

Title	Desulfovibrio vulgaris Miyazakiより抽出したチトクロムC3の構造と機能
Author(s)	樋口, 芳樹
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33935
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	樋 口 芳 樹
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 6 3 7 8 号
学位授与の日付	昭 和 59 年 3 月 24 日
学位授与の要件	理学研究科 高分子学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki より抽出したチトクロム C ₃ の構造と機能
論文審査委員	(主査) 教授 勝部 幸輝 (副査) 教授 中村 晃 教授 小林 雅通 助教授 安岡 則武 助教授 田中 信夫

論 文 内 容 の 要 旨

チトクロム C₃は、硫酸還元菌のみに見い出される多ヘム蛋白質で非常に低い負の酸化還元電位を示すことや、固相薄膜の状態で異常な電気伝導度を示すことからその立体構造、特にヘムの立体配置の解明が注目されており、X線による構造解析を行った。

硫酸還元菌の一種属、*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F(IAM 12604)より抽出したチトクロム C₃は、分子量 13995 で、107 個のアミノ酸残基中に 4 個のヘムを持つ。数回にわたる大量培養により得られた菌体より抽出したものを、エタノールによる蒸気拡散法により結晶化した。空間群は P2₁2₁2₁ で各格子定数は a = 52.9, b = 68.1, c = 34.9 Å であった。構造解析は 4 種類の重原子置換体を用いた多重同型置換法によった。2.5 Å 分解能における平均の figure of merit は、0.77 と高い値を示した。得られた電子密度図をもとに分子の骨格モデルを作成し、これより得た座標を精密化のための初期座標とした。

精密化は、結合距離、結合角などが低分子の解析より得られた理想値より大きくずれない様に制限を加えながら精密化する方法を用い、分解能を 1.8 Å、結晶学的な R 因子を 17.6% まで下げることが成功した。この段階で 47 個の水を 1 分子中に同定し、各原子には個々の温度因子を導入した。精密化により、α-helix や β-strand などの特徴的な 2 次構造を新たに同定することができた。4 個のヘムは互いに密に充填され、隣り合ったヘムはそれぞれの面をほぼ直交する様な立体配置にある。またヘムの構造から以下の様な新しい知見を得た。

4 個のヘムを溶媒領域への露出度、ヘム近傍の水の構造、ヒスチジンの配位の状況などから 3 種類に分類することにより、電気化学的な実験より得られた巨視的な酸化還元電位から微視的なそれを計算す

ることが可能となり、それらを各ヘムに帰属した。また、まわりの残基の構造なども考慮に入れて、各ヘムの生理学的な役割についての仮説をたてることに成功した。

今回、解析、精密化したもの以外に、現在別種のチトクロムC₃の立体構造がフランスのグループにより報告されている。これら両者の主鎖の折れたたみを比較することにより、これまで考えられていた1次構造のalignmentを立体構造の立場から修正した。そして、これをもとに、硫酸還元菌の蛋白質の分子進化について知見を得た。

多ヘム蛋白質については、今回の解析が世界ではじめての精密解析である。今回の精密構造解析の結果、多くの物理化学的性質を構造の立場から理解するための基盤を確立することができた。

論文の審査結果の要旨

樋口君の論文は、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki Fから抽出・精製したチトクロムC₃をX線結晶解析法で構造決定し、チトクロムC₃の構造と機能に関する研究をまとめたものである。構造解析は、結晶化、重原子同型置換体作成、位相決定等の随所に新しい方法を開発しながら行い、2.5 Å分解能での構造決定に成功した。

さらに、1.8 Å分解能における構造精密化を行い、47個の水分子を同定するとともに、水素結合や二次構造の存在様式を明らかにした。この構造精密化は、結晶学的なR₁因子が17.6%、また測定されたチトクロムC₃中の各結合距離は低分子化合物から得られた標準値からの平均二乗誤差が0.017 Åと、現在のタンパク質構造の精密化の最高水準に達している。

この解析は、フランスのHaserによる *Desulfovibrio desulfuricans* NorwayのチトクロムC₃の解析（座標値が未発表で、詳細な構造は不明）に少し遅れたものの、一次構造のホモロジーが30%と低い両者の立体構造の比較によって、進化過程における立体構造の保存とアミノ酸残基の変異に関する新しい多くの知見を得た。

構造の精密化に成功したため、分子中に存在する4個のヘムの構造差、各ヘムの溶媒領域への露出度、各ヘムとペプチド鎖およびアミノ酸側鎖との立体的位置関係など詳細に検討することが可能となった。これらの検討から、他の研究グループによって測定されていたマクロスコピックな4つの酸化還元電位を4個のヘムのそれぞれに帰属する方法を提出した。立体構造に立脚して酸化還元電位を解釈しようとするこの新しい試みは、構造と機能の関連をより深く理解するものとして高く評価できる。

以上、同君の研究はチトクロムC₃の精密構造解析を通じ、生体高分子に関する物理化学的研究の端緒を開いたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。