1F1630

NMRによる完全還元型チトクロム c_3 の構造解析：ヘム構造と電子伝達の関わり

○原田 英里砂¹、大村 友章²、福西 有間¹、河合 剛太³、阿久津 秀雄^{1,4}（¹横浜国大・工、²三菱重工・横浜研、³千葉工大、⁴阪大・蛋白研）

【緒言】硫酸還元菌 Miyazaki F 株のチトクロム c_3 は 1 分子中に 4 つのヘムをもつ c 型ヘム蛋白質で、平均の酸化還元電位が -300mV と異常に低く、生体分子素子としての応用が検討されている。幸いこのチトクロム c_3 の完全酸化型の X 線結晶構造解析が行われ、高分解能 ($1.8\text{ \AA}$) の結晶構造が明らかにされている。本研究では完全還元型チトクロム c_3 の構造決定を NMR により行い、酸化還元電位と電子移動を制御している構造的要因を明らかにすることを目的とする。

【実験】安定同位体 ^{15}N 標識を行い、Bruker 600, 500, 400MHz の分光器で 303 K、pH7 の条件下、異種核多次元 NMR を測定した。その際、水素雰囲気下でヒドログナーゼを加え、チトクロム c_3 を完全還元させた。構造計算には X-PLOR を用いた。その際、ヘム面は固定せずに動けるようにし、チオエーテル結合情報、ヒスチジンの配位結合情報はそれぞれ距離情報として入力した。

【結果】Chemical Shift Index を含む Sequential NOE パターンから、結晶構造と比較して 2 次構造に大きな変化はなく、溶液中でも 2 次構造は保存されていることが分かった。構造計算の結果、現在の RMSD は主鎖で $0.52 \pm 0.08\text{ \AA}$ である。酸化型結晶構造と比較して、大部分の構造は似ているが、ヘム 1、ヘム 2 付近が中心に近づいておりヘム間距離が短くなっていた。同種の Hildenborough 株でも同様の報告がされており Miyazaki 株との共通点が多い。この構造変化はヘム 1、ヘム 2 の協同性と関係している可能性が高い。当研究室で作成された Tyr43 の変異体でもヘム 1、ヘム 2 のヘムメチルシグナルが大きくシフトしているのが観測されており、このあたりの残基はヘムの構造と性質に大きく関わる残基である可能性が高いと考えられる。

E. Harada, T. Ohmura, A. Fukunishi, G. Kawai and H. Akutsu : NMR structure analysis of ferrocytochrome c_3 : Relationship between heme structure and electron transfer

1F1700

アドレノドキシンとチトクロム P450_{scc} との分子間相互作用

○竹内 幸司¹、鏑木 基成¹、堀 洋²（¹姫工大・理・生命、²阪大院・基礎工・生物学）

チトクロム P450_{scc} によって触媒されるコレステロール側鎖切断はコレステロール側鎖の 22R 位水酸化、20S 位水酸化、C20-C22 間の切断、という 3 つの連続したモノオキシゲナーゼ反応からなる。必要な電子当量は 2Fe2S 型鉄イオウタンパク質・アドレノドキシン (Adx) から供給される。ひとつの反応サイクルは、基質の P450_{scc} への結合、還元型 Adx からヘム鉄への第 1 電子の供給、酸素分子への結合、還元型 Adx から酸素化型ヘム鉄への第 2 電子の供給、酸素活性化と基質の水酸化よりなる。電子伝達の際には、P450_{scc} 上の Adx 結合部位に Adx が結合した Adx-P450_{scc}-基質三者複合体が形成されると考えられる。今回、還元型 Adx の EPR シグナルを指標として、還元型 Adx と還元型 P450_{scc} との分子間相互作用を調べた。free の還元型 Adx の 77K における EPR スペクトルは $g=2.024$, $g=1.937$ の軸対称型シグナルを与える。これに基質無添加の還元型 P450_{scc} を加えてもスペクトルに変化は見られなかった。その状態にさらに CO を加えても変化は見られなかった。同様な測定を各種基質中間体 (コレステロール、22R-OH-コレステロール、22S-OH-コレステロール、25-OH-コレステロール)・類似体との三者複合体で行ったが、いずれの場合も変化は見られなかった。唯一、20S-OH-コレステロールを添加し、さらに CO を加えた場合にのみ変化が見られた。微分型 $g=1.937$ シグナルの谷 (346.8 mT) の部分が幅広くなり、 348.0 mT 付近に谷を持つシグナル種ができていたことがわかった。このスペクトル変化は還元型プナダレドキシニンにリガンド結合還元型 P450cam(d-camphor) を加えた際の変化と似ており、リガンド結合により引き起こされた分子間相互作用による構造変化がミトコンドリア型 P450-Adx 系においても起こっていると推定される。酸化型 Adx-酸化型 P450_{scc}-基質三者複合体での測定結果を合わせ、分子間相互作用について議論する。

