

## ROSEリポジトリいばらき（茨城大学学術情報リポジトリ）

Title	脱窒菌 <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> NCIMB 11015 由来の Cytochrome c' の構造転移に関する研究
Author(s)	高階, 明子
Citation	
Issue Date	2015-03-24
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10109/12652">http://hdl.handle.net/10109/12652</a>
Rights	

このリポジトリに収録されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作権者に帰属します。引用、転載、複製等される場合は、著作権法を遵守してください。

お問合せ先

茨城大学学術企画部学術情報課（図書館） 情報支援係  
<http://www.lib.ibaraki.ac.jp/toiawase/toiawase.html>

氏名	高階 明子		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	甲博理工第502号		
学位授与年月日	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	脱窒菌 <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> NCIMB 11015 由来のCytochrome <i>c'</i> の構造転移に関する研究		
審査会	主査 高妻 孝光	委員 海野 昌喜	
	委員 森 聖治	委員 島崎 優一	

## 論文内容の要旨

シトクローム*c'*(Cyt *c'*)は脱窒菌や好色光合成細菌などのペリプラズムに見出される*c*-タイプヘムタンパク質である。その単量体の構造は4本の $\alpha$ ヘリックスバンドル構造を有し、通常 head to tail dimerとして存在している。活性部位の構造はHis120を軸配位子とする5配位構造であり、その生理学的機能はNOリザーバー、もしくは電子伝達体であると考えられている。Cyt *c'*のヘム鉄の異常な電子状態は、中性pH条件下においては中間スピン状態( $S=3/2$ )と高スピン状態( $S=5/2$ )の量子力学的混合状態であると解釈されている[1]。脱窒菌*Alcaligenes xylosoxidans*由来のCyt *c'* (AxCyt *c'*)のEPRスペクトルより見積もられた高スピン状態の寄与は、中性pH条件下においておよそ89%であり、高スピン状態の寄与はpHに依存して変化することがYoshimuraらによって報告されている[2]。pH12以下のアルカリ性条件下においては、中性pH条件下からpHが高くなるに連れて高スピンの寄与が高くなる一方で、pH13においては $S=1/2$ の低スピン状態をとることが報告されている。しかし、これまでpHに依存してスピン状態が変化する構造的な要因は明らかとなっていなかった。AxCyt *c'*を有する脱窒菌は、生育環境がアルカリ性条件下になるという点からも、アルカリ性条件下における構造的知見は生理学的にも重要であると考えられる。本研究では、AxCyt *c'*の全体構造とヘム鉄のスピン状態との相関を明らかにするために、電子吸収スペクトル、MCDスペクトル、CDスペクトル、ESI-MSスペクトルによって、タンパク質の全体構造と分光学的性質との相関についての検討を行った。また、アルカリ性条件下におけるAxCyt *c'*の詳細な構造について知るために、X線結晶構造解析を行った。AxCyt *c'*の高品質結晶化については、これまで宇宙実験によって結晶化条件が最適化された結晶化マップがKohzumaらによって報告されている[3]。しかし、沈殿剤として用いられる硫酸アンモニウムはアルカリ性pH条件下では気体のアンモニア

が発生するため、アルカリ性pHでの結晶化には向いていない。本研究では、polyethylene glycol (PEG)を沈殿剤として用いることで、中性pH及びアルカリ性pH条件における新たな結晶化条件を見出し、世界で初めてAxCyt c'の高アルカリ性条件下における高分解能結晶構造を明らかにした。分光学的性質とX線結晶構造解析によって明らかとなった構造から、AxCyt c'のアルカリ構造転移のメカニズムに関する知見を得た。

