

C型チトクロームの耐熱性に関する研究

三本木 至 宏

①

C型キトクロームの耐熱性に関する研究

東京大学大学院農学系研究科
農芸化学専攻

昭和63年度博士課程進学
三本木至宏

指導教官 東京大学教授
兎玉 徹

目 次

序 論	1
第 1 章 <i>H. thermophilus</i> のチトクローム <u>c</u> -552 のアミノ酸配列	
第 1 節 序	6
第 2 節 使用菌株・菌の培養法	6
第 3 節 チトクローム <u>c</u> -552 の精製	9
第 4 節 精製チトクローム <u>c</u> -552 からのヘム <u>c</u> の除去、 及び Cys の S-カルボキシメチル化	10
第 5 節 リジルエンドペプチダーゼによる分解	13
第 6 節 シアノゲンプロマイドによる分解	13
第 7 節 アミノ酸組成	13
第 8 節 N 末端からの配列決定	16
第 9 節 C 末端からの配列決定	19
第 10 節 考 察	21
第 2 章 チトクローム <u>c</u> の熱安定性	
第 1 節 序	27
第 2 節 各種チトクローム <u>c</u> の調製	28
第 3 節 CD スペクトルの測定	28

第4節	変性剤存在下での昇温実験	30
第5節	変性の自由エネルギー変化	32
第6節	考 察	38

第3章 高温菌 *Pseudomonas hydrogenothermophila* の チトクローム c-552 の精製、部分配列及び耐熱性

第1節	序	46
第2節	精製及び部分アミノ酸配列決定	46
第3節	耐熱性測定	48
第4節	考 察	49

第4章 *H. thermophilus* チトクローム c-552 遺伝子の クローニングと発現

第1節	序	51
第2節	プローブ DNA の合成	52
第3節	<i>H. thermophilus</i> ゲノム DNA の精製	54
第4節	サザンハイブリダイゼーション	54
第5節	コロニーハイブリダイゼーション	57
第6節	制限酵素解析	57
第7節	塩基配列決定	58
第8節	チトクローム <u>c</u> -552 遺伝子の大腸菌における発現	61

第9節	大腸菌で合成されたチトクローム <u>c</u> -552の精製 及びその特徴	65
第10節	大腸菌におけるM-チトクローム <u>c</u> -552の生産条件	70
第11節	M-チトクローム <u>c</u> -552の大腸菌内における局在性	72
第12節	チトクローム <u>c</u> -552遺伝子の酵母による発現の試み	74

第5章 各種チトクローム c 遺伝子のクローニングと発現

第1節	序	79
第2節	<i>P. aeruginosa</i> チトクローム <u>c</u> -551遺伝子の クローニングと発現	79
第3節	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> TK-G株の チトクローム <u>c</u> -552遺伝子のクローニング	83
第4節	<i>P. hydrogenothermophila</i> のチトクローム <u>c</u> -552 遺伝子のクローニング	86

第6章 アミノ酸置換によるチトクローム c の耐熱性の変化

第1節	序	87
第2節	M-チトクローム <u>c</u> -552の耐熱性	87
第3節	変異型チトクローム <u>c</u> の調製	91
第4節	変異型チトクローム <u>c</u> の耐熱性	95
第5節	考察	97

第7章 チトクローム c-552の性質

第1節 序	101
第2節 等電点測定	101
第3節 酸化還元電位測定	102
第4節 チトクローム <u>c</u> -552の電気化学的性質	103
第5節 考察	105
総括と展望	107
論文内容要旨(英語版)	115
謝 辞	118
参考文献	122

序 論

C型チトクロームはヘムcを含有するヘムタンパク質であり、呼吸鎖、電子伝達系のコンポーネントとして幅広い生物種に見出される。その分子量は小さく、特殊な例を除いて単離精製が比較的容易に行なえることから、多種多様な生物種由来のC型チトクロームのアミノ酸配列が決定され、そのうち代表的なものについてはX線結晶解析により立体構造も決定されている(図I)。C型チトクロームはタンパク質の構造機能相関及び進化系統学的な観点から最も研究の進んだタンパク質の1つである。

昨今、タンパク質分子中のアミノ酸残基を部位特異的に他のアミノ酸残基に置換して得られる変異型タンパク質の機能を調べるタンパク質工学的研究が盛んに行なわれている。C型チトクロームに関しては多くの生物種由来のアミノ酸配列が決定されているにもかかわらず、酵母、*Saccharomyces cerevisiae*のiso-1-チトクロームcを除き変異型チトクロームcの発現が困難なためタンパク質工学的研究が不可能であると考えられていた。C型チトクロームのポリペプチド鎖のN末端付近に位置する2つのCysにヘムcが共有結合しなければならぬことがその発現のネックとなっているのである。しかし、近年、ヒト及びラットのチトクロームcが酵母でホロ型タンパク質として発現し、酵母のチトクロームc欠損を相補することが報告され^{1,2)}、それらのタンパク質工学的研究が可能となった。また原核生物については*Rhodobacter sphaeroides*のチトクロームc及び*Bacillus subtilis*のチトクロームc-550が大腸菌を宿主に用いてホロ型として発現することが報告されている^{3,4)}。

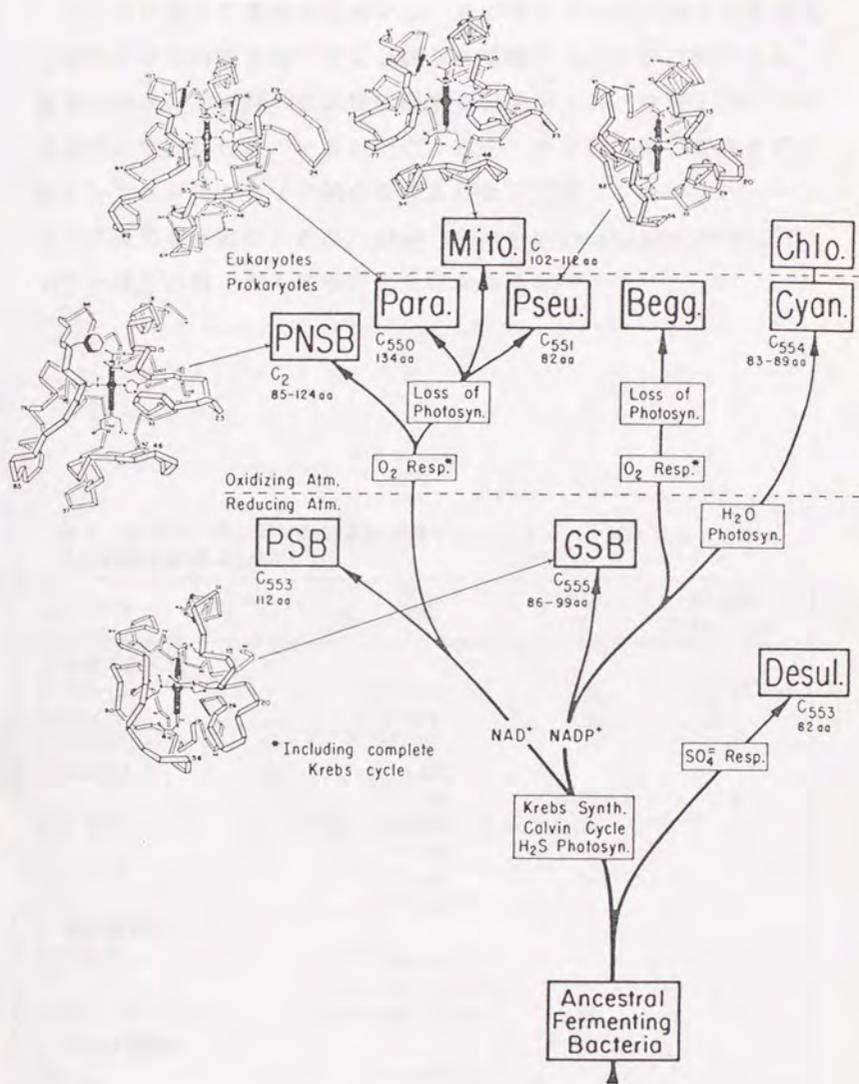


図1 C型チトクロームの系統樹

タンパク質の工業的な応用には、そのタンパク質が持つ酵素活性を保ちながら可能な限り安定な酵素を構築することが目標となる。数多くのタンパク質の安定性に関する研究がタンパク質工学的な手法を用いて行なわれている。そのうちタンパク質の安定性を上げた例としてはジスルフィド結合を導入したズブチリシン⁵⁾及び α ヘリックス構造を安定化した *Bacillus stearothermophilus* の中性プロテアーゼ⁶⁾ の他、表 I に挙げたものがある。

表 I 球状タンパク質で融解温度が高くなったタンパク質の変化と ΔT_m 及び構造安定性 $\Delta(\Delta G)$

タンパク質	変化	ΔT_m (°C)	$\Delta(\Delta G)$ (kcal/mol)
a 架橋を加えた			
リゾチーム	35~108	29	5.2
RNase A	7~14	25	4.9
C _L (ラムダ)	26~86		4.7
RNase T1	2~10 ; 6~103	32	7.2
T4リゾチーム	3~97	5	—
	9~164	6	—
	21~142 (3つ全部)	11 23	— —
b 塩を加えた			
RNase T1	+0.2M CaCl ₂	—	2.0
	+0.2M Na ₂ HPO ₄	—	4.4
α -ラクトアルブミン	+0.1mM CaCl ₂	34	—
c アミノ酸置換			
Cro	Tur26→Cys	11	2.2
Cro	Gln16→Leu	14	2.8
シトクロムc	Asn57→Hle	17	4.2
barnase	Ala14→Leu	12	4.8
トリプトンファン合成酵素	Gly49→Hle	—	9.7

以上の背景のもと筆者はタンパク質の耐熱化機構に興味を持ち、C型チトクロームを材料に用いた研究を行なった。タンパク質の耐熱化機構を論じるのであれば、先ず好熱菌由来のC型チトクロームの構造に関する知見を得ることが有効であると考えた。好熱菌由来のチトクロームcとしては本研究に先行してThermus thermophilusのチトクロームc-552のアミノ酸配列⁷⁾及びその安定性⁸⁾が研究されているのみである。本論文においてはC型チトクローム源として先ずHydrogenobacter thermophilus TK-6株 (IAM12695)を選択した。本菌は筆者の所属する東京大学農学部農芸化学科微生物利用学研究室で精力的に研究が進められてきた細菌で、本菌の菌学的性質についてはこれまでに表 I I に示す結果が得られている⁹⁾。本菌は70℃に生育至適温度を持ち、調べられたいかなる有機物を資化することができない絶対独立栄養性の水素酸化細菌である。本菌のDNAのGC含量、菌体構成脂肪酸及び新規イオウ含有キノンの存在等の化学分類学的研究から本菌は既知のいかなる微生物群にも属していないと考えられた。本菌のチトクロームc-552については既に精製されており¹⁰⁾、筆者は先ずそのアミノ酸配列を決定することから本研究を開始した。次にその耐熱性を測定した後、他のC型チトクロームも含めたタンパク質の耐熱化機構に関するタンパク質工学的研究を行なった。またチトクロームc-552を将来電子素子として応用することを目的としてその電気化学的性質についても検討した。

表 I 1 Hydrogenobacter thermophilus の特徴

Gram stain	-
Cell shape	rod
Dimention (μm)	(1.2-0.3) x (2.0-3.0)
Motility	-
Spore forming	-
GC content(mol%)	43.7
Cellular fatty acids	<u>C(18:0), C(20:1)</u>
Quinone	<u>Methionaquinone</u>
Cytochromes	B ₅₆₀ , C ₅₅₂ , O-type
Optimum conditions	
Temp. (C)	70-75
pH	Neutral range
pO ₂ (%)	15
NaCl conc. (M)	no addition
Nitrogen sources	NH ₄ , NO ₃
Energy sources	H ₂ , S, Na ₂ S ₂ O ₃ (<u>Obligately autotroph</u>)
Hydrogenase	Membrane-bound type
CO ₂ -fixation	<u>Reductive TCA cycle</u>

第1章 H. *thermophilus*のチトクロームc-552のアミノ酸配列

第1節 序

チトクロームcは様々な生物種に広く見出されるヘムタンパク質であり、その化学構造や生理的な役割がよく分かっている。現在までに、細菌からヒトに至るまで約150種ものチトクロームcのアミノ酸配列が解明されている。アミノ酸配列の比較から一致する残基が50%を越える場合があり、あらゆる生物由来のものとの比較においても20%程のアミノ酸残基は不変であり、その折りたたみ構造はどれもよく似ている。本章では、好熱菌由来のチトクロームcについての知見を得ることを目的として、70℃に生育する高度好熱性水素細菌H. *thermophilus*のチトクロームc-552のアミノ酸配列をタンパク化学的な手法で決定した。さらに決定された配列を他生物由来のチトクロームcと比較し、構造的な特徴を考察した。なお本章の内容は *Journal of Bacteriology* (1989) 171, 65-69 に記載されている。

第2節 使用菌株・菌の培養法

本研究にはH. *thermophilus* type strain TK-6 (IAM 12695)を用いた。本菌の培養は全て液体培養で行なった。菌体の大量培養には全容2Lあるいは10Lのジャーフェーマンターを用い連続培養を行なった。表1-1に培養に用いる無機培地の組成を示す。4℃で保存されている液体培地中の保存菌5mLをとり、コルペン中の培地50mLに植菌し、コルペン内のガスを $H_2:O_2:CO_2=75:15:10$ に置換して、70

表 1-1 水素細菌の独立栄養培地

NH_4NO_3	1.0 g	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.5 g	
KH_2PO_4	1.5 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg	(*) MoO_3 4 mg
CaCl_2	10 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 28 mg
NaCl	1.0 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 mg
Hirsch's Trace element solution (*)	0.5 ml	H_3BO_3 4 mg
d.w.	1000 ml	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg
		d.w 1000 ml

pH 7.2

℃で約10時間振盪培養した。次に前培養として培地50mLを含むコルベンを6本用意し、前述の操作で得られた培養液を5 mLずつ植菌し、同様にガス置換し、70℃で12時間振盪培養した。本培養(図1-1)は培地1Lを含む全容2Lのジャーフェーマンター(Labotec Co.)に前培養液約300mLを植菌し、 $\text{H}_2/\text{O}_2/\text{CO}_2$ の混合ガスを通気し、70℃、1000rpmの攪拌で行なった。pHはアンモニア水を用いてpH 6.9~7.0に調節した。 $\text{H}_2/\text{O}_2/\text{CO}_2$ の混合ガス通気量はサーマルマスフロメーター(上島製作所)で制御した。 H_2 と CO_2 の量比については $\text{H}_2=7\text{CO}_2$ となるようにし、 O_2 については培養液中の溶存酸素濃度(DO)を溶存酸素電極(石川製作所)を用いて測定し、DO値が0.5ppm前後となるように制御した。菌の生育は540nmの吸光度(OD 540nm)を追うこと

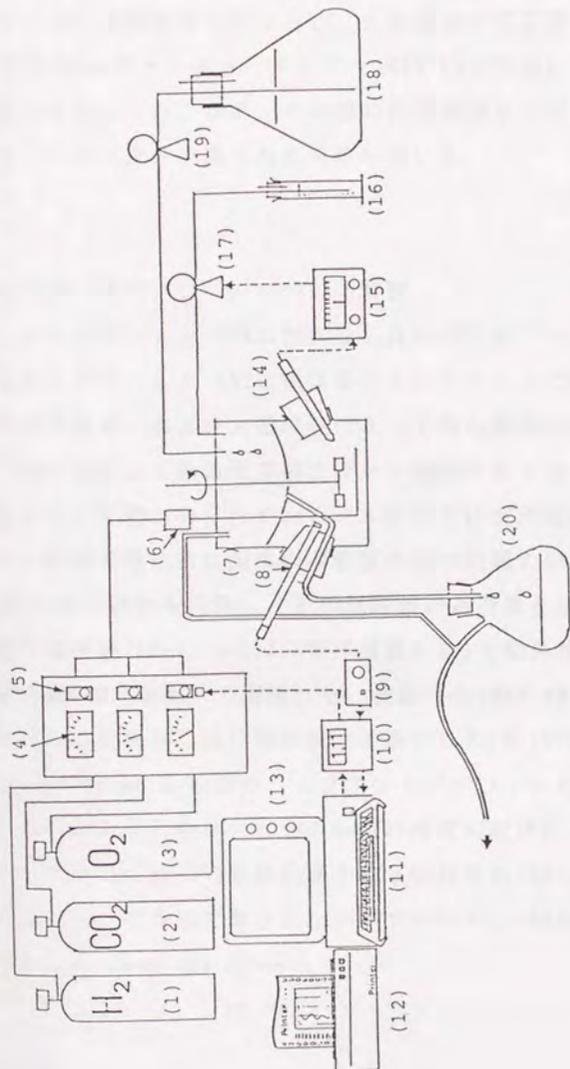


図1-1 ジャーファーマンターによる水素細菌の培養

- (1) H₂ cylinder
- (2) CO₂ cylinder
- (3) O₂ cylinder
- (4) Flow meter
- (5) Flow controller
- (6) Air filter
- (7) Jar fermenter
- (8) DO electrode
- (9) DO electrode adaptor
- (10) A/D, D/A converter
- (11) CPU, I/O unit
- (12) Printer
- (13) CRT
- (14) pH electrode
- (15) pH meter
- (16) NH₄OH solution
- (17) Alkali pump
- (18) Medium reservoir
- (19) Medium pump
- (20) Product reservoir

によって測定した。OD 540nmが1.6前後になった時にペリスターポンプで培地をジャーフェンターの中に流し入れ(150-200mL/h)、またジャーフェンター内の培養液を排気とともに流出させることにより連続培養を行なった。大容量の本培養は、培地5Lを含む全容10Lのジャーフェンター(KIT Co.)を用い2Lの場合と同様にして行なった。なお、その際の前培養液としては2L容のジャーフェンターで得られたものを用いた。

第3節 チトクロームc-552の精製

チトクロームc-552の精製は石井らの方法¹⁰⁾に従って行なった。本チトクロームc-552は菌体をフレンチプレスで破碎して得られる可溶性画分、および大量培養によって得た菌体の50mM KH_2PO_4 -NaOH (pH7.0)による菌体洗浄抽出液から精製されており、両者は同一であることが確かめられている。本研究では洗浄液から精製を行なった。前節で得られた菌体の湿重量の約10倍量の50mM KH_2PO_4 -NaOH (pH7.0)で菌体を洗浄し、その洗浄液の適当量を排除分子量1,000の限外濾過膜(UH-1、 ϕ 6.2、東洋濾紙K.K.)で限外濾過器(UHP-62、東洋濾紙K.K.)を用いて濃縮した。濃縮液を10mM KH_2PO_4 -NaOH (pH7.0)に対して透析し、同じ緩衝液で平衡化したCM-TOYOPEARL 650S、Dye-Matrix Green Aの各カラムクラマトグラフィーにかけた。溶出はどちらのカラムも0~0.5MのNaClの濃度勾配法によって行なった。チトクロームc-552の検出はその α 吸収帯の552nmの吸光度の測定によった。こうして得られたチトクロームc-552はSDS-PAGEで単一であった(data not shown)。