K. Takeuchi, M. Tsubaki, H. Hori : Intermolecular interaction between adrenodoxin and cytochrome P450_{scc}

1F1645

Pseudo contact shift を用いた完全酸化型 cytochrome c_3 の磁氣的解析

○斉藤 貴士¹、堀 洋²、原田 英里砂¹、橘 良彦¹、阿久津 秀雄^{1,3}（¹横浜国大・工、²阪大・基礎工、³阪大・蛋白研）

硫酸還元菌の cytochrome c_3 は 1 分子中に 4 つの c 型ヘムを持つ分子量約 14000 の電子伝達タンパク質で、他の c 型ヘムに比べ非常に低い酸化還元電位を持つことを特徴としている。この特徴は分子構造と密接に関係していると考えられることから、本研究では溶液中での分子構造を NMR スペクトルによる NOE、及び各水素原子が 4 つのヘム鉄から受ける pseudo contact shift の大きさを利用し、明らかにすることを目的としている。今回用いた cytochrome c_3 は *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株、及び本研究室で開発された *shewanella* 菌を宿主とした大量発現系から精製し、最終的に SDS-PAGE で確認した。このサンプルをエタノールを沈殿剤とする蒸気拡散法により結晶化し、単結晶 EPR スペクトルの測定を行った。各結晶面内の g 値の角度変化から g テンソルの解析を行い、ステレオ投影図上で g 軸の方向余弦と X 線結晶構造解析によるヘムの法線を比較したところよい一致を示した。このことから今回の単結晶 EPR スペクトル測定から求めた g 値、及び各ヘムに対する帰属が正しいことが分かる。この g 値と X 線結晶構造解析による各水素原子の常磁性中心からの距離情報をもとに pseudo contact shift を計算し、NMR スペクトル測定から求めた測定値と比較した。ここで、計算値は結晶構造から求められた値、測定値は溶液構造から求められた値であり、いくつかの残基で大きなずれが観察された。この原因としては 1. 分子の表面に存在することから溶媒による影響を大きく受け溶液構造と結晶構造に違いが生じている部位 2. ヘム近傍に存在することから contact shift の影響を大きく受ける部位と考えられる。現在解析が進んでいる溶液の構造と比較することによりこれらの点を検討する予定である。

T. Saitoh, H. Hori, E. Harada, Y. Tachibana, H. Akutsu : Magnetical analysis by pseudo contact shifts in fully oxidized cytochrome c_3

1F1715

近位軸配位子が Fe-CO 振動に及ぼす影響：共鳴ラマン法によるシトクロム b562 多重変異体の解析

○宇野 公之、行成 明洋、富杉 佳計、石川 吉伸（熊大本・薬）

【序】シトクロム b562 は大腸菌に由来するヘム蛋白質であり、ヘム鉄には Met7 と His102 が配位した 6 配位低スピン状態をとることが明らかとなっている。4 本の α ヘリックスからなる単純な構造をしているため、蛋白質工学にとって最適な素材と考えられる。我々は、軸配位子のひとつである Met7 を側鎖体積の小さな Gly に置換し、かつヘムを安定に保持させるためにヘム側鎖プロピオン酸の近傍に位置する 2 つの Glu 残基を Ser に置換した三重変異体 (E4S/M7G/E8S, SGS) を調製することにより、酸素分子が結合できるヘムポケットを構築できた。さらに、もうひとつの軸配位子である His102 を Cys に置換した四重変異体 (SGSC) を調製したところ、その CO 結合型は 442 nm にソレト帯を示し、シトクロム P450 の良いモデルになると考えられた。今回、これら変異体の CO 結合型の共鳴ラマンスペクトルを測定し、ヘムポケットの分子環境について調べた。【結果・考察】SGS の CO 型では $\nu(\text{Fe-CO})$ が 488 cm^{-1} 、 $\nu(\text{C-O})$ が 1969 cm^{-1} に観測されたことから、近位軸配位子に His を持ち、遠位には極性の低いヘムポケットが存在することがわかった。一方、SGSC では pH 9.0 で $\nu(\text{Fe-CO})$ が 477 cm^{-1} 、 $\nu(\text{C-O})$ が 1957 cm^{-1} に観測されたことから、近位軸配位子に Cys を持ち、P450_{scc} と同じようなポケット環境を有することが強く示唆された。さらにこの CO 型は pH 依存性を示し、そのスペクトル変化にはプロトン 1 当量が関与することがわかった。pH 5.0 では、 $\nu(\text{Fe-CO})$ が 522 cm^{-1} 、 $\nu(\text{C-O})$ が 1962 cm^{-1} に観測されたことから、おそらくプロトン化した Cys が近位側から配位しているものと思われる。また、 $\nu(\text{Fe-CO})$ の倍音から Fe-CO 結合の解離エネルギーは約 1.0 eV と算出された。以上の $\nu(\text{C-O})$ 振動数は $\nu(\text{Fe-CO})$ に比べて変化が小さく、近位軸配位子にはあまり影響されないことがわかった。

T. Uno, A. Yukinari, Y. Tomisugi, and Y. Ishikawa : Effects of a proximal ligand on the Fe-CO vibrational frequencies: Resonance Raman analysis of cytochrome b562 multiple mutants