

4ヘムたんぱく質シトクロム c_3 における軸配位子置換体の影響

○高山 裕生^{1,2}, 安川 文子³, 小森 博文⁴, 森田 久美子⁴,
赤木 謙一¹, 小澤 潔³, 樋口 芳樹⁴, 阿久津 秀雄¹

(¹阪大 蛋白質研究所, ²科学技術振興機構, ³横国大 工学部, ⁴兵庫県立大 理学部)
takayama@protein.osaka-u.ac.jp

【緒言】

硫酸還元菌は絶対嫌気性細菌で、硫酸イオン (SO_4^{2-}) を硫化水素 (H_2S) に還元する反応と共役してエネルギーを獲得する。この嫌気的な呼吸系は硫酸呼吸と呼ばれている。硫酸呼吸において重要な役割を担うたんぱく質の1つにシトクロム c_3 がある。シトクロム c_3 は1分子中に4つのc型ヘム(全てビスヒスチジン配位)を持ち、それぞれのヘムが低い酸化還元電位を示す電子伝達たんぱく質である。

一般的によく知られているシトクロム c のヘムは His-Met 配位で正の酸化還元電位を持つ。シトクロム c は好氣的呼吸で働き、シトクロム c_3 は硫酸呼吸で働くため、酸化還元電位に違いがある。たんぱく質レベルでの酸化還元電位に関する研究は表面電荷や溶媒の露出度により説明されてきた。またビスヒスチジン配位は酸化還元電位を低く保つ要因であると言われている。本研究では4ヘムたんぱく質における配位子 His の役割を部位特異的変異法を用いることで明らかにする。

【方法】

シトクロム c_3 は、当研究室で開発した *Shewanella oneidensis* を宿主とするc型ヘムたんぱく質の大量発現系を用いて発現させた。硫酸分画、疎水カラムクロマトグラフィ、陽イオン交換カラムクロマトグラフィを用いて精製を行った。

4つのヘムの酸化還元電位は、電気化学的手法と核磁気共鳴法(NMR)を併用することで決定した。すなわち、微分パルスポーラログラフィによりたんぱく質全体における酸化還元電位を決め、NMRによりそれぞれのヘムの還元率を求めることで、Nernst式から各ヘムの酸化還元電位を求めた。

可視吸収スペクトルと質量分析、円二色性の測定からたんぱく質の安定性を評価した。また2-メチル-2,4-ペンタジオールを沈殿剤に、蒸気拡散法で結晶化を試みた。

【結果と考察】

第5配位子、第6配位子 His をそれぞれ Met に置換したシトクロム c_3 を作製した。第5配位子置換体ではヘムのソーレー帯に由来する吸収スペクトルが減少していた。質量分析を行ったところ、ヘム1つ分(およそ618)に相当する分子量が減少していた。そのため、第5配位子置換体ではヘムが共有結合していないと考えられた。このことから第5配位子 His はヘムがアポシトクロム c_3 に共有結合するために必

須の残基であると考えた。第5配位子置換体はヘムがはずれているため、酸化還元電位への影響は第6配位子置換体について解析を行った。

はじめに、第6配位子置換体の配位子を決定するためX線結晶構造解析を試みた。今回、ヘム3の置換体、H25M シトクロム c_3 について結晶構造が得られた。結晶格子は野生型と同じ $P2_12_12_1$ で、分解能 1.5\AA で構造を決定した。その結果、導入した Met の S_{γ} が目的通り配位していた。得られた結晶はこの1つであったため、残りの3つの変異体（ヘム1, 2, 4）は還元状態における $^1\text{H NMR}$ スペクトルを比較した。NMR スペクトルから全ての置換体で Met が配位していることが示唆された。そこで酸化還元電位の比較を行った。

変異を導入したヘムの酸化還元電位は野生型と比べて $50\text{--}110\text{ mV}$ 上昇していた。これまで His-His 配位は His-Met 配位よりも 150 mV 酸化還元電位を下げると報告されているが¹⁾、それより小さい値であった。これはヘム間の相互作用がたんぱく質全体としての酸化還元電位を低く保つためであると考えられる。特にヘム1と4の変異体においては当該ヘム以外のほかの3つのヘムの酸化還元電位が平均 50 mV 程度上昇していた。ヘム1と4の変異体では酸化型 $^1\text{H NMR}$ スペクトルにおいて高スピンシグナルが現れたことから、配位構造が弱いことが示唆された。そのため、変異導入は酸化還元電位に与える影響が大きく、さらには当該ヘムのみならず、ほかのヘムの酸化還元電位にも影響を与えたと考えられる。

この配位構造を弱くする原因を考える。これまで EPR と NMR による鉄 d 軌道のエネルギー準位²⁾と共鳴ラマンによる研究³⁾から、シトクロム c_3 の第6配位子のうち2つの His ではイミダゾレートの性質が強いことが示唆されている。ヘム1と4でイミダゾレート性が強いと仮定すると、イミダゾール性が強いヘム2, 3よりも強い配位構造を持つと考えられる。そのため、Met 導入による配位構造を弱める影響はヘム1, 4の方に大きく現れ、酸化還元電位に与える影響も大きいと考えられる。

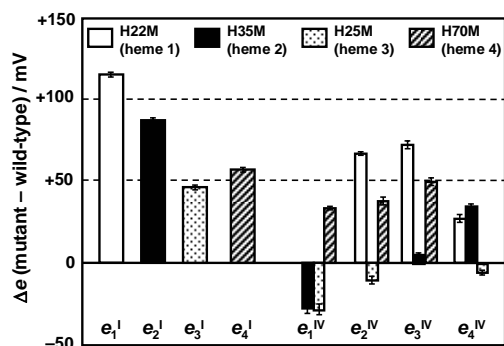


図 酸化還元電位の変化。上に変異の種類。野生型 (± 0) を基準に変異導入による酸化還元電位の変化を表す。 e_j^i は i 段階におけるヘム j の微視的酸化還元電位。第 I, IV 還元段階にそれぞれ当該ヘムとそれ以外のヘムを示す。

- 1) Gunner, M. R. and Honig, B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9151-9155.
- 2) Saitoh et al. (2004) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 357-363.
- 3) Kitagawa et al. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 494, 100-114.