チトクローム c-552のアミノ酸配列決定は図1-2に示す手順で行なった。以下その方法と結果を具体的に述べる。

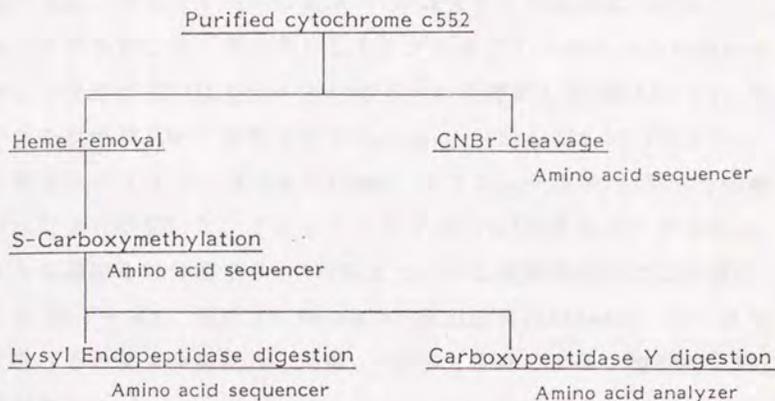


図1-2 チトクローム c-552アミノ酸配列決定のための戦略

第4節 精製チトクローム c-552からのヘム c 除去、及びCysのS-カルボキシメチル化

一般にチトクローム c はN末端付近に-Cys-X-X-Cys-His-という保存配列を持ち、その配列中の2つのCysにヘム c がチオエーテル結合している。チトクローム c のアミノ酸配列を決定するには、先ずヘム c を除去し、Cysを安定な誘導体に変えなければならない。脱ヘムの方法はAmblerとWynnの方法¹¹⁾に従った。前節で得られた精製チトクローム c-552溶液を7%酢酸に対して透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥試料4mgを50mgのHgCl₂を含む2mLの8M尿素、0.1M HCl溶液に溶かし、37°Cで24時間振盪した。反応物をゲル濾過Sephadex G-25のミニカラム(PD-10カラム)にかけ、7%酢酸で溶出し、タンパク質画分を回収して凍結乾燥した。こうして得られ

た試料はヘムcの赤色が抜けて白色であり、アポ型タンパク質であることが確認された。得られたアポ型チトクロームc-552のCysをCrestfieldらの方法^{1,2)}を改変した方法によってカルボキシメチル化した。還元剤として2-メルカプトエタノールを用いるところを本研究ではジチオスレイトールを使用した(図1-3)。得られた反応物(CM-アポ型チトクロームc-552)をC18 VP-318カラムクロマトグラフィー(4.6φ×250mm、センシュエ科学)を用いた逆相HPLCにより精製した。アセトニトリル-0.1%TFAの系で、アセトニトリル濃度を50分間で0~100%まで上げる濃度勾配法により溶出した(図1-4)。流速は1.0mL/min、検出波長は230nmで、ピークを分取しそのまま凍結乾燥した後、-80℃で保存しアミノ酸配列分析試料とした。

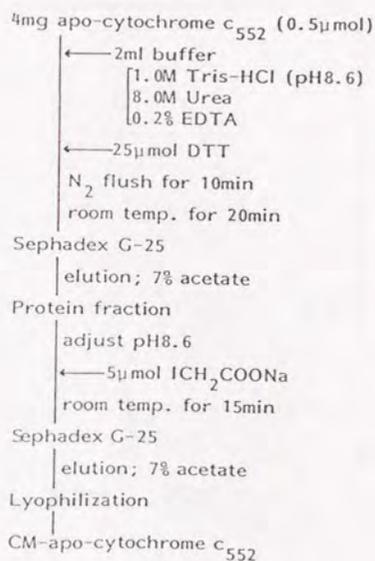


図1-3 アポチトクロームc-552のカルボキシメチル化

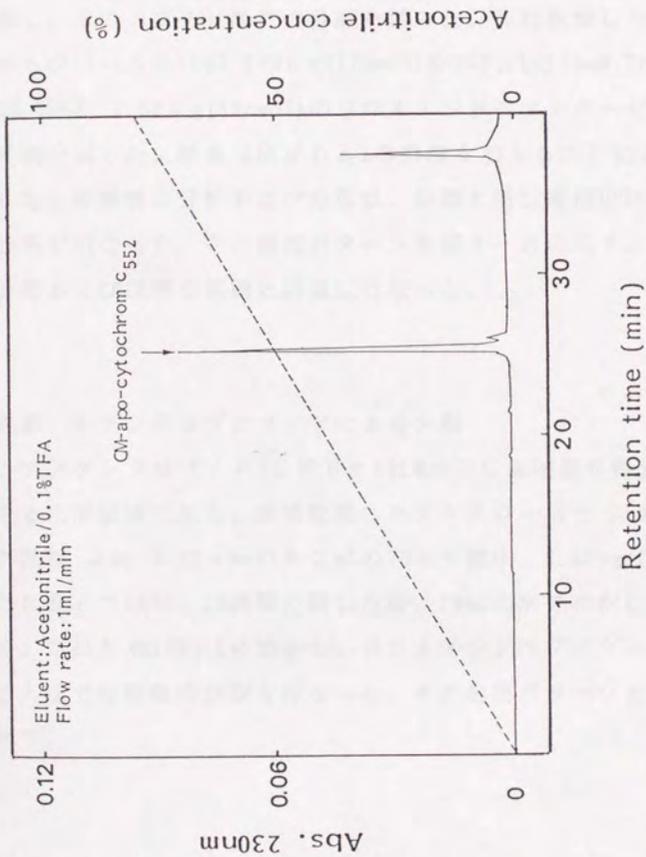


図1-4 GM-アポチトクロームc₅₅₂のHPLCによる溶出パターン

第5節 リジルエンドペプチダーゼによる分解

リジルエンドペプチダーゼはタンパク質分子中のLysのC末端側を特異的に切断するペプチダーゼである。前節で得られたCM-アポ型チトクロームc-552をリジルエンドペプチダーゼ(和光純薬)で分解し、そのペプチド断片の分取を試みた。凍結乾燥したCM-アポ型チトクロームc-552 130 μ g(17nmol)を200 μ Lの10mM Tris-HCl (pH9.0)中、2.55 μ g(85pmol)のリジルエンドペプチダーゼで30 $^{\circ}$ C、7時間分解した。酵素反応は5 μ Lの酢酸を加えることによって停止した。分解物の分析および分取は、前節と同じ逆相HPLCカラム、同じ系で行なった。その溶出パターンを図1-5に示す。各ピークの分取および保存も前節と同様に行なった。

第6節 シアノゲンブロマイドによる分解

シアノゲンブロマイド(CNBr)はMetのC末端側を特異的に切断する化学試薬である。凍結乾燥したチトクロームc-552のネイティブ試料 2mg(0.25 μ mol)を2mLの70%ギ酸中、2.65mg(25 μ mol)のCNBrで38 $^{\circ}$ C、24時間分解した後、18mLの水で希釈し凍結乾燥した。これを水100 μ Lに溶かし、リジルエンドペプチダーゼ分解と同じ方法で分解物の分取を行なった。その溶出パターンを図1-6に示す。

第7節 アミノ酸組成

第4~6節で得られたCM-アポ型チトクロームc-552およびリジルエンドペプチダーゼ、CNBr分解による各ペプチド断片のアミ

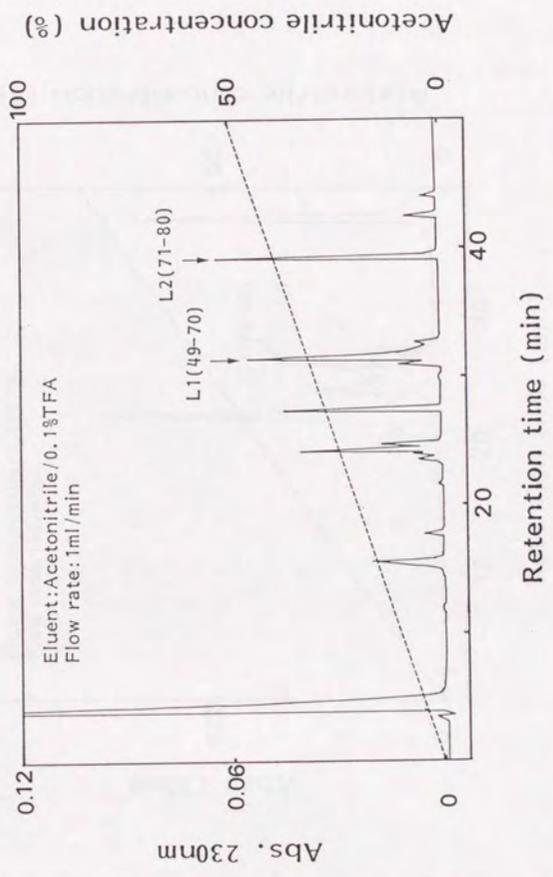


図1-5 リシルエントドパブチダーゼ消化物のHPLCによる溶出パターン

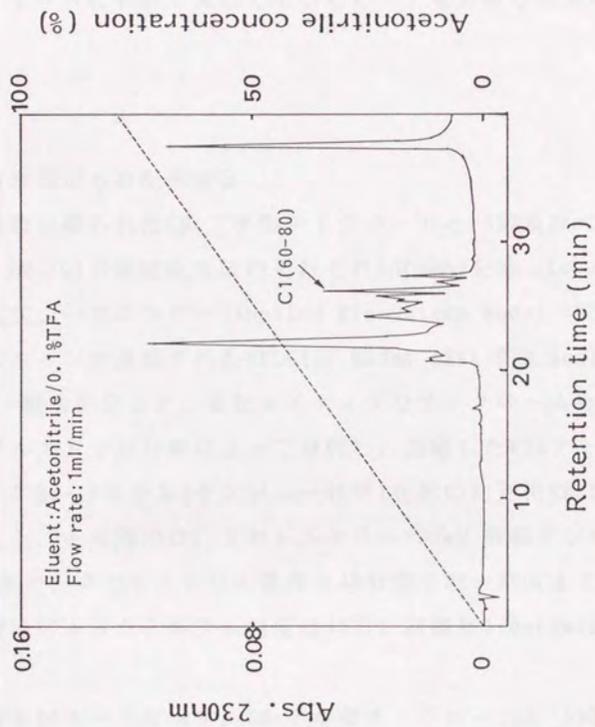


図1-6 C N B r 分解物のHPLCによる溶出パターン

ノ酸組成を調べた。各凍結乾燥試料 1 nmol を脱気した 400 μ L の 6 N HCl に溶かし、真空状態で 110°C、24~74 時間酸加水分解し、日立社製 835 型高速アミノ酸分析計に供した。その結果を表 1-2 に示す。表中の L1、L2 はリジルエンドペプチダーゼ分解によって、また C1 は CNBr 分解によって得たペプチド断片であり、アミノ酸配列決定のためにシーケンサーに供した。なおそれぞれのペプチド断片は図 1-5、1-6 において矢印で示したピークを分取したものである。

第 8 節 N 末端からの配列決定

第 4~6 節で得られた CM-アボ型チトクローム c-552 及びペプチド断片 L1、L2、C1 の凍結乾燥試料それぞれ 500 pmol を 30 μ L の水に溶かし、気相式シーケンサー (Applied Biosystems Model 470A) に供し、オンラインで連結された HPLC (同 Model 120A PTH Analyzer) で PTH アミノ酸を同定した。またネイティブなチトクローム c-552 をマニュアルエドマン分解によって分解し、遊離した PTH アミノ酸を Nucleosil 5C-18 カラム (センシュー科学) を用いた逆相 HPLC によって同定した。その溶出は、アセトニトリル-37 mM 酢酸アンモニア (pH 4.6) の系で、アセトニトリル濃度を 40 分間で 30~86% まで上げる濃度勾配法によった。カラム温度は 50°C、流速は 1.0 mL/min であった。

配列結果を図 1-7 に示す。CM-アボ型チトクローム c-552 のシーケンシングでは、N 末端から 53 番目まで決定された。またマニュアルエドマン分解によるシーケンシングでは N 末端から 5 番目まで決定され、シーケンサーによる結果と一致していた。L1 は 49

表1-2 チトクローム c-552及びそのペプチド断片のアミノ酸組成

Residue No.	Intact CM-protein ^a		L1 ^b		L2 ^b		C1 ^b	
	1-80		49-70		71-80		60-80	
Asp	7.6	(5)	2.0	(1)			2.3	(1)
Asn		(2)		(1)				(1)
Thr	1.6	(1)	1.0	(1)			1.0	(1)
Ser	3.2	(3)	2.0	(2)	1.1	(1)	1.1	(1)
Glu		(2)		(1)				(1)
Gln	7.3	(5)	1.9	(1)	2.1	(2)	4.1	(3)
Pro	4.6	(4)	3.0	(3)			2.3	(2)
Gly	8.5	(8)	4.3	(4)				
Ala	13.3	(12)	2.2	(2)	1.2	(1)	3.2	(3)
Cys	2.6	(2)						
Val	5.4 ^d	(6)	2.4	(3)			1.3	(1)
Met	1.1	(2)	0.9	(1)				
Ile	2.4 ^d	(3)			1.3	(2)	1.0	(2)
Leu	4.6	(5)			1.9	(2)	1.8	(2)
Tyr	2.7	(3)						
Phe								
His	0.9	(1)						
Lys	11.7	(13)	1.1	(1)	0.9	(1)	1.6	(2)
Arg	1.2	(1)						
Trp ^c		(2)		(1)		(1)		(1)
Total residue		80		22		10		21

^a Average value obtained from 24, 53, 74 hr hydrolysis with 6 M HCl at 110 °C

^b Taken from 24 hr hydrolysis

^c Trp was not determined in the present study

^d Taken from 74 hr hydrolysis

Numbers in parentheses are residues found in sequence

～70番のペプチド断片で、その配列中の49～53番の配列はCM-アボ型チトクロームc-552のシーケンシング結果と一致した。L2は71～80番のペプチド断片で、60～80番のペプチド断片C1のうち配列決定された17残基の配列がペプチド断片L1とL2の両方に重複していた。

第9節 C末端からの配列決定

C末端からの配列決定法としては、N末端からのエドマン分解によるような優れた化学的方法が少なく、本研究ではタンパク質のC末端からアミノ酸残基を順次遊離してゆくカルボキシペプチダーゼY(CPY)による酵素的方法によった。188 μ g(25nmol)のCM-アボ型チトクロームc-552を200 μ Lのピリジン-酢酸(pH6.7)に溶かし、83pmolのCPYを含む10 μ Lの溶液を添加し、室温で反応した。この反応系の基質と酵素のモル比は300:1である。反応時間0、1、3、5、10、15、20、30、60分において、反応系から25 μ Lづつ反応液を回収し、そこに10 μ Lの酢酸を加えて反応を停止させた。それぞれの試料を凍結乾燥し、遊離したアミノ酸残基の組成を第7節の方法と同様に分析した。その結果を図1-8に示す。グラフから、まずLysが遊離し、つづいて順にIle、Ser、Leuそして再びIleが遊離することが明らかである。この結果からチトクロームc-552のC末端配列は、N末端側より-Ile-Leu-Ser-Ile-Lysと推定された。この配列は前節でN末端からシーケンシングされたペプチド断片L2の後半部分と一致した。また基質と酵素のモル比を135:1として60分間反応させた反応物のアミノ酸分析によると、遊離したアミノ酸残基組成の割合はGln、Ser、Ala、Lys、Trpが1であるのに対して、Ile、Leuが2であった。このアミノ酸組成はペプチド断片L2の後半

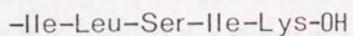
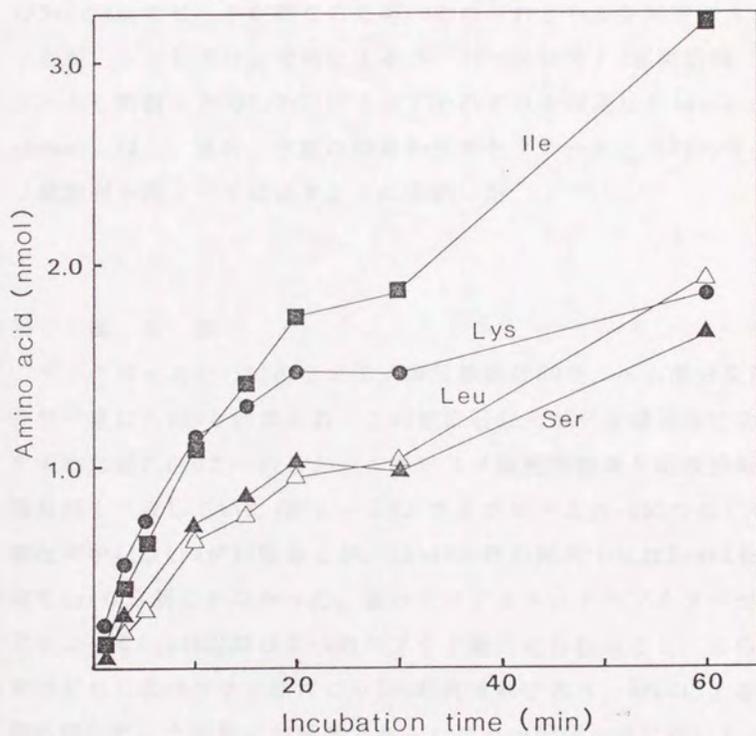


図1-8 カルボキシペプチダーゼYによって遊離するアミノ酸残基

9個のアミノ酸組成と一致し、先の結果と考え合せてペプチド断片L2はチトクロームc-552のC末端に位置することが示された。なお実験に使用した日立835型高速アミノ酸分析計では、ThrとGln、及びSerとAsnのピークが重なるため、それぞれどちらか同定できなかったが、ニンヒドリン発色によるペーパークロマト(展開溶媒 ブタノール：酢酸：水=20:3:7)によってそれぞれを同定した(data not shown)。以上、第8、9節の結果からチトクロームc-552の全アミノ酸配列を図1-7に示すように決定した。

第10節 考察

チトクロームc-552の全アミノ酸残基数は80で、ヘム部分を加えた分子量は7,599と計算され、この値は石井らがゲル濾過法によって求めた値7,600と一致した。またアミノ酸配列結果と組成分析結果も良く一致していた(表1-2)。チトクロームc-552の全アミノ酸配列中にはLysが13個あるが、Lys48以降の配列中にはLys48を含めてLysが3個しかなかった。従ってリジルエンドペプチダーゼ消化によってLys48以降は2つのペプチド断片に分れること、さらにそのどちらのペプチド断片にもTrpが含まれており、HPLCによる分取の際にピークの検出が容易であったことが配列決定に幸いしていた。さらにエドマン分解の際、水酸基を持つSerまたはThrがN末端にあると、反応が十分に進まず切れ残りが多くなる。チトクロームc-552のアミノ酸配列においては51番目にはじめてSerが現れたことも配列決定が順調に進んだ理由のひとつである。

図1-9に示すようにチトクロームc-552は、数あるC型チトクロームのなかでPseudomonas属が持つチトクロームc-551に最も類

HT	N E Q L A K Q K G C M A C H D L K A -- K - K V G P A Y A D V A K K	20	30	Y	
PA	ED P E V L F K N K G C V A C H A I D T -- K - M V G P A Y K D V A A K			F	
PF	ED G A A L F K S K P C A A C H T I D S -- K - M V G P A L K E V A A K			N	
TUNA	GOVAK G K K T F V Q K - C A Q C H T V E N G G K H K V G P N L W G L F G R K T G O A E G Y S Y T D A N K - S K G I				
RV	AGDPVK G E Q V F K - Q - C K I C H Q V G P T A K N G V G P E Q N D V F G Q K A G A R P G F N Y S D A M K N S - G L				
	40	50	60	70	80
A G R K D A V D Y L A G K I K K G G S G V W G S V P M P P Q N V -- T D A E A K Q L A Q W I L S I K					
A G Q A G A E A E L A Q R I K N G S Q G V W G P I P M P P N A V -- S D D E A Q T L A K W V L S Q K					
A G V K D A D K T L A G H I K N G T Q G V W G P I P M P P N Q V -- T D A E A L T L A Q W V L S L K					
V W N N D T L M E Y L E N P K K Y I - - - P G T K M I F A G I K K - K G E R Q D L V A Y L K S A T S					
Y W D E A T L D K Y L E N P K A V V - - - P G T K M V F V G L K N - P Q D R A D V I A Y L K Q L S G					

