2PA085

硫酸還元菌チトクロム c_3 の酸化型および還元型における動的構造

○福岡 由記, 原田 英里砂, 藤原 敏道,
阿久津 秀雄, (横浜国大・工)

【緒言】 絶対嫌気性菌のチトクロム c_3 は1分子中に4つヘムを持ち、分子量は約14000で細胞内のペリプラズムあるいは細胞膜に結合した形で存在している電子伝達タンパク質である。本研究ではNMRを用いて緩和時間、NOEを測定し、そのNMRシグナルを解析し、酸化型および還元型における動的構造を明らかにすることを目的とした。

【実験】 ^{15}N でフルラベルしたチトクロム c_3 を調製し、これを酸化状態、還元状態のNMRサンプルとした。得られた両状態のサンプルについてNMRスペクトルを測定した。

【結果と考察】 酸化型、還元型サンプルについて ^1H - ^{15}N 異種核2次元NMRにより分離観測された ^{15}N シグナルを用いて緩和時間である T_1 , T_2 と、 ^1H と ^{15}N の間で生じるNOEを解析した。 T_1 , T_2 よりもNOEのほうが内部運動による影響を敏感に受けるため、NOEについて酸化型と還元型を比較すると多くの部分では酸化型と還元型は同じようなパターンが見られたが、局所的に異なる部分があり、特にヘム4の近くでは両状態の運動性が異なっていると言える。また、NOEを比べてみると酸化型の方が還元型よりも全体として大きな値を示した。 T_1 の測定より酸化型シグナルでは常磁性のNOEに対する影響は小さいと考えられるので、酸化型と還元型ではタンパク質の運動性が異なると言える。

Y. Fukuoka, E. Harada, T. Fujiwara, H. Akutsu
Backbone dynamics of D.vulgaris cytochrome c_3 in the fully oxidized and reduced states

2PA087

ヘモグロビンβ鎖の疎水性残基Leu28による配位子結合反応の制御に関する研究

○小西一誠、石川春人、近藤詩乃、高橋 聡、
石森浩一郎、森島 績 (京大院・工)

近年、ミオグロビン(Mb)に代表される酸素結合ヘム蛋白質において、ヘムポケットの疎水性は配位子結合反応の重要な制御因子であると示唆されてきた¹⁾。本研究では、このようなヘムポケット内の疎水性による配位子結合反応の制御が他のグロビン蛋白質においても働いているかどうかを明らかにするため、酸素運搬ヘム蛋白質の一つであり、Mbと同様なヘム近傍構造を有するヘモグロビン(Hb)β鎖に着目した。Hbβ鎖のヘムポケット内の疎水性を変化させるため、ヘムポケット内に存在する疎水性残基であるLeu28を疎水性度のより小さいVal, Ala, Serに置換した変異体を作製し、その配位子結合反応を検討した。

配位子としてはCOを用い、野生型(WT)及び変異体のCO結合速度定数(k_{on})をレーザーフォトリシス法により測定した。Hbβ鎖におけるCO結合反応は、速い反応(k_{fast})と遅い反応(k_{slow})の二相性が示され、疎水性度の低いアミノ酸残基をLeu28の位置に導入するに従い、二つの速度定数はともに減少した(表1)。このような傾向は先に示したMbの研究²⁾と一致することから、Hbβ鎖においてもヘムポケットの疎水性による配位子結合反応の制御機構が働いていることが明らかとなった。このような変異体における k_{on} の減少の原因としては、配位子のヘム鉄への結合のエネルギー障壁となることが知られているヘムポケット内の水分子が、ヘムポケットの疎水性度の低下により安定化したためであると考えられた。今後、ヘムポケットの疎水性による配位子の結合状態への影響について詳しい情報を得るために、CO体のIR測定などを行い、ヘムポケットの疎水性による配位子結合反応の制御機構についてさらに考察していく予定である。

1)Uchida et al.(1997)J.Biol.Chem.272,30108-30114

表1.CO結合速度定数 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)

