

Title	ユーグレナ・チトクロムbc1複合体 : 特異なヘム結合様式を示すチトクロムc1の構造
Author(s)	向井, 邦晃
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/151
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【27】

氏名・(本籍)	むか 向	い 井	くに 邦	あき 晃
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	8570	号	
学位授与の日付	平成元年3月24日			
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ユーグレナ・チトクロム bc ₁ 複合体：特異なヘム結合様式を示すチトクロム c ₁ の構造			
論文審査委員	(主査) 教授	松原	央	
	(副査) 教授	堀尾	武一	教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

チトクロム bc₁ 複合体は、呼吸鎖電子伝達系において、ユビキノール (UQH₂) -チトクロム C (cyt c) 酸化還元酵素活性をもつ蛋白質複合体である。酸化還元中心として2個のチトクロム b, 鉄硫黄クラスター, チトクロム c₁ を含む。これまでに好気性の細菌, および, 菌類, 高等植物, ホ乳類のミトコンドリアから精製されている。原生動物のものに関する知見はなく, ユーグレナから精製し, その性質を調べた。

葉緑体を欠く変異株, *Euglena gracilis* SM-ZK, から UQH₂ - cyt c 還元酵素活性を精製した。サブユニット構成は, これまで報告されている真核生物のものと同様であった。後述のようにアミノ酸配列から 32.5 K のバンドがチトクロム c₁ であり, 37 K サブユニットはチトクロム b と同定した。精製標品に含まれるチトクロムを分光学的に解析したところ特徴的なチトクロム c₁ を見いだした。還元型チトクロム c₁ の吸収極大は, 561 nm にあり, 他の生物種のもの (553 nm) から大きく長波長側へシフトしていた。

ユーグレナチトクロム bc₁ 複合体で, 最も特徴的な点は, チトクロム c₁ の分光学的性質である。精製標品のチトクロム c₁ に対応するピリジンヘモクロムは 553 nm に吸収極大を示し, 一般の C 型チトクロムの示す 550 nm のものと異なっていた。C 型チトクロムは, 一般に 2 個のシステイン残基でヘムを結合している。ところが, ユーグレナミトコンドリアには, システイン 1 個でヘムを結合する特異なチトクロム c (c-558) がある。その分光学的性質は上述のチトクロム c₁ と共通することから, ユーグレナでは, 両者が同様の構造でヘムを結合している可能性がある。そこで, チトクロム c₁ を単離し, ヘム結合部位を含む N 末端 46 残基の配列を決めた。ヘム結合部位は, 一般の C 型チトクロムと異なり, ヘ

ムを結合する2個のシステインのうち、N末側のものがユーグレナチトクロム c_1 ではフェニルアラニンに置換していた。ユーグレナのチトクロム c ($c-558$) も、この位置がアラニンに置換している。ユーグレナミトコンドリアでは、両者とも1本のチオエーテル結合でヘムを結合していることが判明した。

ヘム結合様式が特異なチトクロム c_1 の構造についてさらに知見を得るため、 c DNAクローニングをおこなった。単離した c DNAは蛋白化学的に決めたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、243残基からなるチトクロム c_1 をコードする領域を含んでいた。ヘム結合部位は、塩基配列からも上記のように同定された。決定した塩基配列、推定されるアミノ酸配列から生合成、構造に関する考察をおこなった。

論文の審査結果の要旨

チトクロム bc_1 複合体は呼吸鎖電子伝達系において UQH_2 -チトクロム C 酸化還元酵素活性を示す。電子伝達成分としてチトクロム b 、鉄・イオウ蛋白質、チトクロム c_1 を含んでいる。現在までに好気性細菌、菌類、高等動植物のミトコンドリアから精製され、一部のものは詳しく解析されている。しかし原生動物のもの知見はなく、特異な構成成分をもつ可能性が指摘されていた。向井君は原生動物ユーグレナ(ミドリムシ)のミトコンドリア膜から bc_1 複合体を精製し、その構成成分の同定を行い、真核生物のものとそのサブユニット構成が類似していることを確認した。そしてチトクロム C_1 (32.5 KDa)、チトクロム b (37 KDa)、鉄・イオウ蛋白質がそれぞれ存在するが、その分光学的性質が異常で、それがチトクロム c_1 に由来することを発見した。 α 吸収帯が一般の c_1 では $553-4\text{nm}$ に存在するのにこの c_1 は 561nm に存在する。このもののピリジンヘモクロムは 553nm に吸収極大を示し、一般の C ヘム成分の示す 550nm のものとは異なっていた。 C 型チトクロムは一般に2個のシステイン残基とチオエーテル結合を通してヘムを共有結合しているが、ユーグレナのチトクロム C ($C-558$) はシステイン1個でヘムを結合する珍しいものである。この分光学的性質が上述のチトクロム C_1 のそれと共通することから、ユーグレナの C_1 も同じ構造でヘムを結合している可能性がある。そこでこの C_1 のヘム結合部を含むペプチドのアミノ酸配列を決定した。そしてそこが、 $\text{Phe-Ala-Pno-(Cys)-His-}$ であり、通例 Ala の前にもう1つ Cys があるべきなのが Phe に置換され、システイン1個によるヘム結合の仮説が証明された。ユーグレナのチトクロム C では c_1 が $\text{Ala-Ala-Gln-Cys-His-}$ となっている。さらにこの構造を確実なものにするため、 c DNAのクローニングを行い、872塩基対から成る塩基配列を決定した。このものは蛋白質のペプチド断片各種のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含み、243残基から成る成熟チトクロム C_1 をコードする。そしてヘム結合部位は正しく $-\text{Phe-Ala-Pro-Cys-His-}$ であることが確認され、他のチトクロム C_1 の構造との比較や膜指向性前駆ペプチドの構造の考察も十分に成しうる成果をえた。

以上の結果は理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認めるものである。