HT: *Hydrogenobacter thermophilus*

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

PF: *Pseudomonas fluorescens*

RV: *Rhodomicrobium vannielii*

図1-9 C型チトクロームのアミノ酸配列比較

似しており、例えば *Pseudomonas aeruginosa* 由来のチトクローム c-551 と比較すると 56% のアミノ酸残基が一致し、同じ性質を持つアミノ酸残基同志 (例えば、酸性アミノ酸の Asp と Glu) の置換、すなわち相同置換を考慮すると 70% の類似性があった。C 型チトクロームに特有な -Cys-X-X-Cys-His- の配列はチトクローム c-552 では 10 番目から見られ、さらにすべての C 型チトクロームで保存されておりヘム c の鉄原子に配位する Met (チトクローム c-552 では 59 番目、Met59) も見られた。この Met59 の周辺に Pro が密集していること、及び C 末端が Lys であることなどは、*Pseudomonas* 属が持つチトクローム c-551 に特徴的に見られる構造である。異なる点はチトクローム c-552 は c-551 に比べ N 末端が 2 残基短いことである。

H. thermophilus はその細胞膜の脂質の存在形態および抗生物質に対する感受性¹³⁾等から、真正細菌であることに疑いはないものの、序論で述べたようにこれまでの分類学的研究からは微生物群における本菌の特異性が示されたのみで、その位置付けは明らかにされていない。しかし本章の結果から、*H. thermophilus* のチトクローム c-552 は *Pseudomonas* 属が持つチトクローム c-551 と高い類似性があることが明らかになり、Dickerson が提唱したチトクローム c の系統樹¹⁴⁾においては *Pseudomonas* 属と同じ S クラスに属していた。また表 1-3 に示すように *Pseudomonas* 属に水素資化能を持つ菌種が多く存在すること¹⁵⁾は本章の結果との関連において興味を持たれる。

H. thermophilus と生理的に類似していると思われる細菌由来のチトクローム c のアミノ酸配列がいくつか決定されているので、それらを図 1-10 に示した。本菌と同様に還元的 TCA 回路によって炭酸固定を行なう嫌気性細菌、*Chlorobium thiosulfatophilum* チ

表 1 - 3 水素細菌

(1) グラム陰性菌

- Alcaligenes eutrophus*
 ♪ *hydrogenophilus*
 ♪ *ruhlandii*
 ♪ *latus*
 ♪ *paradoxus*
Aquaspirillum autotrophicum
Azospirillum lipoferum
Calderobacterium hydrogenophilum
Derxia gummosa
Flavobacterium autothermophilum
Hydrogenobacter thermophilus
Microcycylus aquaticus
 ♪ *ebrunus*
Paracoccus denitrificans
Pseudomonas facilis
 ♪ *flava*
 ♪ *pseudoflava*
 ♪ *hydrogenovora*
 ♪ *hydrogenothermophila*
 ♪ *palleronii*
 ♪ *thermophila*
 ♪ *saccharophila*
Renobacter vacuolatum
Rhizobium japonicum
Xanthobacter autotrophicus
 ♪ *flavus*

(2) グラム陽性菌

- Arthrobacter* spp.
Bacillus schlegelii
 ♪ *tusciae*
Mycobacterium gordonae
Nocardia autotrophica
 ♪ *opaca*

			10		20		30
HT	NEQ	LAK	QKGC	MACH	D L K A	-- K K -	V G P A Y A D V A K K
NE	NAD	LAK	KNNC	IACH	Q V E T	-- K V -	V G P A L K D I A K
NW	GDVEA	G K A F N - K -	C K A C H E I G E S A K N K V G P E L N G L D G R				
CT	YDAAA	G K A T Y D A S -	C A M C H K T G M - - M - G A P K - V G - - D K				
TN	AGDAAA	G K T L Y D A S -	C A S C H G M Q A - - Q G - Q G M - - F P - - K L A G L T				
TT	QAD	G A K I Y A - Q - - C A G C H Q Q N G - - Q G - I P G A - F P - - P L A G H V					

			40
Y A G R K - D A V D Y L A G K I K	HT: <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>		
Y A D K N - S A A T Y L A G K I K	NE: <i>Nitrosomomas europaea</i>		
I T W T E A E F K E Y I K D P K A	NW: <i>Nitrobacter winogradskyi</i>		
A A W A P - H I A K G M N V M V A	CT: <i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>		
S E R I K - T T L - - V A - F K S	TN: <i>Thiobacillus neapolitanus</i>		
E I L A K - E G G - - R E - Y L I	TT: <i>Thermus thermophilus</i>		

図1-10 C型チトクロームのアミノ酸配列比較

トクローム c-555¹⁶⁾、好熱菌、Thermus thermophilusトクローム c-552⁷⁾、チオ硫酸酸化菌、Thiobacillus neopolitanusトクローム c-554¹⁷⁾、アンモニア酸化菌、Nitrosomonas europaeaトクローム c-552¹⁸⁾、そして独立栄養性亜硝酸酸化菌、Nitrobacter winogradskyiトクローム c-550¹⁹⁾が調べた限りでは挙げられる。これらのうち N. europaea のトクローム c-552 のみが S クラスに属しており、他のトクローム c は他のクラスに分散している。このことから H. thermophilus のトクローム c-552 と図 1-10 に掲げた菌由来のトクローム c とはトクローム c による系統樹上では類縁性が遠いと思われた。

第2章 チトクローム c の熱安定性

第1節 序

前章で *H. thermophilus* のチトクローム c-552 と *P. aeruginosa* のチトクローム c-551 は 56% のアミノ酸残基が一致し、70% の類似性があることが示された。*Hydrogenobacter* 属と *P. aeruginosa* はその生育温度がそれぞれ 70°C 及び 37°C で非常にかけ離れており、菌の生育温度から考えるとチトクローム c-552 は c-551 に比べて熱安定性に優れていることが予想される。もし両者の耐熱性が予想通り異なっていれば、両者のアミノ酸配列は高い類似性を示しているので耐熱性に関するアミノ酸残基置換を推定することが可能となる。そこで本章ではチトクローム c-552 を含めて、各種チトクローム c の耐熱性を CD スペクトルによって測定し比較した。

CD (circular dichroism、円二色性) は左右円偏光に対する光学活性物質の吸光度の差、すなわち不斉構造を反映して測定されるものである。従ってタンパク質の主鎖の基本構造である α ヘリックス、 β シート、ランダムコイルは不斉性 (右巻きと左巻き) をとるため、らせん構造特有の CD スペクトルを示す。 α ヘリックスの CD スペクトルでは $n-\pi$ 遷移による吸収帯が 222nm に見られる。

なお本章の内容は *Biochemistry* (1989) 28, 9574-9578 に記載されている。

第2節 各種チトクローム c の調製

チトクローム c-552の熱安定性の比較対照として、ウマ心筋由来のチトクローム c と *P. aeruginosa* 由来のチトクローム c-551を用いた。ウマチトクローム c はSigma Type IIIの酸化型画分を用いた。市販標品をCM-TOYOPEARL 650Sカラムクロマトグラフィーにかけ酸化型画分を精製した。溶出条件等はチトクローム c-552の精製方法と同様である。*P. aeruginosa*のチトクローム c-551は市販標品がないので自ら精製した。*P. aeruginosa* PAO 1161株を硝酸培地中、37℃で24時間静置培養することによって菌体を得た。得られた菌体をアセトン粉末にして破碎し、60~90%の硫酸塩析画分をDE 52、Q-Sepharoseの各カラムクロマトグラフィーによってSDS-PAGEで単一なまでに精製した。両カラムは10mM Tris-HCl (pH9.0)で平衡化し、その溶出は0~0.5MのNaClの濃度勾配法によった。

第3節 CDスペクトルの測定

チトクローム c-552、c-551及びウマチトクローム c を50 μ g/mLとなるように10mM KH_2PO_4 -NaOH (pH7.0)に溶かし、セル長1cmの石英セルで210~250nmのCDスペクトルを25℃で測定した(図2-1、曲線A)。どの試料にも α ヘリックス構造由来の222nmの吸収帯が見られた。本実験でCDスペクトル測定に使用した機種は日本分光 JASCO automatic recording spectropolarimeter Model J-20で、スペクトルの単位、モル楕円係数 $[\theta]$ は

$$[\theta] = 100 \times [\text{スケール (deg/cm)}] \times [\text{チャートの読み (cm)}]$$

$$\times 1 / \text{残基モル濃度} \times 1 / \text{セル長}$$

で与えられる。

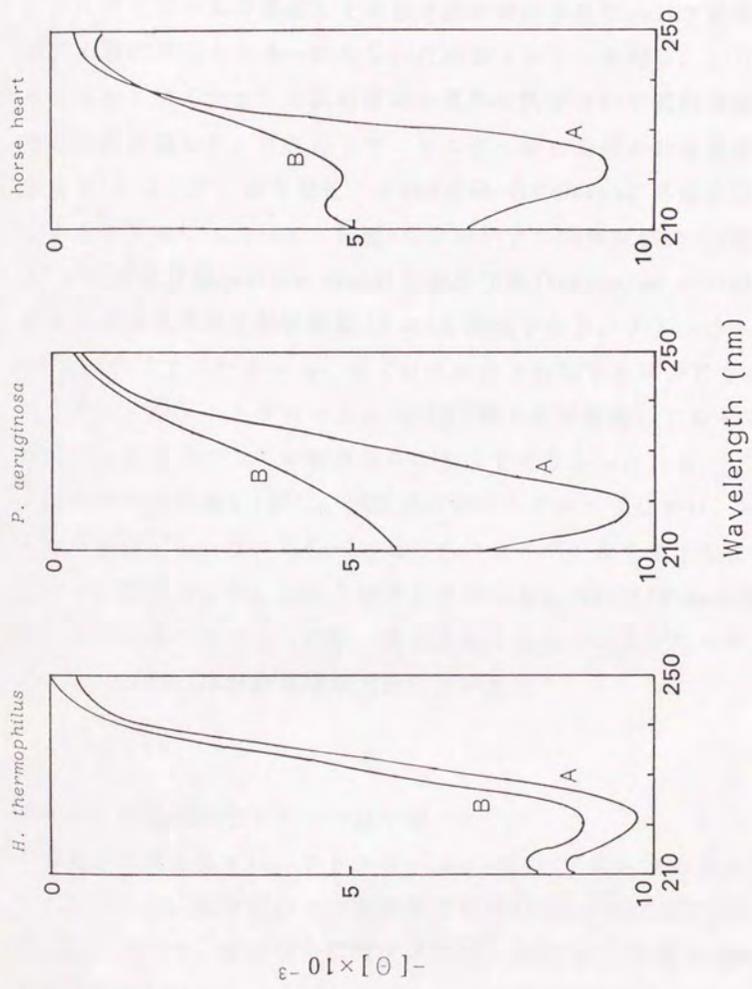


図2-1 各種チトクロム₆のCDスペクトル。A、未変性タンパク質；
B、120℃、20分間のオートクレーブ処理後25℃で測定

次に、222nmのモル楕円係数をパラメーターとして昇温実験を行った。ポリエチレングリコールを循環させることができるセルホルダーに試料溶液の入ったセルを置き、Haake bathを用いてポリエチレングリコールの温度を上昇させ試料溶液を5℃/minで昇温した。試料溶液にサーミスターにつないだ温度センサーを浸し、シリコンゴムでセルにふたをして試料溶液の蒸発を防ぎながら試料溶液の温度を直接計測した。こうしてサーミスターから発信される温度信号をXYレコーダーのX軸に、またJ-20からの222nmにおけるCDシグナルをY軸に入力して、温度-CDシグナル曲線を描いた(図2-2)。未変性状態(native state)と変性状態(denatured state)の中間点における温度を融解温度(T_m)と定義すると、チトクロームc-551及びウマチトクロームcの T_m はそれぞれ85℃と85.5℃であったのに対して、チトクロームc-552は100℃まで昇温しても未変性状態のままであり、 T_m を求めることができなかった。そこで各チトクロームc溶液を120℃、10分間のオートクレーブにかけ、ゆっくり室温に戻した後、210~250nmのCDスペクトルを測定した。図2-1の曲線Bに示したようにチトクロームc-552は222nmの吸収帯に変化が見られなかったが、チトクロームc-551及びウマチトクロームcは222 nmの吸収帯が消失していた。

第4節 変性剤存在下での昇温実験

前節の昇温実験では、チトクロームc-552の T_m を求めることができなかった。筆者の行った実験系では100℃以上での測定が不可能であったので、変性剤、塩酸グアニジン(Gdn-HCl)存在下で同様の昇温実験を行ない、各チトクロームcの T_m 測定を試みた。1.5M

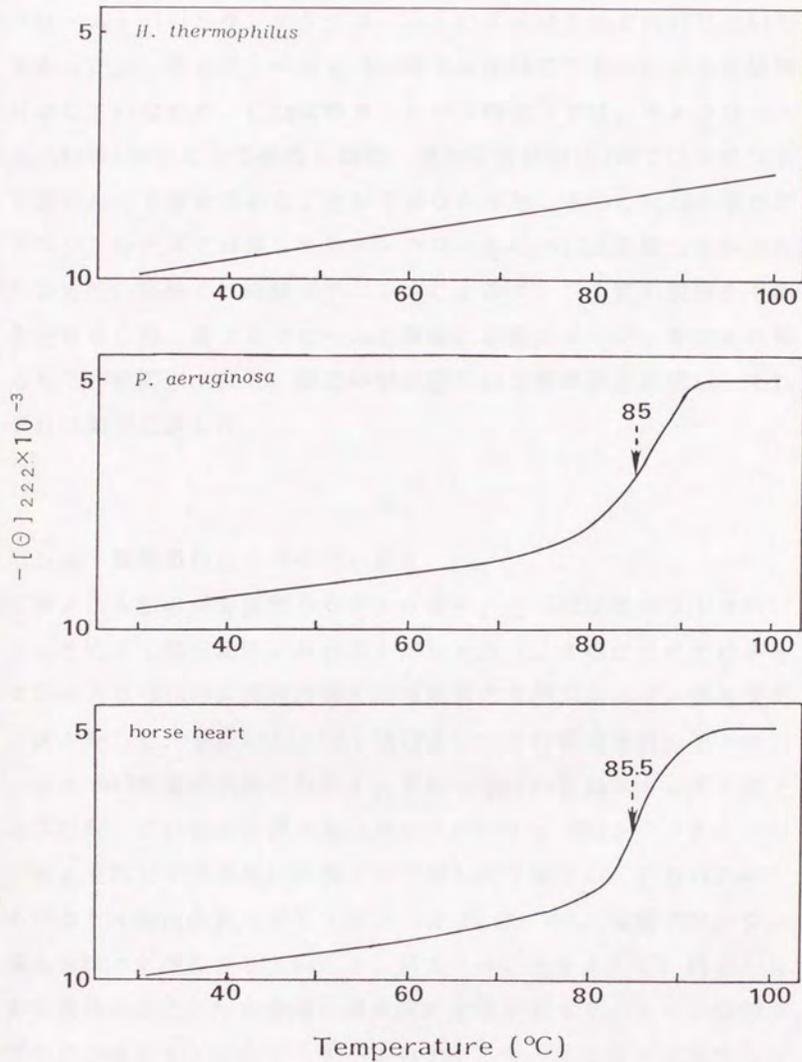


図2-2 10mM KH_2PO_4 (pH 7.0)中の各種チトクロームcの融解曲線

塩酸グアニジン存在下での昇温実験の結果を図2-3に示す。チトクローム c-551とウマチトクローム c の T_m はそれぞれ56℃と54℃であったが、チトクローム c-552の T_m は90℃であった。また結果は示していないが、1.0M塩酸グアニジン存在下では、チトクローム c-552は100℃近くで変性し始め、完全変性状態は100℃以上になると思われ、 T_m を求めることができなかった。さらに0.1Mの塩酸グアニジン存在下で昇温してもチトクローム c-552は変性しなかった。なお本節の実験では塩酸グアニジンによるタンパク質の変性を平衡化させるため、各チトクローム c 溶液に塩酸グアニジンを加えた後、4℃で48時間以上置き、測定の前に25℃に2時間以上放置し、それぞれの測定に供した。

第5節 変性の自由エネルギー変化

第3、4節の昇温実験からチトクローム c-552は他のチトクローム c と比べて熱安定性が高いことが示された。さらにここではチトクローム c-552の未変性状態と変性状態の自由エネルギー差を求める試みをした。すなわち水中で規則正しい立体構造を持つチトクローム c-552が変性状態に比べて、どれくらいの自由エネルギー差で安定になっているかを調べた。チトクローム c-552とウマチトクローム c を25℃で各濃度の塩酸グアニジンに平衡化し、CD222nmにおけるモル楕円係数を25℃で測定した(図2-4)。塩酸グアニジン濃度を徐々に増加させていくと、図2-4に示すように、両者ともある濃度のところから急激に協同的に変性が始まり、さらに塩酸グアニジン濃度を上げると、すべてのチトクローム c 分子は変性していた。変性の融解点はウマチトクローム c が2.5Mであるのに対して

