



Title	Regulation Mechanism of Electron Transfer between Cytochrome c3 and [NiFe] Hydrogenase
Author(s)	八幡, 直樹
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46504
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 や 八 幡 直 樹

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 19860 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 12 月 26 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 Regulation Mechanism of Electron Transfer between Cytochrome c_3 and [NiFe] Hydrogenase
(Cytochrome c_3 と [NiFe] hydrogenase 間の電子移動制御機構)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 阿久津秀雄

(副査)

教 授 長谷 俊治 教 授 中川 敦史 助教授 高橋 聡

論 文 内 容 の 要 旨

硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来のシトクロム c_3 は、1 分子中に 4 つの c 型ヘムを持つ分子量約 14000 の電子伝達タンパク質である。また、その生理的パートナーとして知られている [NiFe] ヒドロゲナーゼは、水素分子の可逆的酸化還元反応を行う分子量約 91000 の酵素である。これら 2 つのタンパク質は硫酸還元菌の水素代謝において重要な役割を果たしている。また、シャトルタンパク質として働いているシトクロム c_3 の 4 つのヘムは環状に配置しており、電子授受にはどのヘムも使われる可能性がある。よって、パートナーとの電子授受機構を知ることにより、4 つのヘムが環状に存在する意義が明らかになると考えられる。そこで本研究では、Miyazaki F 株由来のシトクロム c_3 と [NiFe] ヒドロゲナーゼの電子授受の仕組みを調べることを目的とした。

まず、2 つのタンパク質の電子移動複合体形式を調べる為に、NMR による解析を行った。ヒドロゲナーゼ存在下におけるシトクロム c_3 の化学シフトの変化が、酸化型ではヘム 4 近傍の残基に変化が集中していたことから、ヘム 4 周辺領域がヒドロゲナーゼと接触することが示された。一方、還元型に関しては、ヘム 4 周辺に加えて、ヘム 1 とヘム 3 の間の領域にも大きな変化が見られ、この領域は、ヒドロゲナーゼとの新たな相互作用部位であると考えた。酸化型については詳細な結合様式を知るために複合体のモデリングを行った。さらに、実際の電子移動に対する表面残基の役割を調べるために、ヒドロゲナーゼによるシトクロム c_3 変異体の還元速度の測定を行い、ヘム 4 周辺のリジンがヒドロゲナーゼとの相互作用に重要な役割を果たしていることが示された。

続いて、ヘム 3、4 とは、離れたところの変異がヘムの酸化還元電位およびヒドロゲナーゼとの相互作用にどのような影響を与えているかを検討した。近年当研究室で決定された還元型構造から、酸化還元に伴って構造変化が起こることが示された Tyr43 の近傍に存在する Glu41 に注目し、E41K 変異体を作製した。酸化還元電位の変化を踏まえて、ヒドロゲナーゼによる E41K 変異体の還元速度の測定を行った。そのプロットから得られた K_m は野生型と変わらなかったため、Glu41 はヒドロゲナーゼとの相互作用には関わらないことが示された。また、ヘム 4 の酸化還元電位に変化が見られなかったため、 k_{cat} が影響を受けなかったことから、ヘム 4 が主な電子の入り口として働いていることが支持された。

以上の結果から、シトクロム c_3 はヘム 4 周辺と接触をして、少なくとも還元初期段階では、ヘム 4 のみから電子

を受け取っていることが示された。また、還元状態での実験結果から、ヘム1とヘム3の間の領域が新たな相互作用領域である可能性が示唆された。ここで、シトクロム c_3 の第一酸化段階におけるヘム3の酸化還元電位が一番低いことから、ヘム3が電子を供給する際のゲートとして働いている可能性が考えられる。このことから、シトクロム c_3 の4つのヘムは電子移動経路を選択するスイッチャーとして働いている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

硫酸還元菌 *D. vulgaris* Miyazaki F 株由来のシトクロム c_3 は、1分子中に4つの c 型ヘムを持つ分子量約 14000 の電子伝達タンパク質である。また、その生理的パートナーとして知られている [NiFe] ヒドロゲナーゼは、水素分子の可逆的酸化還元反応を行う分子量約 91000 の酵素である。これら2つのタンパク質は硫酸還元菌の水素代謝において重要な役割を果たしている。学位申請者は、シトクロム c_3 と [NiFe] ヒドロゲナーゼの電子授受機構を解明するとともに、シトクロム c_3 の4つのヘムが環状に存在する意義を明らかにすることをめざした。まず、2つのタンパク質の電子移動複合体を調べる為に、NMR による解析および複合体のモデリングを行っている。次に、実際の電子移動に対する表面残基の役割を調べるために、ヒドロゲナーゼによるシトクロム c_3 変異体の還元速度の測定を行い、ヘム4周辺のリジンがヒドロゲナーゼとの相互作用に重要な役割を果たしていることを示し、電子移動複合体のモデルを提案した。さらに、これを検証するためにヘム4の反対側にある Glu41 の変異がヘムの酸化還元電位およびヒドロゲナーゼとの相互作用に与える影響を解析した。その結果、ヒドロゲナーゼとの相互作用にほとんど影響を与えないことが分かり、上記のモデルが支持された。また、還元状態での実験結果から、電子の授受に関与するヘムが異なる可能性が示唆された。

この研究はシトクロム c_3 と [NiFe] ヒドロゲナーゼの電子授受機構の構造的基礎を明らかにした重要な成果であり、タンパク質における電子移動機構の解明に寄与するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認める。