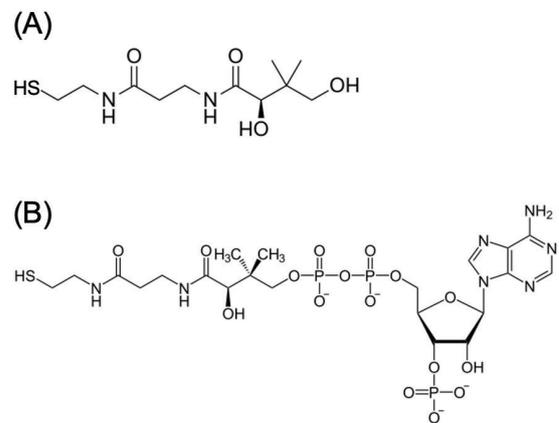


図3 (A) パンテイン、(B) 補酵素Aの構造。

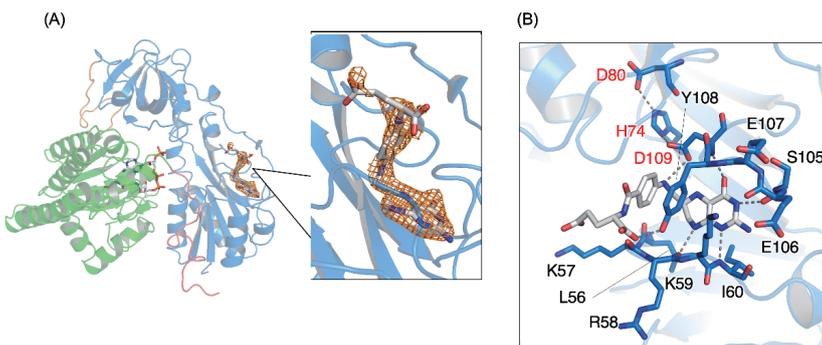


図4 (A) N末ドメインに THFを結合したHypXの構造。拡大図中に、THFの電子密度 (オレンジのメッシュ) と、そのスティックモデルを表示。(B) THF結合部分の拡大図。アミノ酸側鎖 (青色) とTHF (灰色) をスティックモデルで表示。ヒスチジン74 (H74)、アスパラギン酸80 (D80)、アスパラギン酸109 (D109) がcatalytic triadと呼ばれ、ホルミル基転移反応を触媒する触媒残基として機能する。

の近傍に位置する必要がある。変異型 HypX (A392F/I419F 変異体) の構造解析、および MD シミュレーション (ExCELLS・分子研の奥村久士准教授グループとの共同研究) により、このような CoA のコンフォメーション変化が可能であることを確認している。

HypX の N 末ドメインに結合した N¹⁰-formyl-THF から CoA へのホルミル基転移反応が進行すると、ホルミル-CoA が反応中間体として生成する。生成したホルミル-CoA は、CoA 分子の末端部分に存在するホルミル基が、HypX の C 末ドメイン中の酵素活性サイトに位置するよう (図 2 に示した折曲がったコンフォメーション)、キャビティー中で大きくそのコンフォメーションが変化すると考えられる。最終的に、C 末ドメイン中で、ホルミル-CoA からの CO 脱離反応が進行し、CO と CoA が生成する。ホルミル-CoA からの CO 生成反応は、これまでに全く報告例の無い、新規な反応である。

2. ヘムをセンサーモジュールとする酸素センサータンパク質 HemAT

HemAT は、細菌の酸素に対する走化性 (生育に適した酸素濃度環境に向けて移動する現象) 制御系において酸

素センサーとして機能しているタンパク質であり、センサードメインとシグナリングドメイン、二つのドメインから構成されている。HemAT 中のセンサードメインは、グロビン構造を有しており、分子中に含まれるヘムが酸素センサーの本体として機能している。酸素分子が HemAT 中のヘムに結合することにより、走化性シグナル伝達が開始されるが、HemAT センサードメイン内でどのようにして特異的に酸素を認識しているのか、酸素をセンシングした情報をどのようにしてシグナリングドメインに伝達しているのか等についてはよく分かっていない。そこで我々は、シグナル ON 状態である酸素結合型 HemAT、およびシグナル OFF 状態である還元型 HemAT の分子構造を明らかにし、両者の構造を比較することにより、HemAT による酸素センシング、および酸素センシング後のシグナル伝達機構解明を目指した。

酸素化型および還元型 HemAT センサードメインの X 線結晶構造解析を行い、酸素化型は 2.50 Å 分解能、還元型は 2.36 Å 分解能でそれぞれ構造を決定した。それぞれのヘム近傍構造を図 5 に示す。酸素化型 HemAT、還元型 HemAT いずれの場合も、His 119

が軸配位子としてヘムに配位している。酸素化型 HemAT の近位側ヘムポケットでは、軸配位子である His 119 の近傍に存在する Tyr 129 が、3 つの水分子を解して Glu 168 との間で水素結合ネットワークを形成している。一方、還元型 HemAT では、この水素結合ネットワークは形成されていない。酸素化型 HemAT では、この水素結合ネットワークが存在することによりセンサードメインの C 末端ヘリックスが固定化されているのに対して、水素結合ネットワークが存在しない還元型 HemAT では、C 末領域がフレキシブルになっているものと推定される。センサードメインの C 末端ヘリックスは、センサードメインとシグナリングドメインを連結するリンカーとして機能している。このことは、HemAT 中のヘムに酸素が結合する (酸素がセンシングされる) ことにより、リンカー部分のコンフォメーション変化が誘起されることを示唆しており、このコンフォメーション変化が HemAT による酸素特異的なシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられる。現在、この仮説を検証するため、X 線結晶構造解析、およびクライオ電顕単粒子解析による全長型 HemAT の構造解析を進めている。

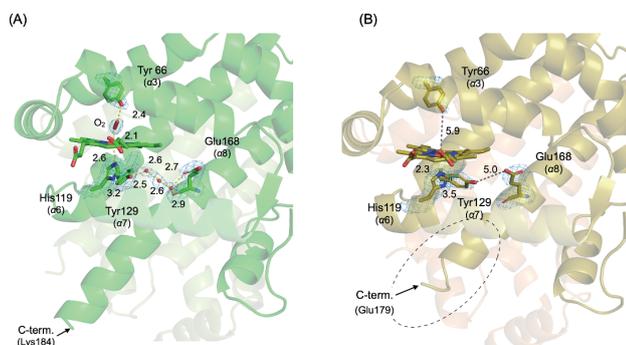


図 5 (A) 酸素化型 HemAT、(B) 還元型 HemAT のヘム近傍構造。酸素化型ではセンサードメインの C 末端ヘリックスは、184 残基目まで電子密度が観測されるのに対して、還元型では 180 残基目以降の電子密度はディスオーダーにより観測されない。