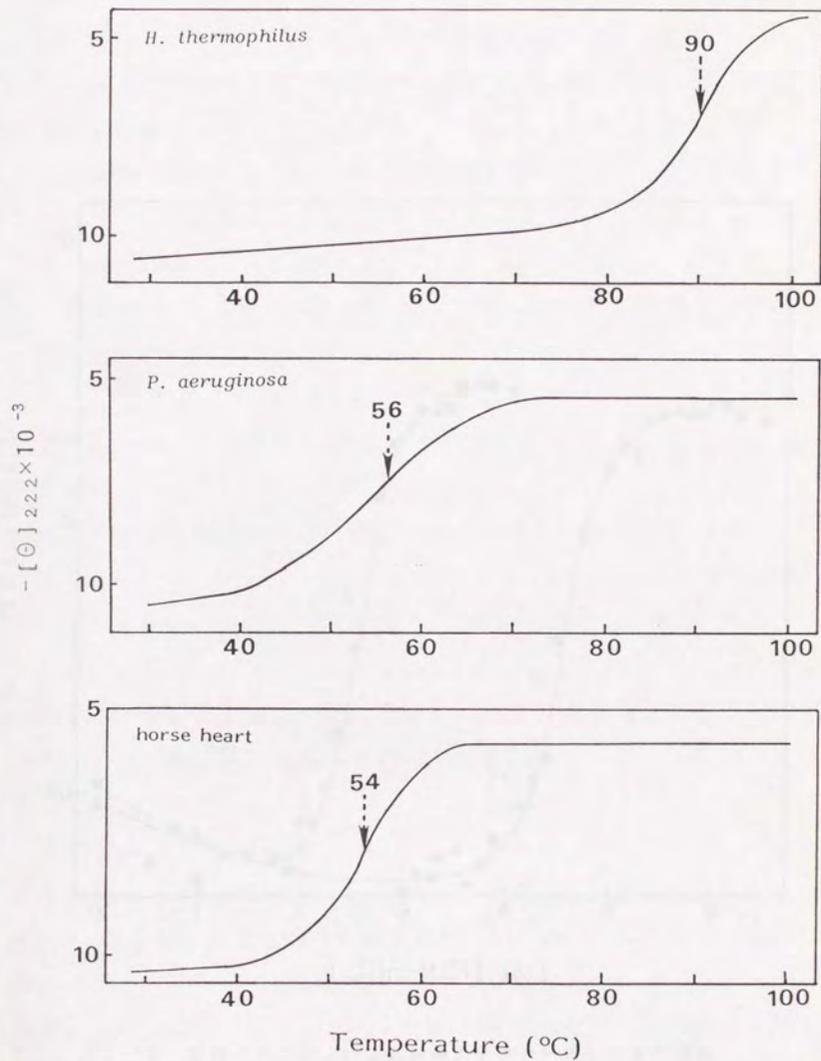


図2-3 1.5M 塩酸グアニジン存在下での各種チトクロームcの融解曲線

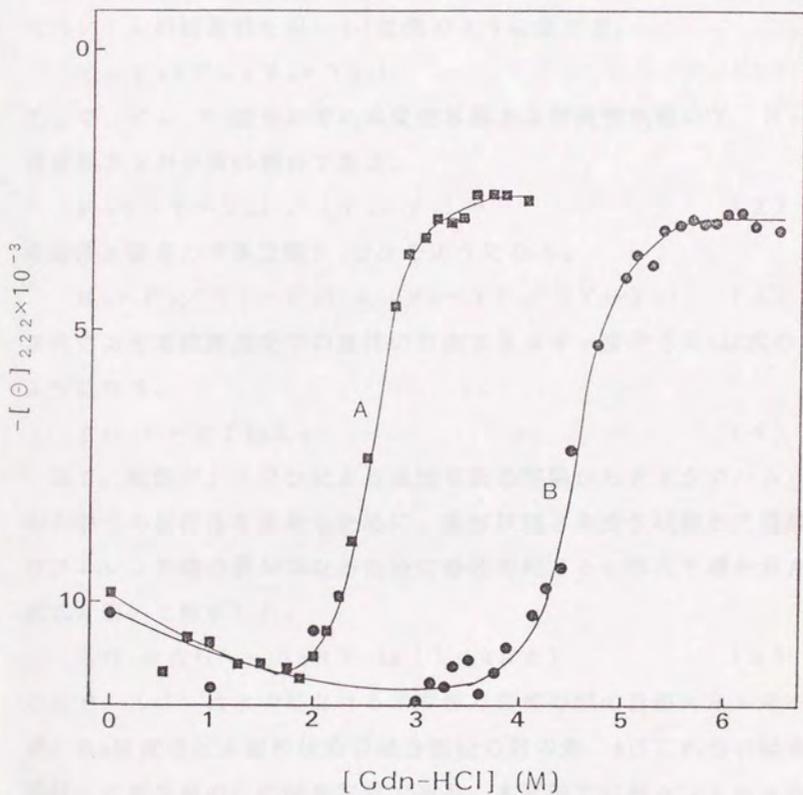


図2-4 塩酸グアニジンによる各種チトクロームcの変性曲線。
 A、ウマチトクロームc； B、チトクロームc-552

チトクローム $c-552$ は $4.5M$ であった。このような変性過程の途中では未変性状態と変性状態のタンパク質分子だけが存在する場合がほとんどであって、未変性と変性タンパク質の間は平衡状態にある。このような変性過程を二状態転移という。以下、二状態転移に関する理論を記載する²⁰⁾。

変性過程の任意の点における Y (本研究では $222nm$ における CD スペクトルの観測値を用いる) は次のように表せる。

$$Y = Y_N + F_D (Y_D - Y_N) \quad (1)$$

ここで、 Y_N 、 Y_D はそれぞれ未変性状態および変性状態の Y 、 F_D は変性タンパク質の割合である。

$$F_D = (Y - Y_N) / (Y_D - Y_N) \quad (2)$$

未変性と変性の平衡定数 K_D は次のようになる。

$$K_D = F_D / (1 - F_D) = (Y_N - Y) / (Y - Y_D) \quad (3)$$

さらにある変性剤濃度での変性の自由エネルギー変化 ΔG_D は次のようになる。

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D \quad (4)$$

さて、塩酸グアニジンによる変性平衡の実験からチトクローム c の水中での安定性を求めるために、変性状態と未変性状態とで塩酸グアニジンの結合量が異なるために変性が起こると考えて導かれた次式を用いて解析した。

$$\Delta G_D = \Delta G^\circ - \Delta n RT \ln (1 + ka \pm) \quad (5)$$

ここで、 ΔG° は水中における未変性と変性の間の自由エネルギー差、 Δn は変性と未変性状態の結合部位の数の差、 k はこれらの結合部位への変性剤の平均結合定数である。本実験では *Nojima* らが *Thermus thermophilus* のチトクローム $c-552$ の ΔG° 測定の時に用いた値 $k = 1.20M^{-1}$ を用いた⁸⁾。 $a \pm$ は塩酸グアニジンの平均

イオン活動度であり、塩酸グアニジン濃度 c と次の関係にある。

$$\log a = -0.5191 + 1.4839 \log c - 0.2562 (\log c)^2 + 0.5884 (\log c)^3 \quad (6)$$

式 (5) で使う a 士の値は Nojima らの計算方法に従って式 (6) で得られた a の平方根の値とした。

図 2-4 の変性曲線と式 (4) を用いて、各塩酸グアニジン濃度において ΔG_D を求め、これを $\ln(1 + ka \pm)$ に対してプロットし最少二乗法によって直線を得 (図 2-5)、その直線から Δn と ΔG° を求めた。結果を表 2-1 に示す。

表 2-1 25°C (pH 7.0) における Gdn-HCl 非存在下での ΔG°

Cytochrome c	ΔG° (kcal/mol)	Δn
<i>H. thermophilus</i> ^a	21.9	35.3
<i>T. thermophilus</i> ^b	28.5	36.5
<i>Candida krusei</i> ^c	14.0	32.9
cow ^c	15.4	30.4
horse ^a	15.1	29.6
horse ^c	12.7	26.4

^aThis work. ^bNojima et al. (1978). ^cKnap & Pace (1974).

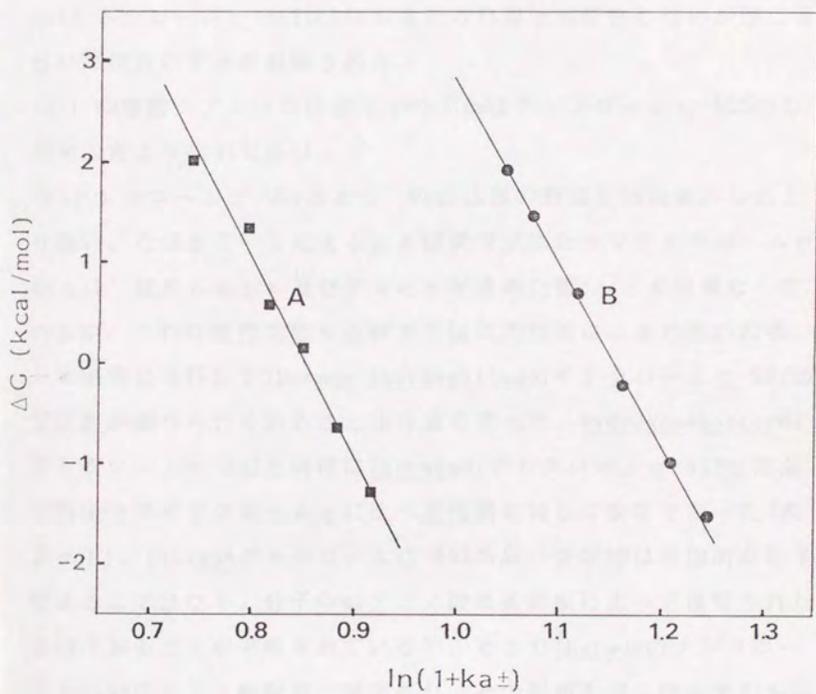


図2-5 $\ln(1 + ka_{\pm})$ に対する ΔG の値。A、ウマチトクロームc；
B、チトクロームc-552

第6節 考 察

以下にまとめる本章の結果からチトクローム c-552はチトクローム c-551及びウマチトクローム cより安定性が高いことが明らかになった。

(1)チトクローム c-552は120℃、10分間の加熱処理後でもその構造を保持している。

(2)チトクローム c-552は100℃までの昇温でも変性しないが他二者は85℃付近にT_mが観察された。

(3)1.5M塩酸グアニジン存在下でのT_mはチトクローム c-552の方が他二者より約35℃高い。

(4)チトクローム c-552の ΔG° の値は他の常温生物由来のものより高い。なお表2-1によると本研究で求めたウマチトクローム cの ΔG° はKnapp及びPaceが求めた値²¹⁾と多少異なっているが、これは変性状態を追跡する技術的な差によると思われる。

本研究に先行してThermus thermophilusのチトクローム c-552の安定性が調べられていることは序論で述べた。Hydrogenobacterのチトクローム c-552と同様にThermusのチトクローム c-552は常温生物由来のチトクローム cに比べ変性剤に対して安定であった(表2-1)。Thermusチトクローム c-552の高い安定性は付加的な因子によるのではなく、分子中のアミノ酸残基置換によって獲得されたものであることが考察されている²¹⁾。そこでThermusのチトクローム c-552のアミノ酸配列が決定され、その配列を他生物由来のものと比較したところ、類似性の高いチトクローム cが見出されず、いかなるアミノ酸残基置換によって耐熱性を獲得しているのか検討できなかった²¹⁾。しかし第1章に示したように本研究で材料として用いたH. thermophilusのチトクローム c-552は既に立体構造が明ら

かとなっている *P. aeruginosa* のチトクローム c-551と類似性が高かった。それにもかかわらずそれらの安定性には大きな差が見られたことから、両者の立体構造には何らかの違いがあると思われた。

タンパク質の構造安定化に寄与する相互作用については種々考察されており、その例としてジスルフィド結合、疎水的相互作用、水素結合等が挙げられる²²⁾。チトクローム c-552及び c-551にはそのアミノ酸配列の結果からジスルフィド結合は見られない。そこで両者の耐熱性の差を生み出す立体構造上の違いは何に由来するのか、チトクローム c-552の立体構造を両者のアミノ酸配列を比較することによって予想してみる。チトクローム c-551はX線結晶解析によって図2-6に示すようにその立体構造が明らかになっている²³⁾。N末端付近の2つのCysがヘム cと共有結合しており、2番目のCysにつづくHisのN原子と61番のMet(チトクローム c-552ではMet59に相当する)のS原子とがヘム鉄に配位結合している。ヘム cはタンパク質のポリペプチド鎖の中央の疎水的環境にある。チトクローム c-551の全アミノ酸配列中、ヘム cに疎水的に接触している12個の疎水性アミノ酸残基がX線結晶解析から明らかになっている。この12個のアミノ酸残基のうち10個がチトクローム c-552においても保存されており、他の2残基は相同置換である(図2-7)。このことからチトクローム c-552と c-551とではそれぞれのヘム cを取りまく疎水的環境にほとんど違いはないと思われた。また両者のハイドロバシープロフィールを比較したところ、全体的に一致しており(図2-8)、チトクローム c-552の熱安定性の高さは、全体的な疎水的相互作用の強さによるものではないと考えられた。

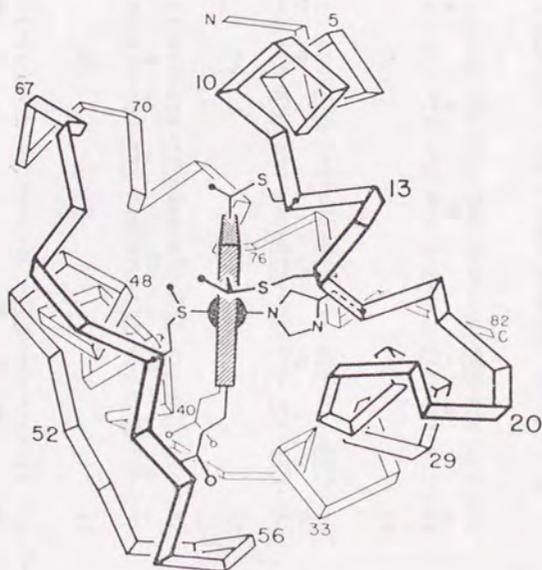
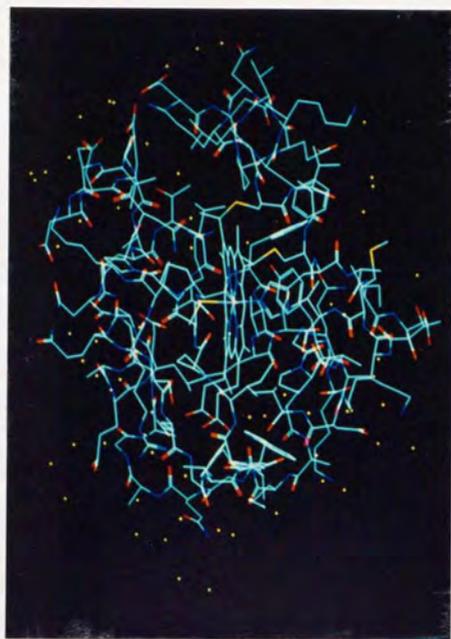


図 2-6 *P. aeruginosa*チトクローム c-551の立体構造

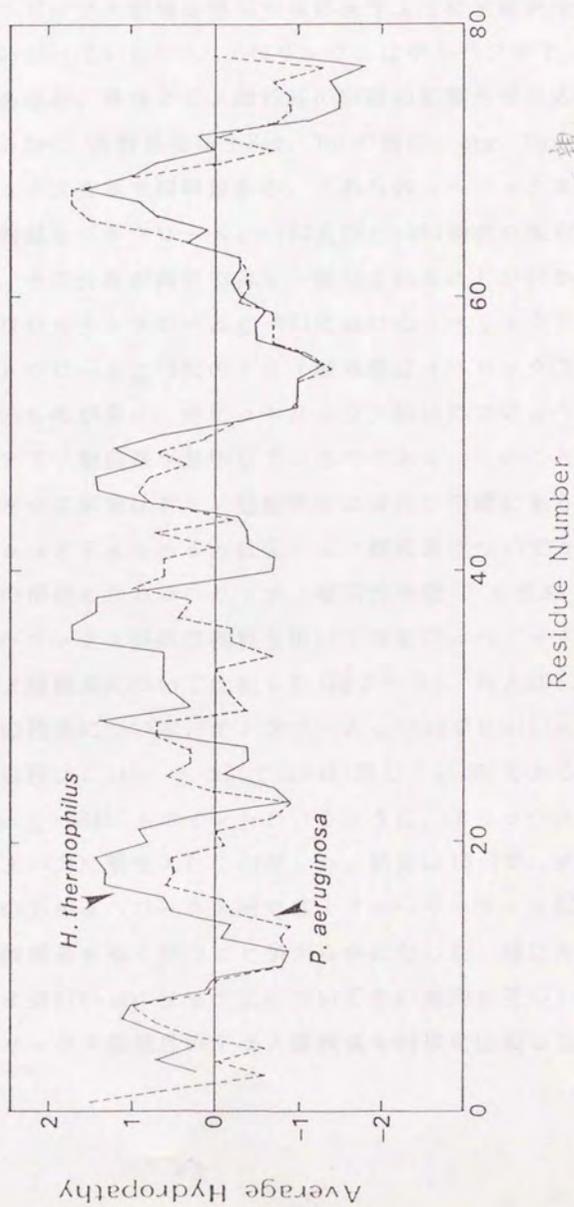


図2-8 ハイドロパシープロファイルの比較。マイナスになるほど疎水的。
 実戦、チトクロームc-552； 破線、チトクロームc-551

以上、アミノ酸残基側鎖の疎水性について考えてきたが、次に二次構造の一つである α ヘリックス構造について考えてみる。チトクロームc-551の α ヘリックス領域は図2-9に示すように全配列中4箇所あることがわかっている²³⁾。 α ヘリックスはポリペプチド鎖の主鎖の構造であるが、構成アミノ酸残基の側鎖の影響を受ける。環状イミノ酸であるPro、水酸基を持つSer、Thrの他に、Arg、Cys、Asn、Glyは α ヘリックスを壊す傾向がある。これらの α ヘリックス崩壊性のアミノ酸残基をチトクロームc-552及びc-551両者の配列中に探してみると、その分布が両者で良く一致していることが分かる(図2-9)。すなわちチトクロームc-551における α ヘリックス領域に対応するチトクロームc-552のアミノ酸残基は α ヘリックス構造を形成しやすいものが多く、逆に α ヘリックス領域外では α ヘリックス崩壊性のアミノ酸残基が集中しているのである。このことから両者の α ヘリックス領域はアミノ酸配列中ほぼ同じ位置にあると思われた。ChouとFasmanは各アミノ酸残基について α ヘリックス形成能の指標となる α ヘリックス傾向性指数²⁴⁾を求めているが、この α ヘリックス傾向性指数を用いて両者の α ヘリックス領域内の各アミノ酸残基について比較した(図2-9)。例えば、N末端から3番目の残基について、チトクロームc-552ではGln(α ヘリックス傾向性指数は1.11)、c-551ではVal(同じく1.06)であるから、チトクロームc-552に1ポイントというように、より α ヘリックスを形成しやすい方に票を入れて加算した。結果は13:7で、チトクロームc-552の方が α ヘリックス内ではより α ヘリックスを形成しやすいアミノ酸残基を多く持つことが明らかになった。特にN末端から1番目と4番目の α ヘリックスについてその傾向が見られる。ところが α ヘリックス領域外のアミノ酸残基を同様に比較した

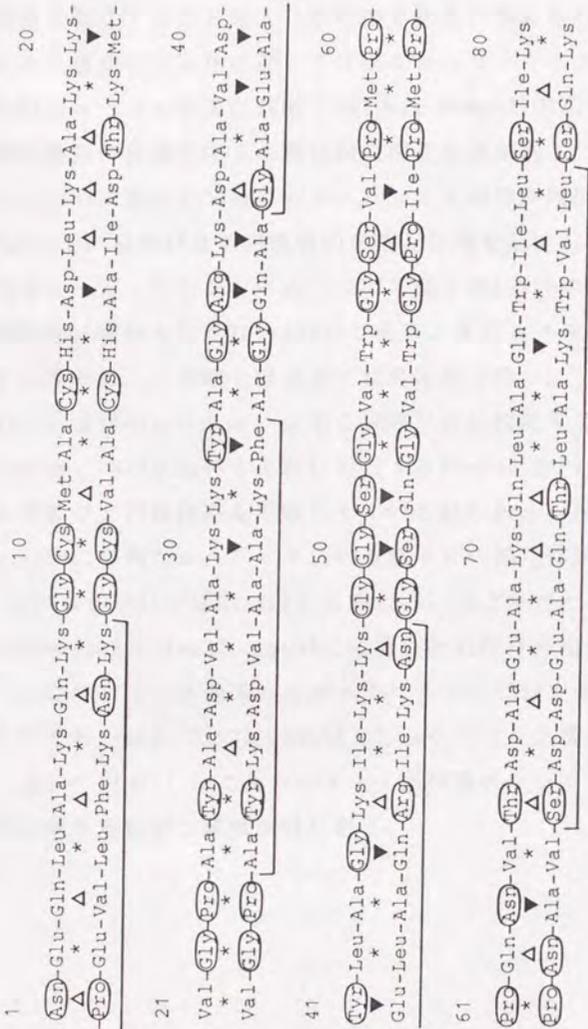


図2-9 B. thermophilusチロームc-552 (上) 及びP. aeruginosaチロームc-551 (下) のアミノ酸配列比較。(楕円) αヘリックス崩壊性のアミノ酸残基; (△) チロームc-552の方がよりαヘリックスを形成しやすい置換; (▼) チロームc-551の方がよりαヘリックスを形成しやすい置換; (*) 同一アミノ酸; 下線はαヘリックス領域