	WT	L28V	L28A	L28S
k_{slow}	3.7	0.676	0.098	0.057
k_{fast}	11	2.45	0.3	0.26
疎水性度	2.3	1.7	0.4	-0.1

2PA086

Shewanella チトクロム c_3 の酸化還元電位と軸配位子

○海津肇子、熊谷次郎、原田英里砂、小澤潔、今林慎一郎、¹A.Tsapin、¹K.H.Nealson、阿久津秀雄
(横浜国大・工、¹カリフォルニア工科大)

【緒言】 *Shewanella putrefaciens* はグラム陰性通性嫌気性菌である。この特色は、さまざまな嫌氣的電子受容体で生育できることである。この菌体のチトクロム c_3 はc型ヘムを分子内に四つ持ち、分子量12120、等電点5.8、アミノ酸残基91である。このタンパク質は四ヘムタンパク質としては最も小さい。本研究では、このチトクロム c_3 の微視的酸化還元電位と軸配位子についてNMRにより解析した。

【実験方法】 30mM ホウ酸緩衝液 (pH 9) の 2mM サンプルを用意し、ジチオナイトにより還元し、DRX400NMR装置を用いてNMRスペクトルを測定した。

【結果及び考察】 $p^2\text{H}^9$ における酸化還元電位の解析より、電位そのものを含めて、硫酸還元菌由来のチトクロム c_3 と性質が著しく異なることが分かった。一次構造を比較すると、ヘム結合部位および配位ヒスチジン部位に違いが見られる。一方、NMRスペクトルの0~20ppm付近の高磁場側にC2プロトンと思われるシグナルが6個しか観測されなかった。これらの点について検討を進めている。

T.Kaizu, J.Kumagai, E.Harada, K.Ozawa, S.Imabayashi, A. Tsapin, K.H.Nealson and H.Akutsu: Redox potentials and heme ligands of *Shewanella* cytochrome c_3

2PA088

亜鉛置換シトクロムP450camを用いた蛋白質間電子移動反応機構の解明

○古川良明、石森浩一郎、森島 績 (京大院・工)

シトクロムP450camはヘムを活性中心として有し、NADHからの電子を鉄硫黄蛋白質であるブチラゲドキシシン(Pd)によって供給されることにより、d-camphorに一原子酸素を添加する。このP450cam/Pd間の電子移動(ET)過程は酵素反応のメカニズムを理解する上で、重要な過程であるにも関わらず、その速度論的検討がNADHの消費速度などから行われてきたのみで、ET反応過程における分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究ではP450camにおけるET反応の制御因子を明らかにするため、ヘムをZnポルフィリンに置換し、Zn置換したP450cam(ZnP450)を光によって還元力の強い励起状態を形成させることでET反応を開始させ、P450camにおけるET反応を直接測定し、その機構の解明を試みた。

アクセプターとして、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ や OsCl_6^{3-} といったアニオン性の無機錯体を用いた場合、Znポルフィリンラジカル(ZnP450 $^{\cdot}$)に特徴的な700nm付近の吸収の増加が見られた。これは、ZnP450の光励起状態($^3\text{ZnP450}^*$)から無機錯体へとScheme 1のようにET反応が起きていることを示している。一方、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ や $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 等のカチオン性の錯体の場合、ZnP450 $^{\cdot}$ は観測されず、ET反応が起こらなかった。このようなアクセプターの荷電によってET反応

Scheme 1 電子移動スキーム

が選択的に起こることは、P450camにおけるET反応においては静電的相互作用が重要であり、またアニオン性のアクセプターのみがET反応を示したことは、P450camにおけるET反応サイトは正電荷のアミノ酸残基によって形成されていると推定できた。このことはP450camのPdとのET反応サイトがArgやLysといったカチオン性のアミノ酸残基からなると考えられていることとも一致し、ZnP450はこのET反応サイトを通して、静電的相互作用でET反応を制御していることが考えられる。つまり、生体内においてもP450camは、ET反応を起こす相手の蛋白質を静電的な相互作用で認識している可能性を示唆している。Y.Furukawa, K.Ishimori, I.Morishima: Electron Transfer Mechanism in Zn-substituted Cytochrome P450cam