

3-11 岡崎共通研究施設（分子科学研究所関連）

岡崎統合バイオサイエンスセンター

青 野 重 利（教授）（2002 年 5 月 1 日着任）

A-1) 専門領域：生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) 一酸化炭素センサータンパク質 CooA の構造と機能に関する研究
- b) 酸素センサータンパク質 HemAT の構造と機能に関する研究
- c) ヘムを活性中心とする新規な脱水酵素の構造と機能に関する研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) CooA は一酸化炭素（CO）を生理的なエフェクターとする、これまでに例の無い新規な転写調節因子であり、その分子中に CO をセンシングするための活性中心としてヘム（鉄ポルフィリン錯体）を有している。CooA の転写調節機能は CO の有無により制御されており、CooA 分子中のヘムに CO が結合した場合にのみ、標的 DNA に特異的に結合し、支配下遺伝子の転写を活性化することを以前の研究で明らかにした。このように CO が生理的に積極的な意義を有していることを明らかにしたのは、CooA が世界で最初の例である。本研究では CooA の構造機能相関の全貌を明らかにするため、まず CooA の立体構造解明を目的として X 線結晶構造解析を行った。その結果、分子中のヘムにイミダゾールが配位した CooA の構造決定に成功した。本構造は標的 DNA には結合できない不活性型の構造であった。現在、活性型である CO 結合型の構造決定を試みている。
- b) HemAT は、細菌の酸素に対する走化性制御系において酸素センサーとして機能するシグナルトランスデューサータンパク質である。本研究では、HemAT による選択的な酸素センシング機構、ならびに酸素センシングに引き続いておこるシグナル伝達機構の解明を目的として研究を行った。HemAT による選択的な酸素センシング機構を明らかにするため、野生型ならびにヘム周辺のアミノ酸残基に系統的な変異を導入した各種変異体を調製し、共鳴ラマンスペクトルを中心に各種分光学的な測定を行うことで、それらの性質について詳細な検討を行った。また、DNA データベース解析により HemAT ホモログの検索を行い、何種類かの HemAT ホモログを取得することに成功した。得られた HemAT ホモログの性質を比較検討することにより、HemAT の機能発現に必須の要因を明らかにすることを試み、いくつかの必須要因を見いだすことに成功した。
- c) アルドキシム脱水酵素はアルドキシムの脱水反応によりニトリルを生成する反応を触媒する新規なヘム含有酵素である。本研究ではアルドキシム脱水酵素の触媒反応機構の解明を目的とし、*Bacillus* sp. OxB-1 株および *Rhodococcus* sp. N-771 株由来のアセトアルドキシム脱水酵素を対象として研究をおこなった。共鳴ラマンスペクトル、EPR スペクトル、電子吸収スペクトルにより、活性中心であるヘムの性質、局所構造を明らかにするとともに、各種条件下における酵素反応を詳細に解析することにより、本酵素反応の反応機構を明らかにすることに成功した。

B-1) 学術論文

E. PINAKOULAKI, H. YOSHIMURA, V. DASKALAKIS, S. YOSHIOKA, S. AONO and C. VAROTSIS, “Two Ligand Binding Sites in the O₂-Sensing Signal Transducer HemAT: Implication for Ligand Recognition/Discrimination and Signaling,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14796–14801 (2006).

K. KOBAYASHI, M. KUBO, S. YOSHIOKA, T. KITAGAWA, Y. KATO, Y. ASANO and S. AONO, “Systematic Regulation of the Enzymatic Activity of Phenylacetaldoxime Dehydratase by Exogenous Ligand,” *ChemBioChem* **7**, 2004–2009 (2006).

H. KOMORI, K. SATOMOTO, Y. UEDA, N. SHIBATA, S. INAGAKI, S. YOSHIOKA, S. AONO and Y. HIGUCHI, “Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of CooA from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*,” *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 471–473 (2006).

T. ZHANG, I. RUBTSOV, H. NAKAJIMA, S. AONO and K. YOSHIHARA, “Effect of Mutation on the Dissociation and Recombination Dynamics of CO in Transcriptional Regulator CooA: A Picosecond Infrared Transient Absorption Study,” *Biochemistry* **45**, 9246–9253 (2006).

H. YOSHIMURA, S. YOSHIOKA, K. KOBAYASHI, T. OHTA, T. UCHIDA, M. KUBO, T. KITAGAWA and S. AONO, “Specific Hydrogen Bonding Networks Responsible for Selective O₂ Sensing for the Oxygen Sensor Protein HemAT from *Bacillus subtilis*,” *Biochemistry* **45**, 8301–8307 (2006).

E. PINAKOULAKI, H. YOSHIMURA, S. YOSHIOKA, S. AONO and C. VAROTISIS, “Recognition and Discrimination of Gases by the Oxygen-Sensing Signal Transducer Protein HemAT as Revealed by FTIR Spectroscopy,” *Biochemistry* **45**, 7763–7766 (2006).