ところ、7:8で両者に違いはなかった。以上の考察から、 α ヘリックス構造を形成しやすいことがチトクローム c-552の熱安定性の高い立体構造を形成するための1つの理由であると考えられた。

ヘリックス構造の安定化に関しては他に α ヘリックスのN末端付近に見られる α ヘリックスの双極子(dipole moment)の正電荷とアミノ酸残基側鎖の負電荷による電気的な相互作用がある²⁵⁾。チトクローム c-551において2番目の α ヘリックスのN末端付近に位置する正電荷を持つLys28はこの電気的な相互作用を妨害していると考えられる。一方、チトクローム c-552ではこのLys28に相当するアミノ酸残基は電荷を持たないAla26である。また α ヘリックスのN末端とは反対に、C末端では双極子は負電荷を持つ。チトクローム c-552で3番目の α ヘリックスのC末端付近に位置するLys48はチトクローム c-551においてそれに相当するAsn50に比べ、 α ヘリックスの双極子と相互作用を形成しやすいと思われる。他にチトクローム c-552に有利な α ヘリックスの双極子との相互作用はAsp37(チトクローム c-551ではGly39)に見られる。以上挙げたチトクローム c-552のAla26、Asp37、Lys48は双極子との相互作用を形成しやすいことに加えて、3残基ともチトクローム c-551でそれらに相当するそれぞれLys28、Gly39、Asn50より α ヘリックス構造を形成しやすくなっている²⁴⁾。これらのアミノ酸残基のタンパク質全体の耐熱性に対する影響に興味を持たれる。

第3章 高温菌 *Pseudomonas hydrogenothermophila* のチトクローム c-552の精製、部分配列及びその耐熱性

第1節 序

第1章では *H. thermophilus* のチトクローム c-552のアミノ酸配列が *Pseudomonas* 属の持つSクラスのチトクローム c と類似していること、さらに第2章では生育至適温度が70℃及び37℃と異なるそれぞれ *H. thermophilus* 及び *P. aeruginosa* のチトクローム c の耐熱性の差が示された。本章ではSクラスのチトクローム c 群に属する可能性が高く、*H. thermophilus* と *P. aeruginosa* の中間的な生育温度を持つ高温性水素細菌 *P. hydrogenothermophila*²⁰⁾ (生育至適温度52℃)由来のチトクローム c-552に関する知見を記載する。

第2節 精製及び部分アミノ酸配列決定

*P. hydrogenothermophila*の菌体は生育温度が52℃である以外は第1章に示した *H. thermophilus*と同様の培養方法によって得た。本菌のチトクローム c-552はCM-TOYOPEARL 650S (10 mM KH₂PO₄, pH7.0)及びDEAE-TOYOPEARL 650S (10 mM Tris, pH9.0)のどちらにも吸着しなかったが、後者の非吸着画分(10 mM Tris, pH9.0で洗浄)として回収したチトクローム c-552はSDS-PAGEで単一なまでに精製されており、SDS-PAGEによる分子量は *H. thermophilus*のチトクローム c-552と同じであった(data not shown)。得られたDEAE非吸着チトクローム c-552画分を凍結乾燥し、微量の水に溶解した試料を第1章と同様の方法でC4逆相系カラムを用いたHPLCに供したとこ

ろ単一ピークを示した。ここで得られたチトクローム c-552画分を分取し、第1章と同様の方法で気相式アミノ酸シークエンサーで配列を決定した。20番目までのアミノ酸配列を決定した結果を図3-1に示す。本章の実験ではチトクローム c-552からヘム cを除去しておらず、従ってCysはカルボキシメチル化していないため検出不可可能であったが、チトクローム cの保存性から図中検出不可可能な残基をCysと表記した。

<i>H. thermophilus</i>	1	Asn	Glu	Gln	Leu	Ala	Lys	Gln		
<i>P. hydrogenothermophila</i>		Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala		
<i>P. aeruginosa</i>		Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Leu	Phe	Lys	Asn

	10	Lys	Gly	Cys	Met	Ala	Cys	His	Asp	Leu	Lys	Ala	Lys	Lys
		Lys	Gly	Cys	Met	Ala	Cys	His	Ala	Ile	Asp	Lys	Lys	Leu
		Lys	Gly	Cys	Val	Ala	Cys	His	Ala	Ile	Asp	Thr	Lys	Met

図3-1 チトクローム cのN末端部分アミノ酸配列比較

第3節 耐熱性測定

精製した *P. hydrogenothermophila* チトクローム c-552 溶液についての昇温実験を第2章と同様の方法で行なった。本チトクローム c-552 は *H. thermophilus* のチトクローム c-552 と同様に 100°C までの昇温では変性されなかったが、1.5 M の塩酸グアニジン存在下で昇温すると T_m が 82°C に観察された (図 3-2)。

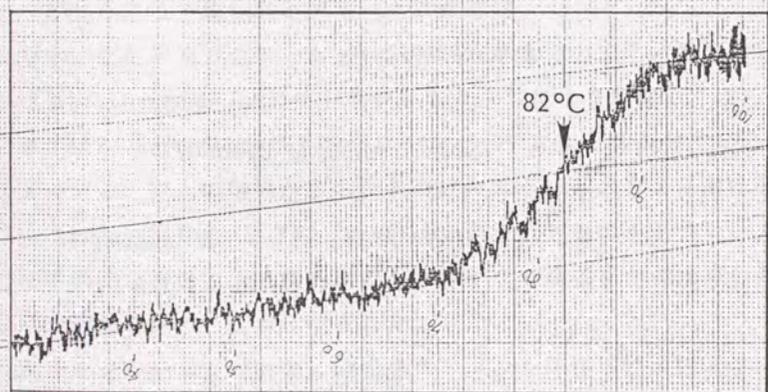


図 3-2 1.5M 塩酸グアニジン存在下での *P. hydrogenothermophila* チトクローム c-552 の融解曲線

第4節 考 察

*P. hydrogenothermophila*のチトクローム c-552の部分アミノ酸配列の結果から本チトクローム c-552は予想通りSクラスに属していることが明らかになった。本チトクローム c-552は第1章で全構造が解明された*H. thermophilus*のチトクローム c-552と同様、Sクラスのチトクローム cとしてはN末端が2残基欠失していた。本研究の結果は20残基までの配列で、全体の4分の1の情報からしか考察できないが、本チトクローム c-552は*H. thermophilus*のチトクローム c-552及び*P. aeruginosa*のチトクローム c-551の両方に類似している(図3-1)。具体的な数字を示すと、本チトクローム c-552 20残基中、

<i>H. thermophilus</i> <u>c</u> -552に一致する残基数	12
<i>P. aeruginosa</i> <u>c</u> -551に一致する残基数	13
上記両者に一致する残基数	10
どちらにも一致しないユニークな残基数	5

となる。また本チトクローム c-552の20残基までのアミノ酸配列は前半は*H. thermophilus*のチトクローム c-552により類似し、さらに後半は*P. aeruginosa*のチトクローム c-551により類似していることが分る。以上の結果から本チトクローム c-552のアミノ酸配列は*H. thermophilus*、及び*P. aeruginosa*のそれぞれのチトクローム cの中間的な構造、より端的に言えばちょうど両者をつぎはぎしたような構造を持つことが示唆された。

本チトクローム c-552の1.5M塩酸グアニジン存在下におけるT_mは82℃であった。結果を第2章の結果と合わせて表3-1に示す。本チトクローム c-552のT_mは*H. thermophilus*、*P. aeruginosa*のその間の値であり、3つの細菌の生育至適温度(37、50、70℃)の

表3-1 各チトクロームcの1.5M 塩酸グアニジン存在下でのT_m

cytochrome c	T _m (1.5M Gdn-HCl) (°C)	growth temp. (°C)
<i>H. thermophilus</i>	90	70
<i>P. hydrogenothermophila</i>	82	52
<i>P. aeruginosa</i>	56	37

順にそれぞれのT_mが高くなっている。すなわち、生育至適温度とチトクロームcのT_mは相関関係にあり、その関係は先に考察したように三者のアミノ酸配列の関係を反映している。

本研究に先行して相同タンパク質の構造比較から耐熱性を論じた例がフェレドキシンに見られる²⁷⁾。アミノ酸配列は良く似ているが耐熱性の異なる4種類のフェレドキシンの構造を比較したところ、いずれのタンパク質においても構成アミノ酸の側鎖の疎水性には顕著な差はなく、塩架橋や水素結合の数が多いものほど安定性が高いことが示されている。第2章で*H. thermophilus*と*P. aeruginosa*のチトクロームcは立体構造が類似していると考察したが、本章で記述した*P. hydrogenothermophila*のチトクロームc-552もその部分アミノ酸配列から前二者と似た立体構造を持つと思われる。しかし三者の耐熱性には差が見られたことから、わずかな立体構造上の違いがあると思われる。第2章ではその原因となるアミノ酸残基置換を*H. thermophilus*と*P. aeruginosa*の2つのチトクロームcのアミノ酸配列から考察したが、*P. hydrogenothermophila*のチトクロームc-552の全アミノ酸配列が明らかになれば、上述したフェレドキシンの例のように耐熱性の差を段階的に考察できるとと思われる。

第4章 *H. thermophilus*チトクロームc-552遺伝子のクローニングと発現

第1節 序

本研究で生育至適温度が異なる3種類の細菌、*H. thermophilus*、*P. hydrogenothermophila*、*P. aeruginosa*由来のそれぞれ類似性の高いチトクロームcの耐熱性はその生育温度と相関することを見出し、全配列が決定されている*H. thermophilus*と*P. aeruginosa*のチトクロームcのアミノ酸配列の比較から耐熱性に関与すると思われるアミノ酸残基を推定した。

昨今、タンパク質の構造機能相関を調べる目的でタンパク質分子中のアミノ酸残基を部位特異的に他のアミノ酸残基に置換して得られる変異型タンパク質の性質を調べるタンパク質工学的研究が盛んに行なわれている。本研究においても現在得られている3種類のチトクロームcについてタンパク質工学的手法を用いて解析すれば、タンパク質の耐熱化機構を単にアミノ酸配列の比較によってではなく、実験的に解明できると思われた。

本章ではチトクロームcを用いたタンパク質工学的研究を目的として*H. thermophilus*のチトクロームc-552遺伝子のクローニングを行ない、その発現について記載した。次章では、*P. aeruginosa*のチトクロームc-551遺伝子のクローニングと発現、及び耐熱性チトクロームcの構造のバリエーションを知る目的で70℃に生育する*H. thermophilus*6株の中でも菌学的に他の5株とは異なる性質を持つTK-6株由来のチトクロームc-552遺伝子のクローニングも行なった。また*H. thermophilus*と*P. aeruginosa*のチトクロームcの中

間的な耐熱性を示す全構造未知の *P. hydrogenothermophila* のチトクローム *c*-552 遺伝子のクローニングの試みについても次章で述べる。

第2節 プローブDNAの合成

第1章で決定された *H. thermophilus* のチトクローム *c*-552 のアミノ酸配列から推定される塩基配列に基づき合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いてチトクローム *c*-552 遺伝子をクローニングすることを試みた。図4-1に示す2本の17塩基のオリゴヌクレオチド、probe 1、probe 2 を Beckman DNA Synthesizer System-1 により合成した。合成後、反応カラムを減圧下で30分間乾燥させ、キャップ付10mLバイアルにオリゴヌクレオチドの付いたシリカポートを入れ、28%アンモニア水を加え室温で2時間放置した。さらにアンモニア水を加え、55°Cで24時間反応させた後、蒸発乾固した。乾固した試料を250 μ Lの10:1 TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH8.0) に溶かし遠心した後、20%ポリアクリルアミドゲルにて300Vで電気泳動を行った。ゲルを0.5 μ g/mLのエチジウムブロマイド溶液中に45分間浸した後、メインバンドを切出し、切り出したゲルをテルモ5mLシリンジに入れピストンを上から押えつけて破碎した。破碎したゲルをEppen tubeに入れ、溶出液 (0.5M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) を加え30°Cで一晩溶出した。Eppen tubeの底に熱した針で穴をあけ、溶出液を回収し、1 mL程度に濃縮した。さらにエタノール沈殿した後、100 μ LのTE bufferに溶かして精製合成DNA溶液とした。

第3節 *H. thermophilus*ゲノムDNAの精製

*H. thermophilus*ゲノムDNAを図4-2に示す方法で抽出、精製した。ジャー培養によって得た湿菌体約2gをリゾチーム、SDSで溶菌し、proteinase Kでタンパク質を分解した後、フェノール・クロロホルム処理を3回行い不溶物を除去した。上清をエタノール沈殿し、沈殿物を真空乾燥した後、TEに溶かしRNase処理をした。さらにTEに対して一晚透析し、精製ゲノムDNA溶液として4℃で保存した。

第4節 サザンハイブリダイゼーション

前節で得られた*H. thermophilus*ゲノムDNAを各種制限酵素で完全分解し、0.8%のアガロースゲルで電気泳動した後、常法に従ってサザントランスファーした²⁸⁾。フィルターはナイロンメンブレン Hybond-N (Amersham社)を使用した。室温で12~18時間DNAをフィルターに移行させた後、2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム)で30分間洗浄した。風乾後、UV光線を5分間照射してDNAをフィルターに固定した。フィルターを密閉容器中、50μg/mLのsalmon sperm DNAを含むハイブリダイゼーションバッファー (0.01% Polyvinylpyrrolidone, 0.01% Ficoll, 0.01% BSA, 6×SSC)で67℃、3時間振盪した。続いて同じく50μg/mLのsalmon sperm DNAを含む同様の緩衝液中で5'末端を[γ-³²P]ATPで標識した30pmolのプロープとフィルターを34℃で15時間振盪した。その後同様の緩衝液でフィルターを4回洗浄し、6×SSCで1回、2×SSCで3回、34℃でそれぞれ30分間振盪してフィルターを洗浄した。サザンハイブリダイゼーションしたフィルターを-80℃に一晚

置いてオートラジオグラフィーをとった。図4-3の結果から2.2-Kb HindIII断片及び6.3-Kb PstI断片がprobe 1、probe 2の両方にハイブリダイゼーションすることが明らかになった。

cell pellet (2mg)
|
suspend in 20 ml of STE
|
add 80 mg lysozyme powder
37 °C x 10 min
add proteinase K final conc. 50µg/ml
37 °C x 30 min
add 10 % SDS final coc. 0.5 %
add proteinase K final conc. 100µg/ml
37 °C x 30 min
add 10 % SDS final conc. 2 %
50 °C x 60 min

x 3 add 1 vol. phenol/chloroform (1:1, saturated with 10:1 TE)
 mix by gently inverting for 10 min

 10000 x g, 10 min at 0 °C

upper phase
|
ethanol perticipation
|
dry under vacuum
|
suspend in 10:1 TE
|
add RNase, final conc. 20µg/ml
37 °C x 30 min
|
dialysis against 10:1 TE
|
chromosomal DNA solution

図4-2 H. thermophilus染色体DNAの調製方法

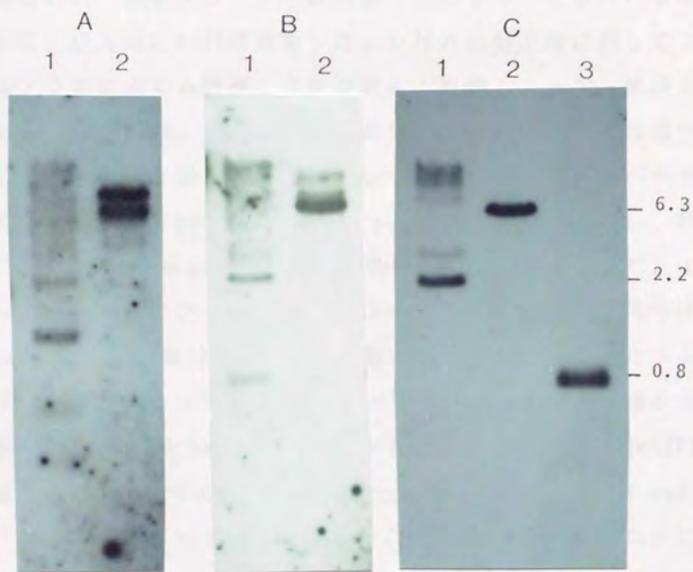


図4-3 各種制限酵素処理した *H. thermophilus* 染色体 DNA のサザンブロット。
 A 及び B、それぞれ probe1 及び probe2 を用いて 34°C でハイブリダイゼーションした。
 C、780-bp PstI-SphI断片をプローブに用いて 65°C でハイブリダイゼーションした。
 レーン 1、HindIII; レーン 2、PstI; レーン 3、PstI+SphI

第5節 コロニーハイブリダイゼーション

2.2-KbのHindIII断片のバンドを含むアガロースゲル部分を切り出し、少量の泳動バッファーを含む透析チューブに入れ100Vで30分間電気泳動した。UVランプでDNAが完全にゲルから溶出したことを確認した後、透析チューブの膜表面にこびりついたDNAをはがすために、逆方向に20秒間通電した。DNAの溶出液に対してフェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理、エーテル処理をそれぞれ2回づつ行い、エタノール沈殿し乾燥させた。その後適量のTEに溶かし供与体DNA溶液として4℃で保存した。ベクタープラスミドとしてはpUC19を用いた。pUC19をHindIIIで分解し、常法に従いBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase)処理を65℃、1時間行った後、十分にフェノール・クロロホルム抽出した。供与体DNA (2.2-KbHindIII断片)とBAP処理したベクタープラスミドを混合しライゲーションを行い、得られたライゲーション混合物を大腸菌JM109に導入し、0.5mMのisopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)、40 μ g/mLの5-bromo-4-chloro-3- β -D-galactopyranoside (X-gal)を含むアンピシリンプレートに塗布した。得られた白色コロニーについて、前述のprobe 1、probe 2を用いたコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。157個の白色コロニーから1個のポジティブクローンが得られた。

第6節 制限酵素解析

前節で得られたポジティブコロニーを2mlの系で液体培養し、菌体からアルカリ溶菌法によって組換えプラスミドDNAを抽出し、各種制限酵素で処理し、制限地図を作成した(図4-4)。probe 1、

probe 2 を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、780-bpの PstI-SphI断片が両プローブにハイブリダイゼーションした。
 [α - 32 P]dCTPで標識した780-bpの PstI-SphI断片をプローブに用いてゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーションを行なったところ780-bpの PstI-SphIのバンドに加えて、2.2-Kb HindIII断片及び6.3-Kb PstI断片ともハイブリダイゼーションした(図4-3)。

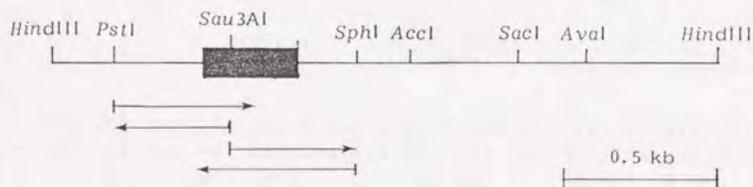


図4-4 チトクローム c-552遺伝子を含むDNA断片の制限地図及び配列決定のための戦略。黒塗り部分はチトクローム c-552遺伝子を、矢印はDNA配列決定した部分を示す。

第7節 塩基配列決定

前節で得られた780-bpの PstI-SphI断片及びその断片を Sau3AIで分解することによって得られる断片をM13mp18及びmp19にクローン化し、Sequenase version 2.0を用いたダイデオキシ法でその一本鎖DNAの塩基配列を決定した。その結果チトクローム c-552の全アミノ酸配列をコードするDNA配列が780-bpの PstI-SphI断片中に見出された(図4-5)。さらに成熟型チトクローム c-552のN末端のAsnの5'側には細菌に典型的に見られる18アミノ酸残基のシグナル配列が存在し、このことからチトクローム c-552は *in vivo*では前駆体として合成され、ペリプラズムに輸送される段階でN末端の18残基が切断されることが示唆された。現在までにクローニングされた細菌のチトクローム c遺伝子にはどれもシグナル配列がコー

