

Title	The x-ray structural analysis of Physarum polycephalum cytochrome b5 reductase
Author(s)	金, 相佑
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48780
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	金 相 佑
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 21496 号
学位授与年月日	平成 19 年 6 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	The x-ray structural analysis of <i>Physarum polycephalum</i> cytochrome b_5 reductase (真正粘菌のシトクロム b_5 還元酵素の X 線構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武 (副査) 教授 中川 敦史 准教授 鈴木 守

論文内容の要旨

真正粘菌 (*Physarum polycephalum*) は森などの湿った場所に生息している真核生物で、環境に応じて、多核変形体、孢子、アメーバなどの異なる形態に変化する。変形体は環境によって 50%以上の蛋白質が分解されることと変形するあいだ酵素の活性が低下される特徴がある。シトクロム b_5 還元酵素 (cyt b_5R) は FAD を持つ酵素で、膜結合型と水溶性型がある。膜結合型は両親媒性で小胞体の膜に存在する。脂肪酸代謝、コレステロール生合成、ステロイドホルモン代謝、cyt P450 依存性の薬物代謝に関わるなど、非常に多様な機能を有している。また赤血球中に存在する水溶性型は、機能的なヘモグロビンをメトヘモグロビンに還元する系において、電子伝達に関わっている。

本研究では、真正粘菌における cyt b_5 -cyt b_5R 系の反応メカニズムを理解するため、cyt b_5R の X 線結晶構造解析を行った。得られた構造から cyt b_5 -cyt b_5R 複合体の構造を予測し、その電子移動メカニズムを提案した。また、立体構造と熱転移に関して cyt b_5R ファミリー間で比較を行い、本酵素の構造と耐熱性の関係を調べた。

方法

真正粘菌 cyt b_5R の、N-末端側から 33 残基を欠いた組み換え酵素を大腸菌で発現させ、ゲルろ過とアフィニティークラムで精製した後、蒸気拡散法によりこれを結晶化した。結晶化条件は次の通りである。200 mM NaI と 50 mM *n*-(2-acetamido) iminodiacetic acid バッファー (pH 7.0) に 18-20%の PEG4000 を加えた結晶化溶液を用意し、本溶液 1.5 μ l と 0.7% (v/w) のタンパク質溶液 (pH 7.0) 1.5 μ l を混ぜた。293 K で 1 週間静置した後、0.6 \times 0.08 \times 0.1 mm の結晶が得られた。氷晶防止剤に 25%グリセロールを用い、この結晶を液体窒素で凍らせた後、SPring-8 の阪大蛋白研 beam line 44XU において、X線回折データを収集した。反射イメージは DENZO で処理し SCALEPACK でスケーリングした。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ で格子定数は $a=101.08\text{\AA}$ 、 $b=136.37\text{\AA}$ 、 $c=45.72\text{\AA}$ であった。非対称単位あたり 1 個の分子を含み、マッシュューズ係数の値が $2.49\text{\AA}^3/\text{Da}$ 、溶媒含有量が 50.7% であった。ヒト cyt b_5R 原子パラメータ (PDB コード: 1UMK) を用いた分子置換法を MOLREP (CCP4) によって行い、SFALL (CCP4) で初期位相を計算した。これを SIGMAA (CCP4) にかけた後、電子密度図を得た。この電子密度図に構造モデルを置き、COOT で合わせ、REFMAC5 と CNS で精密化した。溶媒分子は ARP/wARP を使用することで自動的に発生

させ、タンパク質原子と共に精密化した。精密化の度合いは R_{free} 値の減少によって判断した。精密化された構造の評価は *PROCHECK*で行った。さらに、*cyt b₅*-*cyt b₅R* 系の反応メカニズムに関して、モデルの提唱を行った。また、示差走査熱量計 (DSC) による熱安定性、疎水性結合、水素結合、キャビティを調べることで、酵素の安定性を考察した。

結果

真正粘菌 *cyt b₅R* の構造を 1.56 Å 分解能で決定することができた。本酵素は FAD を有し、NADH 結合部位にはグリセロール分子が存在していた。FAD のリボフラビンリングは、水素結合と van der Waals 相互作用により、FAD 結合ドメインの F β 4 にしっかりと結合していた。ファミリー内の他のタンパク質と比べ、真正粘菌 *cyt b₅R* のリンカー領域 (Gly145-Lys155) は 16 残基が欠損されていた。ふたの領域 (Val119-Lys122) においても残基が欠損され、7 Å 短かった。このため、FAD の AMP 部分の相互作用が無く、AMP の構造は他のファミリータンパク質のそれと異なっていた。真正粘菌における *cyt b₅R*-*cyt b₅* 系の電子移動メカニズムを理解するため、計算機上でこの複合体モデルを作成した。このモデルから FAD ドメイン F4 β の Glu96-Pro100 が、*cyt b₅* の $\alpha 4\alpha 5$ 間ループの Gly62-T65 と相互作用することが考えられた。また *cyt b₅R* の His85 は、*cyt b₅* のヘム *b* のプロピオン酸基と水素結合をすることが考えられた。以上のことから、NADH のニコチンアミド部分と FAD のフラビンリングの π - π スタッキング相互作用、及び同フラビンリングと *cyt b₅R* の His85 の π - π スタッキング相互作用により、電子が伝達されると予想した。また、真正粘菌とヒトの *cyt b₅R* の耐熱性比較から、疎水性結合が *cyt b₅R* の構造安定性を決める重要な要素であることが分かった。

論文審査の結果の要旨

真性粘菌は生活環境の変化に応じて異なった形態に変化する。栄養分が乏しい環境では自らの蛋白質の 50%以上を分解し、新しい蛋白質の合成に使う。そのために同じはたらきをする蛋白質でもヒトなどのものと比べて不安定な場合が多い。本研究では、真性粘菌のシトクロム *b₅* 還元酵素の X 線結晶構造解析を 1.56 Å 分解能で行った。これはヒトの酵素を初めとするシトクロム *b₅* 還元酵素の構造解析で最高の分解能である。この構造とヒトの酵素の構造を比較して、真性粘菌の酵素の変性温度が低い理由は疎水性相互作用が弱いことが主要な要因であることを明らかにした。

また、この構造に基づいてシトクロム *b₅* を還元する機構を明らかにすることが出来た。即ち、酵素の NADH から FAD、さらに酵素中の His85 を経てシトクロム *b₅* のヘム鉄へ電子が輸送される仕組みを明らかにすることが出来た。

この研究は蛋白質の熱安定性要因の解明と酵素反応機構の理解に大きく貢献するものであり、博士 (理学) の学位に値するものであると認める。