M. KUBO, S. INAGAKI, S. YOSHIOKA, T. UCHIDA, Y. MIZUTANI, S. AONO and T. KITAGAWA, “Evidence for Displacements of the C-Helix by CO Ligation and DNA Binding to CooA Revealed by UV Resonance Raman Spectroscopy,” *J. Biol. Chem.* **281**, 11271–11278 (2006).

K. KOBAYASHI, B. PAL, S. YOSHIOKA, Y. KATO, Y. ASANO, T. KITAGAWA and S. AONO, “Spectroscopic and Substrate Binding Properties of Heme-Containing Aldoxime Dehydratases, OxdB and OxdRE,” *J. Inorg. Biochem.* **100**, 1069–1074 (2006).

B-4) 招待講演

S. AONO, “Activation mechanism of CO-sensing transcriptional activator CooA,” Biochemistry and Molecular Biology of Sensor Enzymes and Proteins, Satellite Meeting of 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Sendai (Japan), June 2006.

S. AONO, S. INAGAKI, S. YOSHIOKA, H. KOMORI and Y. HIGUCHI, “Activation mechanism of the heme-based CO sensor protein CooA revealed by the crystal structure,” 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP4), Rome (Italy), July 2006.

B-7) 学会および社会的活動

文部科学省、学術振興会等の役員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員 (2005-).

日本学術振興会国際事業委員会書面審査員 (2005-).

学会誌編集委員

J. Biol. Inorg. Chem., Editorial Advisory Board (2002-2004).

B-8) 他大学での講義、客員

東京工業大学大学院理工学研究科, 非常勤講師, 2006年12月 - 2007年3月.

B-9) 学位授与

稲垣さや香, 「Structure and Function of the CO-Sensing Transcriptional Activator CooA from *Carboxydotherrhus hydrogeniformans*」, 2006年3月, 博士(理学)

B-10) 外部獲得資金

特定領域研究(A)「生体金属分子科学」, 「遷移金属含有型転写調節因子による遺伝子発現調節機構に関する研究」, 青野重利 (1996年-1999年).

住友財団 基礎科学研究助成, 「一酸化炭素をエフェクターとする新規な転写調節因子の生物無機化学的研究」, 青野重利 (1997年).

旭硝子財団 奨励研究助成, 「一酸化炭素による遺伝子発現の調節に関与する新規な転写調節因子 CooA に関する研究」, 青野重利 (1998年).

特定領域研究(A)「標的分子デザイン」, 「一酸化炭素をエフェクターとする転写調節因子の一酸化炭素応答およびDNA認識機構」, 青野重利 (1998年-2000年).

基盤研究(C), 「シグナルセンサーとしてのヘムを有する転写調節因子の構造と機能に関する研究」, 青野重利 (2000年-2001年).

特定領域研究「生体金属センサー」, 「一酸化炭素センサーとして機能する転写調節因子 CooA の構造と機能」, 青野重利 (2000年-2004年).

基盤研究(B), 「ヘムを活性中心とする気体分子センサータンパク質の構造と機能」, 青野重利 (2002年-2003年).

萌芽研究, 「気体分子センサータンパク質の構造機能解析とそのバイオ素子への応用」, 青野重利 (2002年-2003年).

東レ科学技術研究助成金, 「気体分子による生体機能制御のケミカルバイオロジー」, 青野重利 (2003年).

基盤研究(B), 「生体機能制御に関与する気体分子センサータンパク質の構造と機能」, 青野重利 (2004年-2006年).

特定領域研究「配位空間の化学」, 「タンパク質配位空間を利用した気体分子センシングとシグナル伝達」, 青野重利 (2005年-2007年).

内藤記念科学奨励金(研究助成), 「気体分子による生体機能制御のケミカルバイオロジー」, 青野重利 (2006年).

C) 研究活動の課題と展望

これまでは, 一酸化炭素, 酸素などの気体分子が生理的なエフェクター分子として機能するセンサータンパク質を主な研究対象として研究を進めてきた。センサータンパク質の機能は, 基本的にはエフェクター分子の有無によるセンサータンパク質の分子構造変化により制御されている。したがってこれらセンサータンパク質の構造機能相関を解明するためには, エフェクター分子存在下および非存在下におけるセンサータンパク質の分子構造を解明することが必須である。CooA に関しては, 不

活性型の構造決定には成功しているが、活性型の構造決定には至っていない。今後は、活性型 CooA ならびに HemAT の構造決定を目指して研究を行う予定である。また、ヘム以外の金属含有補欠分子族を活性中心とする新規なセンサータンパク質に関する研究にも取り組んで行きたい。