GGATACATCCCCTTCATAGGGCAGATGGTGAAAGAGGTGGACATAGAAGGTAATAAATCAAG 63
 GTATCTGACATGCTTTCAGAAATCTACCCGTGAACCTTTCATCTTGGTTTCATAAACTGTTTG 126
 TATTATAATATTGCAAACACTTTAAAAAGGAGGTAGAGGC ATG AAG AAG TTT CTG TTA 183
 Met Lys Lys Phe Leu Leu
 GTA GCT GTA GTG GGG CTG GCA GGC ATA ACC TTT GCC AAT GAA CAG CTT 231
 Val Ala Val Val Gly Leu Ala Gly Ile Thr Phe Ala Asn Glu Gln Leu
 GCC AAG CAA AAG GGC TGT ATG GCT TGC CAC GAT CTG AAA GCT AAG AAG 279
 Ala Lys Gln Lys Gly Cys Met Ala Cys His Asp Leu Lys Ala Lys Lys
 GTG GGA CCT GCT TAC GCA GAT GTA GCT AAG AAG TAT GCG GGA AGA AAG 327
 Val Gly Pro Ala Tyr Ala Asp Val Ala Lys Lys Tyr Ala Gly Arg Lys
 GAT GCT GTT GAT TAT CTG GCT GGC AAG ATA AAG AAG GGC GGT TAT GGT 375
 Asp Ala Val Asp Tyr Leu Ala Gly Lys Ile Lys Lys Gly Gly Ser Gly
 GTG TGG GGT TCT GTT CCC ATG CCT CCT CAA AAT GTA ACC GAT GCG GAA 423
 Val Trp Gly Ser Val Pro Met Pro Pro Gln Asn Val Thr Asp Ala Glu
 GCA AAA CAG CTT GCC CAG TGG ATA CTC TCC ATA AAG TAA GTTTTGGGG 473
 Ala Lys Gln Leu Ala Gln Trp Ile Leu Ser Ile Lys TER
 CGTTATGCCCCCTCCAGAGGATTACATCTGTTAATGTTTCCAAAGCAATTAGGACATAGATCA 536
 AAAAAACACCAGGAGTCCCAATCCTCCCAGCATCATGTTTACCTGAGTTATCACAAGGTTTTCC 599

図4-5 チトクロームc-552遺伝子のDNA配列。下線は考えられるプロモーター領域。SD様配列は四角で囲んだ。反復配列は向合った矢印で示し、垂直矢印は成熟タンパク質のN末端を示す。

ドされており、細菌チトクローム *c* のペリプラズムへの輸送は一般的な現象であると思われた。また典型的な SD 配列がチトクローム *c*-552 構造遺伝子の開始コドンの 7 塩基上流に見られた。さらにその上流には他の細菌に見られるコンセンサスなプロモーター配列が見られ、またオープンリーディングフレームの下流には反復配列があり、これが転写終結のシグナルであると思われた。またアミノ酸残基数 100 足らずの情報ではあるが、今後の研究の参考のためコドン利用頻度の表をここに掲げておく (表 4-1)。

表 4-1 *H. thermophilus* チトクローム *c*-552 遺伝子のコドン利用頻度表

Arg (1)	CGT CGC CGG CGA AGG AGA	0 0 0 0 0 1	Leu (8)	TTG TTA CTT CTC CTG CTA	0 1 2 1 4 0	Ser (3)	TCT TCC TCG TCA AGT AGC	2 1 0 0 0 0
Thr (2)	ACT ACC ACG ACA	0 2 0 0	Pro (4)	CCT CCC CCG CCA	3 1 0 0	Val (9)	GTT GTC GTG GTA	2 0 3 4
Ala (15)	GCT GCC GCG GCA	7 3 2 3	Gly (10)	GGT GGC GGG GGA	3 4 1 2	Ile (4)	ATT ATC ATA	0 0 4
Asn (2)	AAT AAC	2 0	Gln (5)	CAG CAA	3 2	Tyr (3)	TAT TAC	2 1
His (1)	CAT CAC	0 1	Glu (2)	GAG GAA	0 2	Cys (2)	TGT TGC	1 1
Asp (5)	GAT GAC	5 0	Phe (2)	TTT TTC	2 0	Lys (15)	AAG AAA	13 2
Met (3)	ATG	3	Trp (2)	TGG	2			

第8節 チトクローム c-552 遺伝子の大腸菌における発現

チトクローム c-552 遺伝子が大腸菌で発現させるためのベクターとして pKK223-3 (ファルマシア) を選択した。本ベクターの tac プロモターの直後のマルチクローニングサイトにチトクローム c-552 遺伝子を導入するため、先ず前節で得られたチトクローム c-552 遺伝子の 5' 及び 3' 側にそれぞれ EcoRI 及び SalI サイトを持つ 2 種類の遺伝子を site directed mutagenesis の手法を用いて構築した。1 つはチトクローム c-552 のシグナル配列を含むもので、開始コドンの直前に EcoRI サイトを、さらに終止コドンの直後に SalI サイトを導入してある (CH11、図 4-6)。もう 1 つは成熟型チトクローム c-552 の N 末端アミノ酸残基をコードするコドンの直前に EcoRI サイトとそれに続けて ATG を、さらに終止コドンの直後には SalI サイトを導入した (CH12、図 4-6)。Site directed mutagenesis の手法は前節で得られた 780-bp の PstI-SphI 断片を M13mp19 に挿入し、図 4-7 に示す変異導入用合成 DNA を用いた Kunkel の方法に従った²⁹⁾。EcoRI 及び SalI で切り出されるそれぞれ 303-bp、252-bp のチトクローム c-552 遺伝子を pKK223-3 のマルチクローニングサイト上の EcoRI 及び SalI サイトに挿入した。得られた組換えプラスミドのうちシグナル配列を含む方を pKHC11、含まない方を pKHC12 と命名した (図 4-8)。

表 4-2 に示す培地をメディウム瓶に満たすことによって硝酸塩存在下嫌氣的にそれぞれの組換えプラスミドが導入された大腸菌 JM109 を培養した。IPTG 添加、無添加でのそれぞれのプラスミドを持つ大腸菌の集菌菌体の色は、0.5mM IPTG 添加で pKHC12 を持つもののみがピンク色を呈し、他 3 通りについては大腸菌 JM109 本来の白色であった。この結果からチトクローム c-552 遺伝子とそのシグナル

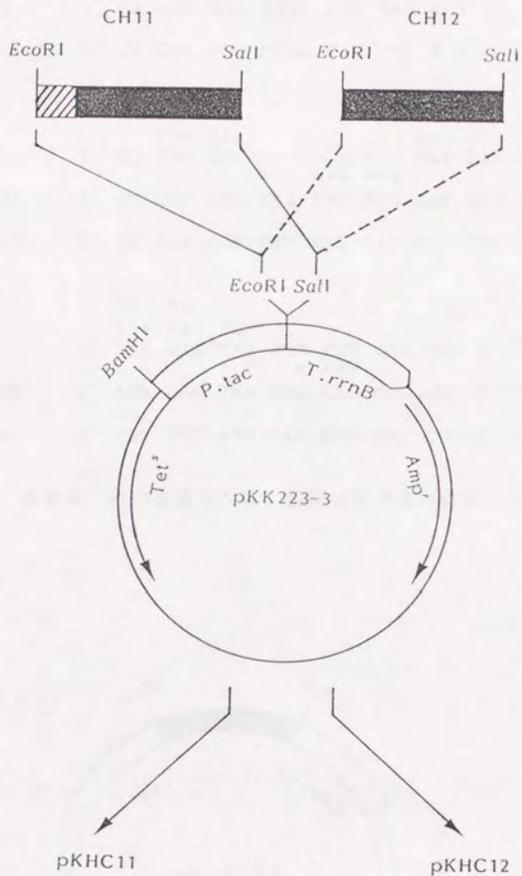


図4-6 大腸菌内発現用に作製したチトクロームc-552遺伝子。CH11の斜線部分はシグナル配列を示す。

				-18	-17		
				MET	Lys		
wild	5'	GA GGT AGA	GG-C	ATG	AAG	A	3'

mutant	5'	GA GGT AGA	ATTC	ATG	AAG	A	3'
primer	3'	CT CCA TCT	TAAG	TAC	TTC	T	5'
		-2	-1			1	2
		Phe	Ala			Asn	Glu
wild	5'	CC TTT GCC	---	---	---	AAT	GAA CA 3'
			***	***	***		
mutant	5'	CC TTT GCC	GAA	TTC	ATG	AAT	GAA CA 3'
primer	3'	GG AAA CGG	CTT	AAG	TAC	TTA	CTT GT 5'
		79	80				
		Ile	Lys	TER			
wild	5'	ATA AAG TAA	GTT	TTT	GGG	GGC	G 3'
			*	***			
mutant	5'	ATA AAG TAA	GTC	GAC	GGG	GGC	G 3'
primer	3'	TAT TTC ATT	CAG	CTG	CCC	CCG	C 5'

図4-7 変異導入用の合成DNA。星印は変異または挿入した塩基

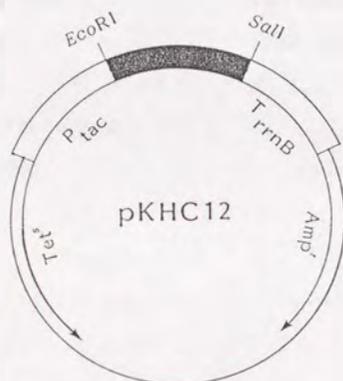


図4-8 pKHC12の構築。

黒塗り部分はシグナル配列を除去したチトクロームc-552遺伝子

配列を除去した場合に大腸菌内でpKK223-3のtacプロモーターの制御下で発現し、その産物にはヘムcが結合していることが示唆された。

表4-2 大腸菌嫌気培養用の培地

0.5% Bact-pepton	50mM NaHCO ₃
1% glucose	1μg/ml thiamine
0.08% NaNO ₃	1μM ammonium molybdate
0.01% MgSO ₄ 7H ₂ O	1μM selenous acid
0.7% K ₂ HPO ₄	12μM ferric citrate
0.3% KH ₂ PO ₄	pH 7.0
0.05% Na ₃ citrate3H ₂ O	
0.1% (NH ₄) ₂ SO ₄	

第9節 大腸菌で合成されたチトクローム c-552の精製及びその特徴

嫌氣的に培養した大腸菌 (pKHC12) の無細胞抽出液 (C F E) より第1章に示したチトクローム c-552の精製方法に従ってチトクローム c-552を精製した。その精製過程を表4-3に示す。表中ヘム含量は *H. thermophilus* の菌体から精製したチトクローム c-552の552-540 nmの酸化還元差スペクトルより求めた ϵ (モル吸光係数) = $16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて定量した。なおチトクローム c の酸化剤としてフェリシアン化カリウムを、還元剤としてはジチオナイトをそれぞれ用いた。またタンパク質濃度はウマチトクローム c を標準タンパク質としてBio Radのキットを用いて求めた。大腸菌 C F E からの最終調製物は30%の収率で243倍に精製され、結果は示していないがSDS-PAGEで単一バンドであった。またチトクローム c-552の比ヘム含量は $141.1 \text{ nmol heme c/mg protein}$ であり、チトクローム c-552の分子量7,600から、ヘム含量は $1.07 \text{ mol heme c/mol protein}$ と計算され、この値からヘム c が精製された全タンパク質分子に1:1の割合で結合していることが示された。さらに大腸菌から精製したチトクローム c-552の還元型吸収スペクトルは *H. thermophilus* より精製したチトクローム c-552のそれと一致していた (図4-9)。またN末端から10残基のアミノ酸配列はMet-Asn-Glu-Gln-Leu-Ala-Lys-Gln-Lys-Glyと決定され、N末端のMetは切断されていないかった。2番目からのアミノ酸配列は *H. thermophilus* より精製したチトクローム c-552と一致していた。N末端のMetが切断されない理由としては2番目のアミノ酸残基Asnの回転半径が比較的大きく宿主である大腸菌のメチオニンアミノペプチダーゼ³⁰⁾がチトクローム c-552のN末端部分に対して不活性であることが考えられる。以下、

表4-3 大腸菌嫌気培養菌体からのチトクローム c-552の精製工程及び大腸菌好気培養菌体中のチトクローム c-552含量

Fraction	Total protein	Expressed cytochrome <u>c</u> -552			
		total heme content	specific heme content	yield	purification
	mg	nmol	nmol/mg	%	-fold
anaerobic					
CFE	896	521	0.58	100	1.0
CM	5.5	210	38.4	40	66
Green A	1.1	156	141.1	30	243
aerobic					
CFE	1715	328	0.19		

CFE, cell-free extract; CM, CM-Toyopearl 650S; Green A, Dye Matrex Green A.

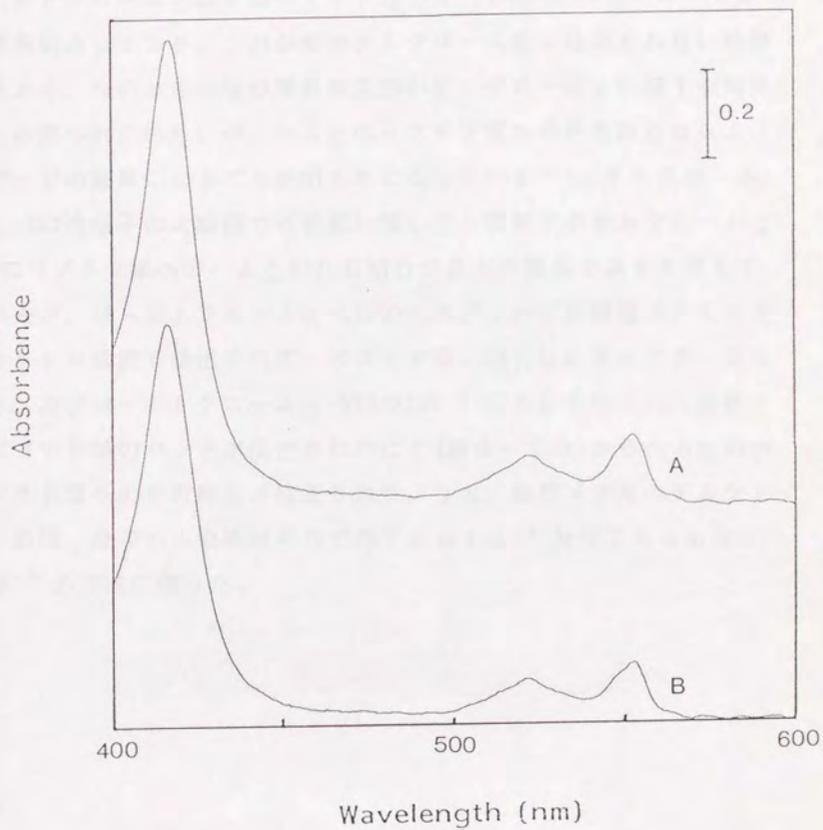


図4-9 還元型チトクロームc-552のスペクトル。A、大腸菌(pKHC12)で合成されたチトクロームc-552； B、*H. thermophilus*で合成されたチトクロームc-552

本論文では大腸菌で合成されたチトクローム c-552をそのN末端にMetが付加していることからM-チトクローム c-552と呼ぶことにする。

チトクローム cはそのペプチド鎖の2つのCysにヘムグループが共有結合しており、これが他のチトクローム類には見られない特徴である。今のところ酵母等真核生物のチトクローム cに関する知見しか得られていないが、ヘム cのペプチド鎖への共有結合はヘムリアーゼの触媒によることが明らかになっている³¹⁾。チトクローム c-552遺伝子の大腸菌での発現に関して、当初アポチトクローム c-552ペプチド鎖へのヘム cの共有結合が最大の難点であると考えていたが、M-チトクローム c-552のヘムグループが酸性メチルエチルケトン処理で抽出されず、ペプチド鎖に結合したままであったこと、及びM-チトクローム c-552のSDS-PAGE上におけるヘム染色でペプチド鎖のバンドが染色されたこと(図4-10)からヘム cのペプチド鎖への共有結合が確認された。なお、酸性メチルエチルケトン処理、及びヘム染色はそれぞれTeale³²⁾及びThomasら³³⁾の方法に従った。

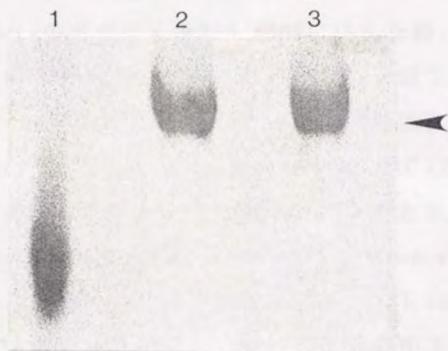


図4-10 SDS-PAGE後のヘム染色。レーン1、ウシヘミン (Sigma Type I) ;
 レーン2、大腸菌 (pKHC12) で合成されたチトクローム c-552 ;
 レーン3、*H. thermophilus* で合成されたチトクローム c-552
 矢印はチトクローム c-552のバンドを示す。

第10節 大腸菌におけるM-チトクロームc-552の生産条件

大腸菌JM109 (pKHC12)を硝酸塩存在下嫌氣的または硝酸塩非存在下好氣的に培養し、それぞれのM-チトクロームc-552含量を比較した。結果は前述の表4-3に示した。比ヘム含量の比較から嫌氣的条件下で生育させた方がよりホロ型M-チトクロームc-552を生産していることが明らかになった。次に各培養条件で得られた大腸菌のCFEに対して抗体を用いた実験を行なった。抗チトクロームc-552抗体は*H. thermophilus*より精製したチトクロームc-552を抗原に用いてウサギで作成した(株)免疫生物研究所に依頼)。タンパク質量約20 μ gの各CFEをSDS-PAGEに供した後、ATTO ホライズプロット AE-6670型を用いてゲルからタンパク質をニトロセルロースメンブレン(Amersham)に転写した。転写用緩衝液には0.1M Tris、0.192M Glycine、20%(v/v) methanolを用いて170mAの定電流で20分間通電した。メンブレン上でのタンパク質と抗体との反応及びその検出はstreptavidin-biotinylated alkaline phosphataseを用いたアマシャム社製のプロットティング検出キット(RPN. 66)を用いた。図4-11の結果は嫌氣及び好氣両培養条件下、IPTG存在下ではチトクロームc-552に相当するバンドの濃さがほぼ同じであることから、等量のM-チトクロームc-552ペプチド鎖が生産されていることを示している。しかし、表4-3に示した結果はホロ型M-チトクロームc-552の発現量には両培養条件下で差が見られることを示している。以上の結果は大腸菌では好氣条件下でヘムcの生合成過程またはアポ型M-チトクロームc-552へのヘムcの共有結合過程に限界があり、ホロ型M-チトクロームc-552の発現量が抑えられているためと考えられた。本研究の実験系では大腸菌自身が持つC型チトクローム類が検出されなかったが、好氣条件下で



図4-11 大腸菌 C F E に対する抗チトクローム c -552 抗体を用いたウエスタンブロット。レーン 1、精製 *Thermophilus* チトクローム c -552；レーン 2、大腸菌非組換え体 C F E；レーン 3、IPTG 無添加の大腸菌 (pKHC12) C F E (好気)；レーン 4、IPTG 添加の大腸菌 (pKHC12) C F E (好気)；レーン 5、IPTG 無添加の大腸菌 (pKHC12) C F E (嫌気)；レーン 6、IPTG 添加の大腸菌 (pKHC12) C F E (嫌気)。矢印はチトクローム c -552 のバンドを示す。

