

| | |
|--------------|--|
| Title | Redox Properties of Cytochrome c3 Regulated by Heme Environments |
| Author(s) | 高山, 裕生 |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46495 |
| 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 | たかやま ゆう き 高 山 裕 生 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 第 20034 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 18 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻 |
| 学位論文名 | Redox Properties of Cytochrome c_3 Regulated by Heme Environments (ヘム環境により制御されるシトクロム c_3 の酸化還元特性) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 阿久津秀雄 (副査) 教授 長谷 俊治 助教授 池上 貴久 |

論 文 内 容 の 要 旨

自然界には窒素サイクルと硫黄サイクルという 2 つの重要な代謝系がある。その 1 つである硫黄サイクルに関わっている硫酸還元菌は、絶対嫌気性細菌で硫酸イオンを硫化水素に還元する。その電子伝達系を構成するたんぱく質の中で、シトクロム c_3 はペリプラズムで最もたくさん生産されている。シトクロム c_3 は 1 分子中に 4 つの c 型ヘムを持ち、各ヘムの酸化還元電位は -245 から -360 mV である。この値は、シトクロム c の $+260$ mV に比べて著しく低い。本研究では、なぜ、そしてどのような機構でこのような低い酸化還元電位を示すのかを部位特異的の変異法を用いて明らかにする。対象としたアミノ酸は、たんぱく質のフォールディングや電子移動に関わると言われる芳香族アミノ酸、酸化還元で側鎖の構造変化が見られる Thr24、そして酸化還元電位を制御していると言われる 4 つのビスヒスチジンの各配位子である。

シトクロム c_3 は 4 つの酸化還元中心を持つので、各ヘムに対する影響を直接調べることは難しい。そこで、たんぱく質が還元される巨視的な情報を電気化学的手法で、各ヘムが還元される微視的な情報を核磁気共鳴 (NMR) 法で得た。構造情報は NMR を用いて主鎖のアミドプロトンと配位しているヒスチジンのイミドプロトンのシグナルから、加えて X 線結晶解析から得た。また、一酸化炭素置換が起こったシトクロム c_3 の性質を、NMR と可視吸収スペクトルの変化から明らかとした。この機能とアミノ酸置換から明らかとなった構造的性質について議論する。

芳香族アミノ酸置換体における酸化型ヘムの安定化への寄与は、たんぱく質全体に対するものと局所的なヘムにのみ対するものの 2 種類に分けられた。前者は、たんぱく質内部の疎水的環境を整えて、フォールディングに寄与すると考えた。後者は、芳香環と配位子のイミダゾール環が π - π 相互作用をしているものと、配位子ヒスチジンのイミダゾール環の向きを調整しているものが考えられた。シトクロム c_3 ファミリー内でヘム結合モチーフを基にサブファミリーの分類を提案して、その中で保存されているアミノ酸のみ変化が見られた。

Thr24 の側鎖は、酸化型では 3 つの、還元型では 1 つの水素結合を形成する。酸化還元で変化する 2 つは、配位子とヘムのプロピオン酸との水素結合である。変異体の構造は、配位子を含め野生型の構造と変わらなかった。しかしヘム 3 の酸化還元電位が上昇したため、2 つの水素結合が酸化型のヘム 3 を安定化していると考えた。

次に、配位子の影響を調べた。第 5 配位子置換体は、ヘムの共有結合が行われなかったことから、 c 型ヘムを形成するための認識残基であると考えた。第 6 配位子置換体はヘムが共有結合して、置換したメチオニンが配位している

と考えられた。酸化還元電位への影響はヘム1と4の配位子置換体が大きく、ヘム2と3のものは小さかった。ヘム1と4の大きな変化は配位しているヒスチジンがイミダゾレート型になっているためと考えた。またヘム1の置換体はヘム全体に影響を与え、芳香族アミノ酸置換体で見られたものと同じであった。このことから環状ヘムの構造が酸化型の安定化に寄与していると考えた。以上の寄与から、シトクロム c_3 の低い酸化還元電位を保つ要因の一部を説明できた。しかし、実際の酸化還元電位は本研究では明らかにできなかった要因として、例えば溶媒への露出度やヘムのひずみ、電荷などの影響が考えられる。

一酸化炭素を唯一の炭素源として生育する硫酸還元菌は、電子伝達系の変化が示唆される。しかしペリプラズムでシトクロム c_3 に代わるたんぱく質はない。本研究から一酸化炭素を結合したシトクロム c_3 は電子伝達機能を残していると考えられた。またその結合部位は、配位構造が他のヘムとは異なる上、 $\pi-\pi$ 相互作用とイミダゾレートによる安定化が見られないヘム2で、さらにその第6配位子であると決定した。これによりヘム2の特殊性が機能、構造の点から明らかとなったと考えている。

論文審査の結果の要旨

硫酸還元菌由来のシトクロム c_3 は1分子中に4つの *c*型ヘムを持つ分子量 14 kDa の電子伝達蛋白質である。この蛋白質の特徴は、広く知られているシトクロム *c* と比べて著しく低い酸化還元電位を示すことにある。学位申請者は、どのような機構でシトクロム c_3 の酸化還元電位が低く保たれているのかを部位特異的変異法から明らかにするとともに、硫酸還元菌におけるシトクロム c_3 の新しい機能を提案した。始めに、酸化還元電位を低く保つ役割を持つアミノ酸として、芳香族アミノ酸、軸配位子、酸化還元で構造変化を起こす Thr24 を選択した。NMR と電気化学的手法を組み合わせることで各ヘムへの変異による影響を調べただけでなく、結晶構造解析を併用した。これらの解析により、個々のアミノ酸が酸化還元電位に与える寄与を見積もっている。次に、一酸化炭素に結合したシトクロム c_3 の役割を吸収スペクトルと NMR から解析を行った。これにより、一酸化炭素がシトクロム c_3 の特定のヘムに結合することで、硫酸還元菌の呼吸系を変化させる分子スイッチの役割を果たす可能性を示唆した。またこれらの結果を基になぜシトクロム c_3 が4つのヘムを持つのかという疑問に答える1つの可能性を示した。

この研究はシトクロム c_3 の酸化還元電位を維持する機構を構造的知見とあわせて明らかにした重要な成果である。また、一酸化炭素の結合したシトクロム c_3 の機能は硫酸還元菌における新しい電子伝達系を理解する上で重要な結果である。よって、本論文は理学博士の学位論文として十分な価値があるものと認める。