CDスペクトル、ESI-MSスペクトルの結果から、pH3.0以下、pH13.2以上において全体構造はunfoldし、pH3.5~11.8の範囲ではfoldした全体構造を保持していることが明らかとなった。MCDスペクトルの結果からは、pH3.5~11.8の範囲では、電子状態の異なる2つの5配位高スピン(5c-HS I, 5c-HS II)状態をとっているものと考えられた。また、pH13.2以上においては6配位低スピン状態をとっていることが示唆された。pH13以上のアルカリ性条件下でスピン状態が変化するのは、全体構造がunfoldすることに伴い溶媒側に露出したヘムに外来性配位子が結合することによって起こるものと考えられた。一方で、pH3.5~11.8の範囲では安定なfoldした全体構造を保っているにも関わらず、電子状態の異なる2つの5配位高スピンをとることが判明した。pH6.0、10.4におけるX線結晶構造解析の結果から、pH6.0とpH10.4とではタンパク質のヘリックスCがスライドし、ヘリックスCのアミノ酸であるGln84とAsp88との水素結合の環境が変化していることが見出された。また、ヘリックスCのAsn89と、ヘリックスDのヘムが共有結合しているCys116の隣のアミノ酸残基であるSer115とが、pH6.0では水素結合を形成する一方でpH10.4では水素結合が解離していることが判明した。活性部位近傍の構造では、ヘム鉄と軸配位子のHisとの距離は、アルカリ性pH条件下では中性pH条件下よりも長くなっていることが見いだされ、アルカリ性pHとなることにより、タンパク質部分からの脱プロトン化がおり水素結合の環境が変化し、スピン状態の変化を誘起したものと考えられる[4]。

## References

- [1] R. Weiss, A. Gold, J. Turner, *Chem Rev.* (2006) 106, 2550.
- [2] T. Yoshimura, S. Suzuki, H. Iwasaki, M. Masuko, T. Matsubara, *Biochem. Biophys. Acta.* (1985) 831, 267.
- [3] T. Kohzuma and S. Suzuki, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, (1996) 286, 95.
- [4] A. Takashina, M. Unno, T. Kohzuma, *Chem. Lett.* 44(3), (2015), *in press*

## 論文審査の結果の要旨

シトクローム $c'$ (Cyt  $c'$ )は脱窒菌や好色光合成細菌などに見出されるヘムタンパク質である。その単量体の構造は4本の $\alpha$ ヘリックスバンドル構造を有し、通常head-to-tail dimerとして存在している。Cyt  $c'$ のヘム鉄の異常な電子状態は、中性条件下においては中間スピン状態( $S = 3/2$ )と高スピン状態( $S=5/2$ )の量子力学的混合状態であると解釈されている。脱窒菌*Alcaligenes xylosoxidans*由来のCyt  $c'$  (AxCyt  $c'$ )のEPRスペクトルより見積もられた高スピン状態の寄与は、中性条件下においておよそ89%であり、高スピン状態の寄与はpHに依存して変化する事が報告されている。しかし、これまでpHに依存してスピン状態が変化する構造的な要因は明らかとなっていなかった。本論文では、AxCyt  $c'$ の全体構造とヘム鉄のスピン状態との相関を明らかにするために、電子吸収スペクトル、MCDスペクトル、CDスペクトル、ESI-MSスペクトルを駆使して、タンパク質の全体構造と分光的性質との相関について検討を行った結果についてまとめている。本論文では、中性及びアルカリ性条件下における新たな結晶化条件を見出だし、世界で初めてAxCyt  $c'$ の高アルカリ性条件下における高分解能結晶構造を解明し、AxCyt  $c'$ のアルカリ構造転移のメカニズムについて考察を行っている。CDスペクトル、ESI-MSスペクトルの結果から、pH 3.0以下、pH 13.2以上においては全体構造がunfoldしており、pH3.5~11.8の範囲ではfoldした全体構造を保持していることを明らかとし、MCDスペクトルの結果から、pH3.5~11.8では、電子状態の異なる2つの5配位高スピン状態をとっているものと結論している。また、pH13以上のアルカリ性条件下でスピン状態が変化するの、全体構造がunfoldする事により溶媒側に露出したヘムに溶媒に存在する外来性配位子が結合する事に起因することを示唆している。pH 6.0、10.4における高分解能X線結晶構造解析の結果から、ヘム鉄と軸配位子のHisとの距離は、アルカリ性条件下では中性条件下よりも長くなっている事を見出し、この構造変化がヘム鉄の電子状態の違いを反映し、アルカリ性条件下においてヘム鉄は高スピン状態となる反応機構について述べている。本論文は、世界で初めて、高アルカリ性条件下におけるシトクローム $c'$ の結晶化に成功し、その結晶構造を高い分解能で決定し、高アルカリ性条件下における高スピン転移のメカニズムについて言及したものであり、学術的にきわめて意義のある結果となっている。

また、最終試験において、博士の学位を受けるに十分な学識と研究方法を修得していると判定された。

以上のことを総合的に判断して、本審査合格と判定した。