は大腸菌内でヘム c の供給が低下するという本研究の示唆的な実験結果は、本研究に先行する大腸菌由来のチトクローム c の生産量が嫌気条件下で増加する^{3,4)}という結果と一致している。また pKHC12 の tac プロモーター、チトクローム c -552 遺伝子、及び TrnB を含む BamHI-ScaI 断片を pKK223-3 よりコピー数が高い発現ベクター pUC118 の BamHI、HincII サイトに導入し、その組換えプラスミド (pUK812) を持つ大腸菌を pKHC12 と同様に硝酸塩存在下嫌氣的に培養した。得られた菌体のホロ型 M-チトクローム c -552 含量はプラスミドのコピー数が高いにもかかわらず、pKHC12 の場合と等量であった。これはアポ型タンパク質の量は増加したがホロ型の量は変化がないことを示唆している。このことから大腸菌においては嫌気条件下においてもヘム c の供給が律速となってホロ型 M-チトクローム c -552 の生成量が抑えられていると思われた。

外来のチトクローム c としては本研究の他に *Bacillus subtilis* チトクローム c -550⁴⁾、及び *Rhodobacter sphaeroides* チトクローム c ³⁾ が大腸菌でホロ型として発現している。R. *sphaeroides*

チトクローム c 遺伝子は、大腸菌内において好気条件下では全く発現されないと報告されており、大腸菌におけるヘム c の供給も含めたホロ型チトクローム c の生合成に興味を持たれる。

第8節においてシグナル配列存在型の組換えプラスミド pKHC11 が導入された大腸菌の集菌菌体の色は大腸菌 (pKHC12) の M-チトクローム c -552 生産条件下でもピンク色にならないと述べた。そこで大腸菌 (pKHC11) の C F E 中のチトクローム c -552 ペプチドを先程と同様に抗体で検出したところ、チトクローム c -552 に相当するバンドは見られなかった (data not shown)。この現象の詳細については分っていないが、シグナル配列存在型のチトクローム c -552 のポリペプチドは大腸菌内でヘム c が結合することなく消化されてしまうと考えられた。

第11節 M-チトクローム c -552 の大腸菌内における局在性

T a i と K a p l a n の方法³⁵⁾を改良した方法で大腸菌 (pKHC12) のペリプラズム画分及びサイトプラズム画分を分画した。分画方法を図4-12に示す。マーカー酵素として malate dehydrogenase (サイトプラズムに局在)、及び β -lactamase (ペリプラズムに局在) の活性を常法に従って測定した^{36, 37)}。それぞれの画分の M-チトクローム c -552 含量を定量した結果を表4-4に示す。マーカー酵素の回収パターンから本分画法が適切であり、M-チトクローム c -552 はサイトプラズムに局在することが示された。現在のところ細菌の C 型チトクロームの生合成に関する知見はほとんど得られていないが、酵母ミトコンドリアにおけるチトクローム c の生合成に関する知見³¹⁾、及びクローニングされた細菌チトクローム c にはど

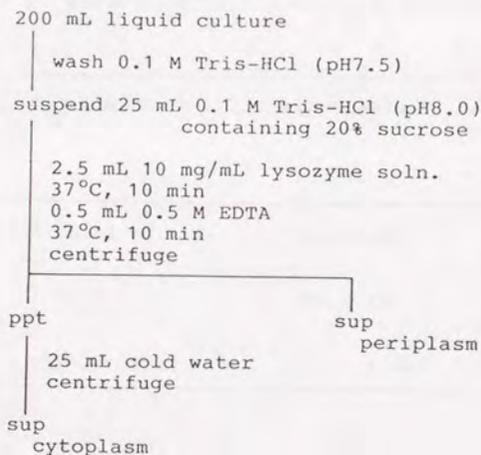


図4-12 大腸菌の細胞分画方法

れもシグナル配列が見られることから、細菌のC型チトクロームはそのペプチド鎖の翻訳後、ペリプラズムに輸送されシグナルペプチドが切断し、その後ヘムcが酵素的に付加され最終的な立体構造が形成され则认为られている。前節で述べた *B. subtilis* チトクロームc-550、及び *R. sphaeroides* チトクロームc₂は大腸菌内でそのシグナルペプチドが正しく切断され、ペリプラズムに局在していることから大腸菌においてもヘムcはペリプラズムで結合すると考えられる。しかし、本節の結果からM-チトクロームc-552はサイトプラズムに局在していることが明らかになり、大腸菌はサイトプラズムにおいてもヘムcを結合する能力を持つことが示された。

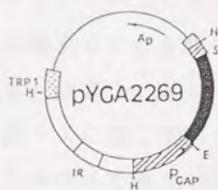
表4-4 大腸菌で発現したチトクローム c-552の局在性

Fraction	Cytochrome <u>c</u> -552	β -Lactamase	Malate
			dehydrogenase
	nmol	units/mL	units/mL
periplasm	30.9 (7%)	59.2 (96%)	156 (16%)
cytoplasm	390.3 (93%)	2.4 (4%)	793 (84%)

第12節 チトクローム c-552遺伝子の酵母による発現の試み

本章においてこれまでにチトクローム c-552遺伝子が大腸菌サイトプラズム内でホロ型タンパク質として発現することを記述したが、大腸菌においてはヘム c の供給が律速となっているためホロ型M-チトクローム c-552の生成量が抑えられていると思われた。そこで生産性の高い発現系を確立する目的でチトクローム c-552遺伝子をヘム c の供給が豊富であると思われる酵母で発現させることを試みた。第8節で作製したシグナル存在型(CH11)、及び非存在型(CH12)の2つのチトクローム c-552遺伝子、EcoRI-SalI断片をトリプトファンを栄養要求性マーカーとする大腸菌-酵母のシャトルベクターpYGA2269¹⁾(図4-13)のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP)プロモーター直後のEcoRI及びSalIサイトに導入した。得られたプラスミドpYHTC11(シグナル存在型)及びpYHTC12(シグナル非存在型)をiso-1-チトクローム c が欠損した酵母*Saccharomyces cerevisiae* XS-30-2B (MAT α 、his3、ura3、leu2、trp1) Δ CYC1¹⁾

に導入し、トリプトファン非存在下に生育可能な組換え体を2%カザミノ酸、グルコースを含むバークホルダー (Burkholder) の培地で好氣的に培養した。得られた菌体約5 gを5 mLの1 M NaCl及び2.5 mLの酢酸エチルに懸濁し、18時間ゆっくりと振盪することによって溶菌した。得られた酢酸エチル抽出物を第10節の方法に従ってSDS-PAGEに供し、チトクローム c-552の抗体を用いたウエスタンブロッティングによってチトクローム c-552の発現の有無を調べた。その結果を図4-14に示す。大腸菌による発現と同様、チトクローム c-552のポリペプチドはシグナル配列非存在型の場合のみにしか検出されなかった。



1 2 3 4 5



図4-13 酵母発現ベクター-pYGA2269

図4-14 酵母CFEに対するウエスタンブロッ
 レーン1、精製*H. thermophilus*チトクローム c-55
 レーン2、酵母XS-30-2BのCFE;
 レーン3、酵母XS-30-2B ΔCYC1のCFE;
 レーン4、pYHTC11; レーン5、pYHTC12。
 矢印はチトクローム c-552のバンドを示す。

次に組換え体酵母、*S. cerevisiae* XS-30-2BΔCYC1 (pYHTC12)を非発酵性の基質、乳酸を1%含有する最小培地(YNEL; 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.05% yeast extract, and necessary supplements)で好氣的に培養した。同様のiso-1-チトクロームc欠損株に同様の発現ベクターによってiso-1-チトクロームc (CYC1) 遺伝子を導入した組換え体はチトクロームc欠損を相補し、好気条件下YNEL培地で生育可能であるが、pYHTC12を持つ組換え体はYNEL培地で生育することができず(図4-15)pYHTC12によって酵母のチトクロームc欠損が相補されないことが示された。さらに酵母(pYHTC12)の酢酸エチル抽出物のスペクトルを測定したところ、チトクロームc-552のピークは見られず、このことと考え合わせて、酵母においてはチトクロームc-552ペプチド鎖は合成されるが、ヘムcが結合しないアポ型のままであることが示された。序論でも述べたように現在までに酵母を宿主としてヒト及びラット由来のチトクロームcがホロ型として発現し酵母のチトクロームc欠損を相補することが報告されている^{1,2)}。ヒト及びラットのチトクロームcはDickersonの分類によれば酵母由来のものと同じMクラスに属している。第1章で述べたようにチトクロームc-552はSクラスであり(図4-16)、酵母でのチトクロームcの生合成過程において、アポ型からホロ型の形成段階に種特異性があることが示唆された。さらに、本研究に先行して酵母*S. cerevisiae*のヘムリアーゼはiso-1-及びiso-2-チトクロームcに対しては活性があるがチトクロームc₁に対しては不活性であることが示されており、ヘムリアーゼの基質特異性は高いと考えられている^{3,8)}。また、本章でチトクロームc-552は大腸菌でホロ型として発現したことを述べたが、逆にヒトのチトクロームcは大腸菌内ではアポ型のままで

あった(私信、サントリー田中良和)ことから大腸菌においてもホロ型チトクロームcの生合成系における種特異性の存在が示唆された。

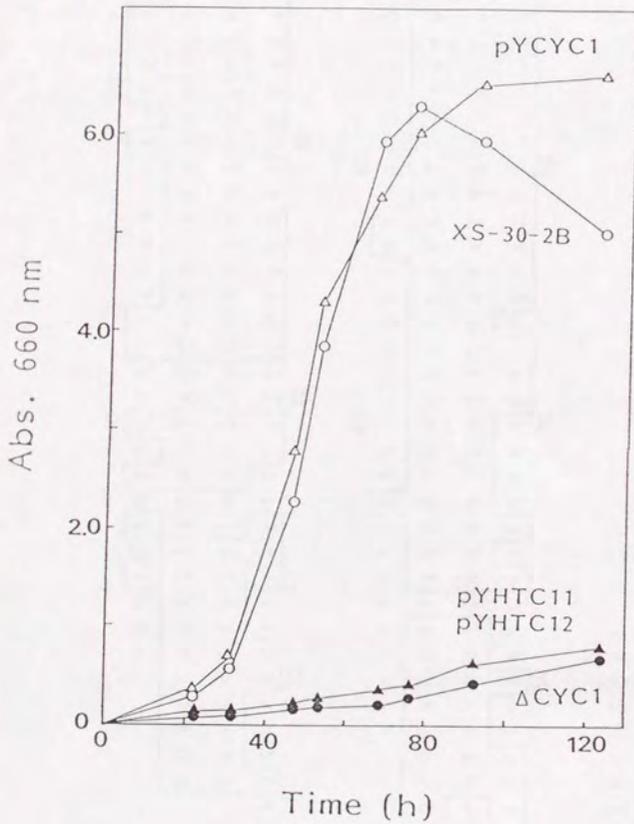


図4-15 YNEL培地での各種組み換え体酵母の生育

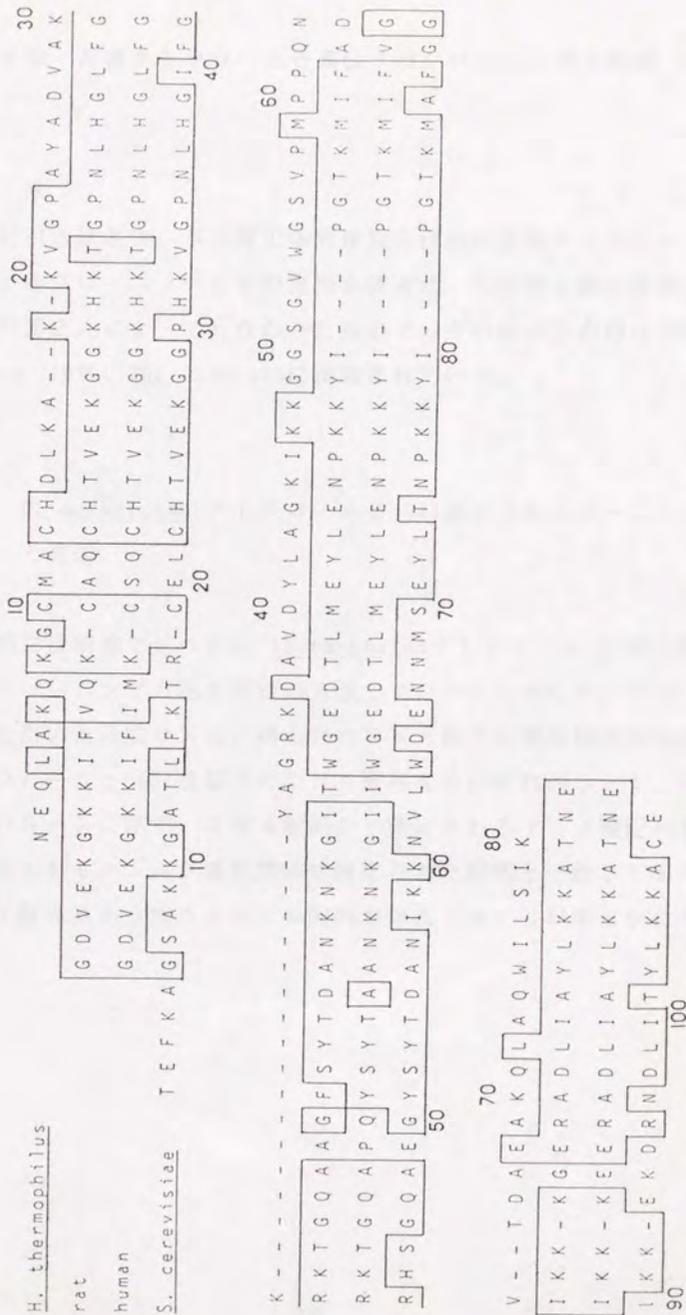


図4-16 各種C型チトクロームの配列比較

第5章 各種チトクローム c 遺伝子のクローニングと発現

第1節 序

前章に引き続きタンパク質工学的研究を目的に各種チトクローム c 遺伝子をクローニングしその発現を試みた。なお第2節の実験は主に新井博之氏によって行なわれたもので、その前半の内容はFEBS Letters (1990) 261, 195-198に掲載されている。

第2節 *P. aeruginosa* チトクローム c-551遺伝子のクローニングと発現

2-1 クローニング

基本的には前章で述べた *H. thermophilus* チトクローム c-552 遺伝子のクローニング方法と同様の方法でクローニングした。クローニングに用いた合成DNA、得られたDNA断片の制限酵素地図及びチトクローム c-551 遺伝子のDNA配列をそれぞれ図5-1、5-2及び5-3に示す。DNA配列から推定されるアミノ酸配列は既に報告のあるタンパク質化学的に決定された配列と一致しており、22アミノ酸残基から成るシグナル配列が存在することが明らかになった。

	7	8	9	10	11	12	13
Amino acid sequence	-Phe-Lys-Asn-Lys-Gly-Cys-Val-						
possible anticodons	AAR	TTY	TTR	TTY	CCN	ACR	CAN
probe PA-1	3' AAG TTC TTG TTC CCG ACG CA 5'						

	45	46	47	48	49	50	51
Amino acid sequence	-Ala-Gln-Arg-Ile-Lys-Asn-Gly-						
possible anticodons	CGN	GTY	KCN	TAZ	TTY	TTR	CCN
probe PA-2	3' CGN GTC GCN TAG TTC TTG CC 5'						

N=A/C/G/T R=A/G Y=C/T K=G/T Z=A/G/T

図5-1 チトクローム c-551 遺伝子クローニングのための合成DNA

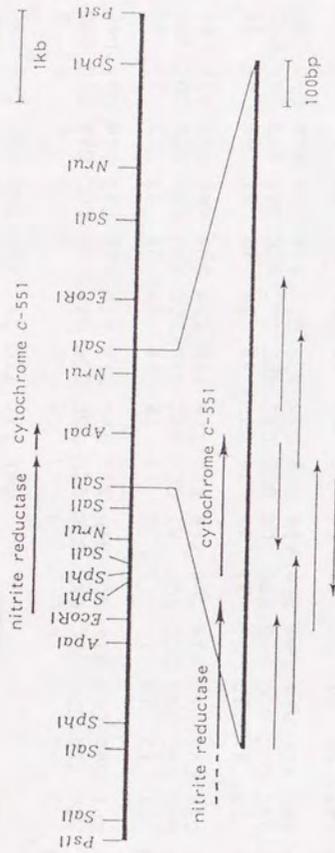


図5-2 ナトクロームc-551遺伝子を含むDNA断片の制限地図及び配列決定のための戦略。下部の矢印は配列決定した部分を示す。

GCACGCTCCCCCTACGAGGACCGTG ATG AAA CCG TAC GCA CTG CTT TCG CTG CTC GCC ACC 410
 Met Lys Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Leu Ala Thr
 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 GGC ACC CTG CTC GCC CAG GGC GGC TGG GCC GAA GAC CCC GAA GTG CTG TTC AAG AAC 467
 Gly Thr Leu Leu Ala Gln Gly Ala Trp Ala Glu Asp Pro Glu Val Leu Phe Lys Asn
 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 AAG GGC TGC GTG GCC TGC CAT GCC ATC GAC ACC AAG ATG GTC GGC CCG GCC TAC AAG 524
 Lys Gly Cys Val Ala Cys His Ala Ile Asp Thr Lys Met Val Gly Pro Ala Tyr Lys
 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47
 GAC GTC GCC GCC AAG TTC GCC GGC CAG GCC GGC GAA GCG GAA CTC GCG CAG CCG 581
 Asp Val Ala Ala Lys Phe Ala Gly Gln Ala Glu Ala Glu Leu Ala Gln Arg
 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66
 ATC AAG AAC GGC AGC CAG GGC GTC TGG GGC CCG ATC CCG ATG CCG CCG AAC CCG GTC 638
 Ile Lys Asn Gly Ser Gln Gly Val Trp Gly Pro Ile Pro Met Pro Pro Asn Ala Val
 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82
 AGC GAC GAC GAG CCG CAG ACC CTG GCG AAG TGG GTC CTG TCG CAG AAA TGA ACGCCCC 696
 Ser Asp Asp Glu Ala Gln Thr Leu Ala Lys Trp Val Leu Ser Gln Lys TER
 TCCGGACTTCGGCGCGCCGCCAGCCCTTGTGGCTGGCCCTCGCGGTACGTTCCGCTGTCTCTCCGGG 771
 CCTGGCGGACGAGCATCCCGATGCCCGTCCCGCCAGGCCCCAGTTCCGGTCACTGCTGTTGACGAGACTGGCGCTCCTG 846
 CCACGGCCCTGCGCCTGACCGGGCGCCTCGGGCCCGGGCTGACCCCCGAGGCCCTGGCGGCAAGCCGGCGGAATC 921

図5-3 サトクロールc-551遺伝子のDNA配列

2-2 発現

図5-4に示した変異導入用合成DNA、PA-4、PA-5及び合成DNA、PA-6、PA-7を用いて前章と同様、シグナル配列存在型及び非存在型の2つのチトクローム c-551遺伝子のEcoRI-SalI断片を作製した。得られたチトクローム c-551 DNA断片を大腸菌発現ベクター-pKK223-3と広宿主域ベクター-pMFY40³⁹⁾とから構築した発現ベクター-pHA10のtacプロモーターの直後に挿入し(図5-5)、ヘルパーファージ pRK2013を用いた三親接合法⁴⁰⁾によって*P. aeruginosa* PA01161に導入した。得られたそれぞれの組換え体のCFEを分光的に分析したところ、シグナルペプチド存在型のチトクローム c-551遺伝子が導入された菌体は好気及び嫌気どちらの条件下においても非組換え体に比べてチトクローム c-551の発現量が増加していた。またチトクローム c-551が高発現している菌体から精製したチトクローム c-551のアミノ酸配列を決定したところ、シグナル配列は正しく切断されていることが明らかになった。

