

Title	Structural Studies on Ferricytochrome c' from Rhodospirillum rubrum
Author(s)	安井, 正憲
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3089978">https://doi.org/10.11501/3089978</a>
DOI	10.11501/3089978
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏 名	安 井 正 憲
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 3 0 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 4 月 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Structural Studies on Ferricytochrome <i>c'</i> from <i>Rhodospirillum rubrum</i> ( <i>Rhodospirillum rubrum</i> チトクロム <i>c'</i> の構造学的研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 笠 井 暢 民  教 授 松 田 治 和    教 授 園 田 昇    教 授 村 井 真 二  教 授 大 城 芳 樹    教 授 竹 本 喜 一    教 授 坂 田 祥 光

### 論 文 内 容 の 要 旨

チトクロム *c'* は光合成細菌や脱窒菌の電子伝達系に存在するヘム蛋白質でミトコンドリアのチトクロム *c* とは異なり高スピンのヘム鉄を持っている。通常約130個のアミノ酸残基から成り、ダイマーとして存在している。これまでに約10種のチトクロム *c'* の一次構造が決定されており、そのうち *Rhodospirillum molischianum* のチトクロム *c'* (MCP) については立体構造も解明されている。本研究では光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* のチトクロム *c'* (RCP) について X 線結晶構造解析を行い、MCP との構造比較、ヘム鉄のスピン状態とヘム周辺の構造の関係について検討した。

結晶は沈澱剤として PEG4000 を用い透析法で得た (空間群  $P6_1$ ;  $a=51.72$ ,  $c=155.49$  Å)。構造解析はまず 6 Å 分解能で白金 ( $K_2PtCl_6$ ) 及び水銀 ( $CH_3HgCl$ ) 誘導体を用いた多重同形置換法で行った。その結果得られた電子密度から結晶内での分子の境界を決定し、更にダイマー分子が8本のヘリックスからできていることが分かった。

また、多重同形置換法と並行して、分子内のヘム鉄の異常分散効果をシンクロトン放射光から取り出した3種の波長で測定し、その回折強度データをもとに構造解析を行なった。この多波長異常分散法はこれまで理論的には可能であることが示されていたが、今回初めてこの方法が蛋白質の構造解析に適用できる事を実証した。

2.8 Å 分解能の解析では重原子同形置換法で得られた電子密度図を改良する為に、非対称単位中にダイマー分子が1個存在することを利用して、2つのモノマー分子の電子密度を平均し位相精密化を行った。その結果、C末端の4残基を除いてはほとんどの部分の主鎖を改善した電子密度中に容易にトレースすることができた。そこで分子モデルをコンピューターグラフィクスを使って作成し、続いて構造の精密化を行なった。

MCP と RCP の一次構造の類似度は約24%と低いにもかかわらず両者の主鎖の folding は非常に良く似ていた。RCP のダイマーは同一のサブユニット2個から成り、それぞれは4本の  $\alpha$ ヘリックスとそれらをつなぐ3つのループからできている。隣りあうヘリックスは互いに逆平行に走っており左巻によじれた4本のヘリックスの束 (Helix bundle) を作っている。RCP と MCP のサブユニットの構造を最小2乗法により重ね合わせたところ構造上等価な C $\alpha$ 間の距離は平均で約2.3 Åであった。またダイマーを形成しているサブユニット間の相互作用は、MCP ではおもに隣接する

ヘリックス間の van der Waals 相互作用であるのに対し RCP では水素結合などの静電的相互作用であった。サブユニットの構造が比較的良好に類似しているのに対してダイマーを構成しているサブユニットの配置はかなり異なっていた。この配置をヘリックスの軸間の距離、角度を用いて比較したところ、同一サブユニット中では値が2つのチトクロム  $c'$  で良く一致しているのに対して、異なるサブユニットに属するヘリックス間では、特に角度の違いが大きい事が分かった。

ヘム鉄原子への配位様式は、MCP では5配位であると想像されていたが、今回の解析からそれを確定することができた。また、他のチトクロム  $c'$  の一次構造からこの「5配位」はチトクロム  $c'$  一般にみられる特徴であると考えられると同時にチトクロム  $c$  など他の電子伝達に関与する蛋白質が「6配位低スピン構造」になっているのとは対照的である。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* のチトクロム  $c'$  (RCP) についてX線結晶構造解析により分子構造を求め、すでに立体構造の解明されていた *Rhodospirillum molischanum* チトクロム  $c'$  (MCP) との構造比較を行い、更にヘム鉄のスピン状態とヘム周辺の関係について検討したものである。主な成果を要約すると次の通りである。

- 1) PEG4000を沈澱剤として透析法で得た結晶(空間群 $P6_1$ ;  $a=51.72$ ,  $c=155.49\text{\AA}$ )を用い、構造解析はまず $6\text{\AA}$ 分解能で白金( $K_2PtCl_6$ )及び水銀( $CH_3HgCl$ )誘導体を用いた多重同形置換法で行った。その結果得られた電子密度から結晶内での分子の境界を決定し、更にダイマー分子が8本のヘリックスからできていることを明かにしている。
- 2) これと並行して、分子内のヘム鉄の異常分散効果をシンクロトロン放射光から取出した3種の波長のX線で測定し、その回折強度をもとに構造解析を行ったところ正しい構造が得られ、これまで理論的には可能であると云われていた多波長異常分散法が蛋白質の構造解析に有効であることを初めて実証している。
- 3) 次に精度を上げた $2.8\text{\AA}$ 分解能の解析では、低分解能解析で得られた電子密度図を改良する為、非対称単位中にダイマー分子が1個存在することを利用して、2つのモノマーの電子密度を平均し位相精密化を行い、改善した電子密度中にC末端の4残基を除くほとんどの部分の主鎖の流れを見いだしている。
- 4) そこで分子モデルをコンピュータグラフィックスを使って作成、続いて構造の精密化を行ったところ、MCPとRCPの一次構造の類似度は約24%と低いにもかかわらず、両者の主鎖のfoldingの状況は非常に良く似ていることを見いだしている。
- 5) MCPのダイマー構成は主に隣接するヘリックス間の van der Waals 相互作用であるのに対し、RCPでは水素結合などの静電的相互作用で、ダイマーを構成しているサブユニットの配置はかなり異なっていることを明かにしている。
- 6) ヘム鉄原子への配位様式は、MCPでは5配位であると想像されていたが、今回のRCP解析により予想通りであったことを見いだしている。
- 7) また、この「5配位」はチトクロム  $c'$  一般にみられる特徴であると考えられ、チトクロム  $c$  など他の電子伝達に関与する蛋白質が「6配位低スピン構造」になっているのとは対照的であることを明かにしている。

以上の成果は生物化学、構造化学に大きく貢献するのみならず、生物化学工業的にも意義深く博士論文として価値あるものと認める。