

## 高度好熱菌由来シトクロム $c_{552}$ を利用した ペルオキシダーゼ不安定中間体の観測

○市川祐介、中島洋、渡辺芳人（名大院理）

[ichikawa@mbox.chem.nagoya-u.ac.jp](mailto:ichikawa@mbox.chem.nagoya-u.ac.jp)

ペルオキシダーゼはヘム酵素の触媒する反応で、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を酸化剤として、基質 2 分子を一電子酸化する。ペルオキシダーゼの反応サイクルでは、3つの反応中間体（ヒドロペルオキシヘム中間体, compound 0; オキソフェリルヘム  $\pi$  カチオンラジカル中間体, compound I; オキソフェリルヘム中間体, compound II) の存在が知られている (図 1)。

これらうち、compound I, II については、安定化が可能であり、結晶構造解析にもとづく分子構造の解明や詳細な反応性の解析が既に行なわれている。一方、compound 0 の寿命はきわめて短く、これまで 77-160 K の極低温状態で観測がなされているのみで、室温での観測および反応性の解析例はこれまでない。

compound 0 が不安定な理由として、鉄に配位した過酸化水素の遠位側酸素原子が、近傍のプロトン化されたアミノ酸残基側鎖、または  $\text{H}_2\text{O}$  からプロトンを引き抜き、compound Iに移行するからだと考えられる。したがって、生成した compound 0 近傍からプロトン源を除去することにより、compound 0 の安定化つながる可能性がある。

本研究では、上述の考えに基づき、高度な疎水性ヘム空間を有するシトクロム  $c_{552}$  (Cyt  $c_{552}$ , PDB: 1C52) を用いて、compound 0 の室温での長寿命化を試みた。このタンパク質は高度好熱菌に由来するヘムタンパク質である。耐熱化のため、ヘム空間内には疎水性アミノ酸残基による相互作用が複数みられ、プロトンの授受が可能な解離性残基や  $\text{H}_2\text{O}$  は存在しない。Cyt  $c_{552}$  のヘムは、His<sup>15</sup> と Met<sup>69</sup> を軸配位とする六配位構造であるため (図 2)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応には、Met<sup>69</sup> を Ala に置換し、ヘム上に配位サイトを有する M69A 変異体を用いた。

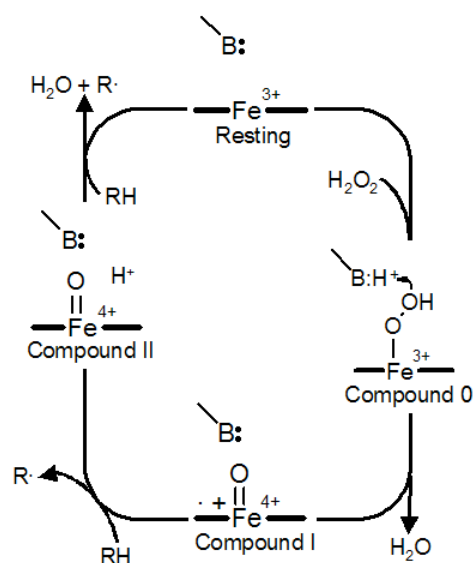


図 1 .ペルオキシダーゼの反応サイクル。 — $\text{Fe}^{n+}$ —, ヘム

**実験)** 高度好熱菌 *Thermus Thermophilus* 由来 Cyt  $c_{552}$  の大量発現には、大腸菌 JM109(DE3) 株を宿主とし、pET22b を発現用ベクターとする組み換え体発現系を用いた。大腸菌で発現した Cyt  $c_{552}$  は超音波破碎による緩衝溶液(20 mM MES-NaOH pH 5.0)への抽出、70°C、10 分間の熱処理による複雑蛋白質の変性、陽イオン交換カラムにより精製をした。蛋白質の改変は、部分特異的アミノ酸置換法を行った。ESR スペクトルは E500 X-band CW-EPR(Burker) を用いて、4K で観測を行った。

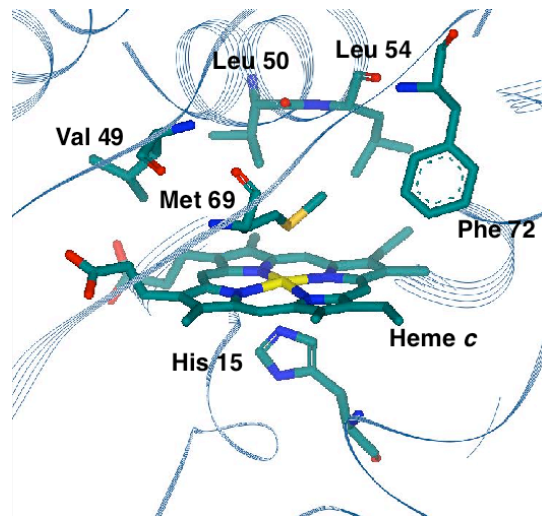


図 2. 野生型 Cyt  $c_{552}$  変異体のヘム近傍構造 (PDB 1C52)

**結果)** M69A 変異体と 100 等量の  $H_2O_2$  とを室温で反応させたときの EPR スペクトルを図 3 に示す。低スピン領域に  $g = 2.00$  の有機ラジカル由来のシグナルの他に、斜方性を有する 2 種類のシグナル ( $g = 2.290, 2.150, 1.950$  および  $2.241, 2.150, 1.967$ ) がみられる。既報の EPR スペクトルの  $g$  値との比較から、 $g=2.290$  のシグナルは、compound 0 に帰属できることがわかった。この compound 0 は、室温で安定に存在し、徐々に compound II とタンパク質ラジカルに変化する。 $g=2.241$  のシグナルは、compound 0 の遠位側酸素からプロトンが脱離したペルオキシヘムと既報で同定されていたが、本実験系では、この中間体の生成は考えにくく、また  $D_2O_2$  を用いた同位体効果の実験からも否定的である。今のところ、compound 0 の構造異性体であると考えている。

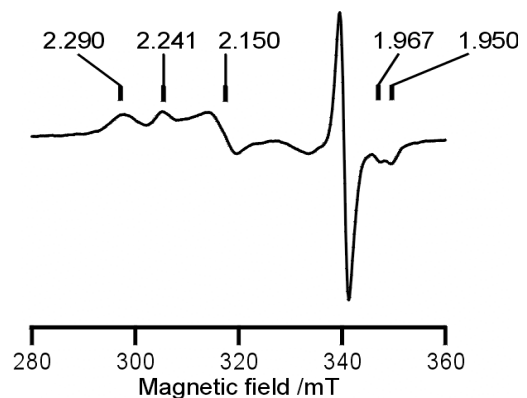


図 3. Cyt  $c_{552}$  M69A 変異体と過酸化水素との反応の EPR スペクトル  
Cyt  $c_{552}$  M69A 100  $\mu$ M,  $H_2O_2$  10 mM  
50 mM MES-NaOH pH 5.0

以上、Cyt  $c_{552}$  の疎水性ヘム空間を用いることにより、ペルオキシダーゼの反応中間体 compound 0 の安定化を実現した。講演では、今回捕らえた compound 0 の酸化剤としての反応性についても述べる。