第3節 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-G株のチトクローム c-552遺伝子のクローニング

本節でクローニングしようとしているチトクローム c-552は前章でクローニングしたTK-6株由来のものと高い類似性を持つと思われるため前章で作製したチトクローム c-552遺伝子、CH12をプローブに用いて前章と同様の手順でクローニングした。なおCH12はニッポンジーン社製のDNAラベリングキットを用いて[α -³²P]dCTPで標識した。TK-G株ゲノムDNAよりサザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションによってTK-6株と全く同様の780-

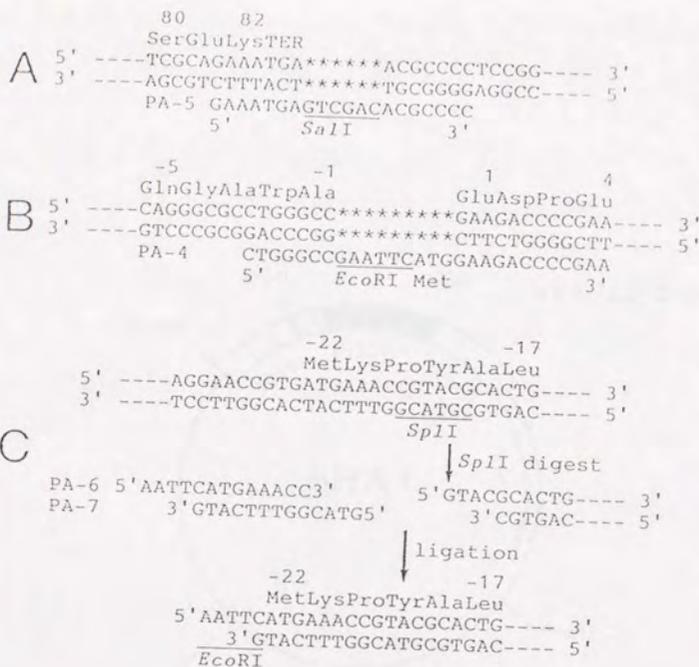


図5-4 チトクローム c-551 遺伝子発現のための変異導入用の合成 DNA

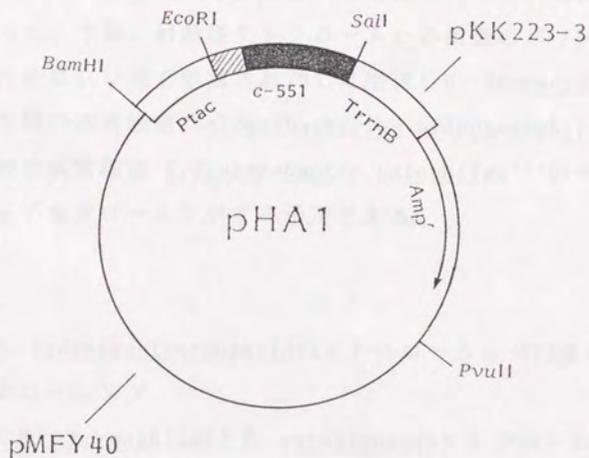


図5-5 pHA10にシグナル配列存在型のチトクローム *c-551* 遺伝子を挿入したpHA1の構築

bp PstI-SphI断片を得た。本断片の配列を決定したところシグナル配列を含めてTK-6株由来のチトクローム c-552と全く同様の配列が見出された。さらにここで得られた780-bp PstI-SphI断片の全DNA配列は、前章で得られたTK-6株由来の同様の断片と完全に一致していた。本節の実験目的は耐熱性のあると思われるチトクローム cの構造のバリエーションを得ることであったが、既知であるTK-6株由来のチトクローム c-552の構造と同じであったので、目的は達成できなかった。今後、耐熱性チトクローム cの構造のバリエーションを知るために、ソ連で単離され70°Cに生育し *H. thermophilus*と似た性質を持つ水素細菌 *Calderobacterium hydrogenophilum*⁴¹⁾及び好塩好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter halophilus*⁴²⁾のチトクローム c 遺伝子をクローニングする予定である。

第4節 *P. hydrogenothermophila*のチトクローム c-552遺伝子のクローニング

第3章で *H. thermophilus*と *P. aeruginosa*のチトクローム cの中間型の配列で、中間型の耐熱性を持つ *P. hydrogenothermophila*のチトクローム c-552遺伝子を前二者のチトクローム c 遺伝子をプローブに用いて現在クローニングしているところである。

第6章 アミノ酸置換によるチトクロームcの耐熱性の変化

第1節 序

第4、5章でアミノ酸配列は類似しているが耐熱性が大きく異なる *H. thermophilus* 及び *P. aeruginosa* のチトクロームc遺伝子をクローニングし、その発現系を確立した。第2章では2つのチトクロームcにおける耐熱性の差を α ヘリックスの安定性の差に帰着した。本章では耐熱性に関与すると思われるアミノ酸残基を2つのチトクロームc相互の配列を参考に置換し、得られた変異型チトクロームcの耐熱性を測定した。

第2節 M-チトクロームc-552の耐熱性

第4章では大腸菌が生産する *H. thermophilus* のチトクロームc-552をそのN末端にMetが付加していることからM-チトクロームc-552と命名した。本節ではM-チトクロームc-552の耐熱性を第2章と同様にCD 222nmをパラメーターに用いて測定した。100°Cまでの昇温では *H. thermophilus* 由来の野性型と同様にM-チトクロームc-552は変性しなかったが、1.5M塩酸グアニジン存在下で同様の昇温実験を行なったところT_mは野性型より5°C低い85°Cであった(図6-1)。昇温実験に用いたM-チトクロームc-552及び野性型のチトクロームc-552は共に酸化型であり、それらの吸収スペクトルは紫外部に至るまで完全に一致していた(図6-2)。さらに400~600 nmの還元型吸収スペクトルも第4章に記載したように完全に一致している。また210~250 nmのCDスペクトルにも違いは見ら

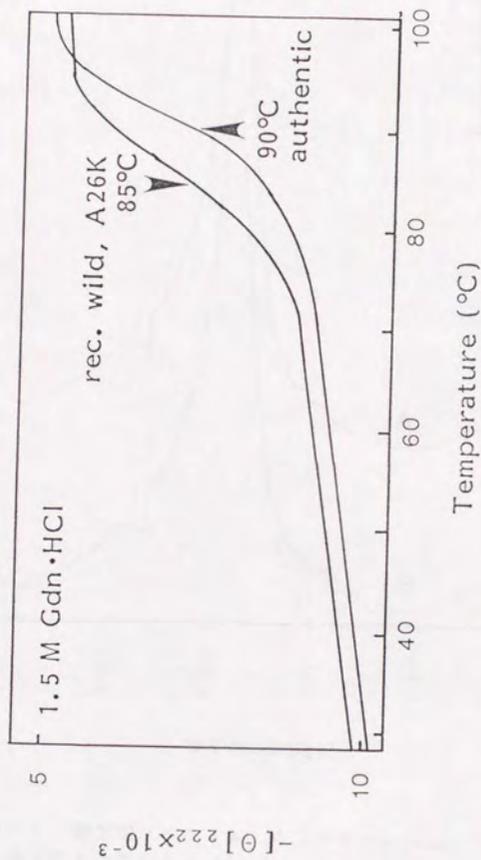


図6-1 1.5M 塩酸グアニジン存在下でのM-チトクローム α -552の融解曲線
 authentic, H. thermophilus由来のチトクローム α -552; rec. wild, M-チトクロ
 ーム α -552; A26Kで代表される変異型A26K, A26K K30A, D37Gの融解曲線はみなrec. wild
 と一致する。

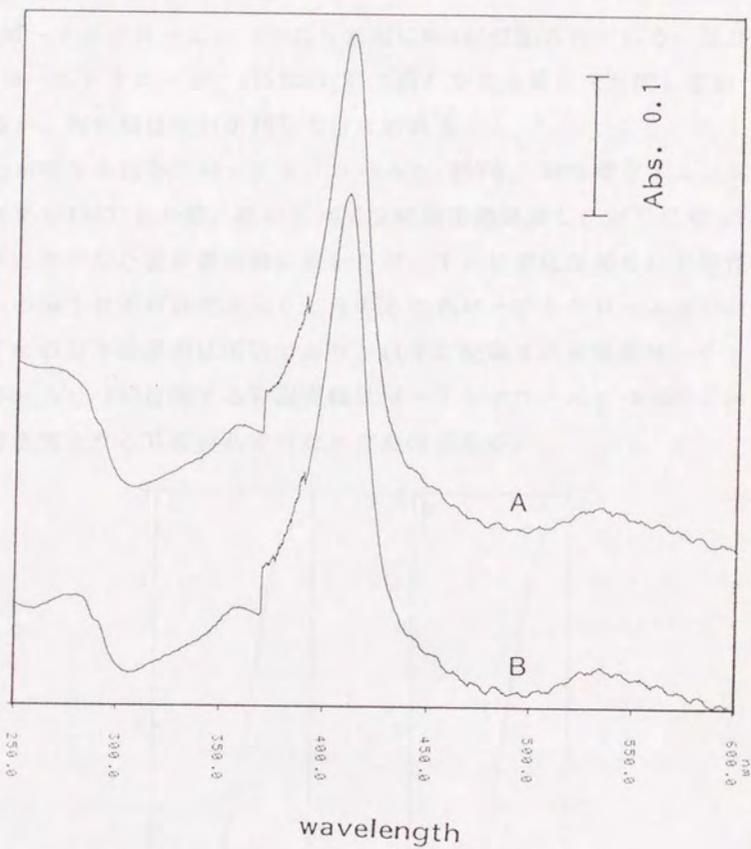


図6-2 酸化型スペクトル。A、チトクローム $c-552$;
 B、M-チトクローム $c-552$

れず(図6-3)、両者の分光光学的な性質は同じであることが示された。両者の違いといえば、

(1) M-チトクローム c-552はN末端にMetが付加されている、及び

(2) M-チトクローム c-552は37°Cで折りたたみ構造を形成しているが、野性型はそれが70°Cで行なわれる

ことが考えられる。M-チトクローム c-552を1.5M塩酸グアニジン存在下で100°C 5分間、続いて70°C 2時間加熱処理し、25°Cにゆっくりと冷やした後昇温実験に供したが、T_mに変化は見られず野性型への再生は不可能であった。今のところM-チトクローム c-552のT_mの低下の原因は不明であり、以下に記載する変異型M-チトクローム c-552に関する昇温実験はM-チトクローム c-552のT_mが野性型より5°C低い系で行なったものである。

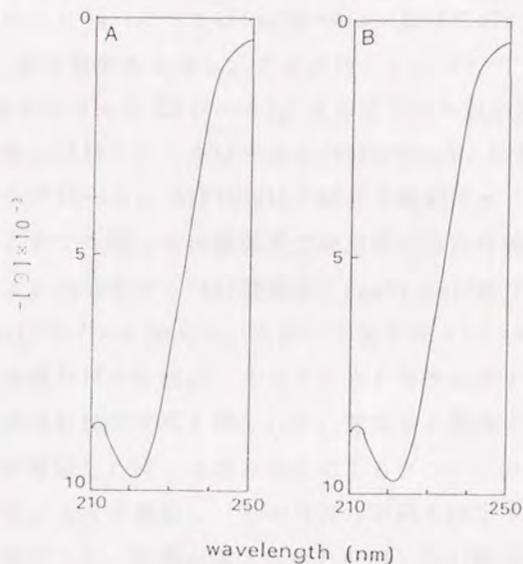


図6-3 CDスペクトル。A、チトクローム c-552；
B、M-チトクローム c-552

第3節 変異型チトクローム c の調製

H. thermophilusチトクローム c-552においてAla26に相当するP. aeruginosaチトクローム c-551のアミノ酸残基はLys28である。Alaの方がLysより α ヘリックス構造を形成しやすいこと、及びチトクローム c-551において2番目の α ヘリックスのN末端付近に位置するLys28は α ヘリックスの双極子相互作用を不安定化していることを考え、チトクローム c-552の耐熱性低下を目的にAla26 \rightarrow Lysの置換を施し、逆にチトクローム c-551については耐熱性上昇を目的にLys28 \rightarrow Alaの置換を施した。また同様の目的でチトクローム c-552で α ヘリックス構造及び双極子相互作用を安定化していると考えられるAsp37から α ヘリックス崩壊性のアミノ酸残基Glyへの置換、チトクローム c-551ではその逆、Gly39 \rightarrow Aspの置換を施した。さらに、チトクローム c-552についてはLys30 \rightarrow Ala、及びAla26 \rightarrow Lys、Lys30 \rightarrow Alaの二重変異型も作成し、チトクローム c-551についてはAla32 \rightarrow Lysの置換も行なった(図6-4)。なお以下得られた変異型タンパク質を、例えばM-チトクローム c-552のAla26 \rightarrow Lysの変異型ならばM-チトクローム c-552(A26K)と略して表記する。

第4、5章で作製した大腸菌及び緑膿菌で発現可能なそれぞれチトクローム c-552及びc-551遺伝子、EcoRI-SalI断片をM13mp18のEcoRI、SalIサイトに挿入し、その一本鎖DNAについて図6-5に示した合成DNAを用い、Zoller及びSmithの方法⁴³⁾によって部位特異的変異を導入した。変異した組換えM13ファージはそれぞれ標識した同じ合成DNAによるブランクハイブリダイゼーション法によって検出し、そのDNA配列を決定することによって変異を確認した。変異が導入されたEcoRI-SalI断片をそれぞれ発現可能なベクターに挿入し、それぞれの宿主を用いてチトクローム

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
<i>H. thermophilus</i>	Ala	Tyr	Ala	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Tyr	Ala	Gly	Arg	Lys	Asp	Ala
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i>	Ala	Tyr	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Lys	Phe	Ala	Gly	Gln	Ala	Gly	Ala
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<i>P. stutzeri</i>	Ala	Phe	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Lys	Tyr	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Ala
<i>P. fluorescens</i>	Ala	Leu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Val	Lys	Asp	Ala
<i>P. mendocina</i>	Ala	Leu	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Val	Lys	Asp	Ala

図6-4 アミノ酸置換及び他のSクラスタC型チトクロームの配列。置換したアミノ酸残基は垂直矢印で示した。

cytochrome *c*-552

CGT	TTC	***	
Ala26	- Lys	3'	GACGAATGTTCCCTACATCG 5'
TTC	CGA	***	
Lys30	- Ala	3'	TACATCGACGATTCATACG 5'
CTA	CCA	*	
Asp37	- Gly	3'	TCTTTCCCACGACAA 5'

cytochrome *c*-551

TTC	CGG	***	
Lys28	- Ala	3'	GCCGGATGCGGCTGCAGCG 5'
CGG	TTC	***	
Ala32	- Lys	3'	TGCAGCGGTTCTTCAAGCG 5'
CCG	CTG	*	
Gly39	- Asp	3'	CGGTCCGGCTGCGGCTTCG 5'

図6-5 変異導入に用いた合成DNA。星印は変異した塩基。

*c*を生産した。変異型M-チトクローム*c*-552については第1章の方法に従って精製した。チトクローム*c*-551についてはその組換え遺伝子が自己クローニングであるため*P. aeruginosa*ゲノムDNA上の野性型チトクローム*c*-551遺伝子の発現産物が混入すると考えられたが、変異型は電荷の変化を伴うアミノ酸置換であるため、両者はFPLCによるMono-Qカラムクロマトグラフィーにより分離することができた。図6-6は*P. aeruginosa*C F EからQ-Sepharoseによってチトクローム*c*-551画分を得、その画分をさらにMono-Qに供したときの溶出パターンであるが、変異型チトクローム*c*-551(K28A)還元型画分には野性型チトクローム*c*-551は混入していないことが示されている。さらに変異型チトクローム*c*-551(k28A)画分には野性

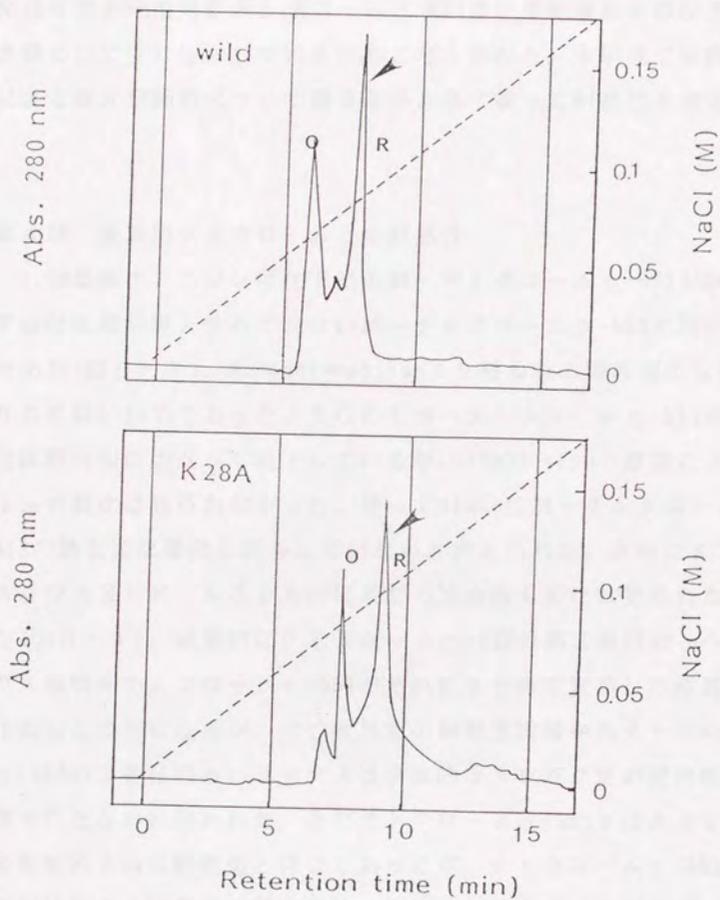


図6-6 Mono-Qによるチトクロームc-551及びその変異型の精製。
 O、酸化型；R、還元型

型チトクローム c-551の酸化型ピークが見られなかった。これは発現ベクターが多コピーであるためゲノムDNAとの平衡関係から発現ベクター由来の遺伝子産物にヘム c の結合が集中し、組換え体は発現ベクター由来のチトクローム c-551遺伝子産物をホロ型タンパク質として主に生産しているためと考えられた。本研究ではMono-Qによる還元型画分について第2章の方法に従って耐熱性を測定した。

第4節 変異型チトクローム c の耐熱性

1.5M塩酸グアニジン存在下でのM-チトクローム c-552 (A26K) の T_m は変異が導入されていないM-チトクローム c-552と同じ T_m であり (図6-1)、*H. thermophilus*より得られる野性型のものより5°C低い85°Cであった。すなわちM-チトクローム c-552の T_m 自体野性型に比べ5°C低下しているが、Ala26→Lysの置換によって T_m の変化は見られなかった。従ってAla26はM-チトクローム c-552の熱安定な構造に関与していないと考えられた。さらにK30A及びA26K、K30Aの変異型の T_m にも変化は見られなかった (図6-1)。結果的にチトクローム c-552の第2番目の α ヘリックス領域をチトクローム c-551のそれにまとめて置換した変異型を作製したことになるが、この変異型の耐熱性実験からチトクローム c-552の2番目の α ヘリックスは全体的なタンパク質の耐熱性に影響を持たないと思われた。またチトクローム c-551ではA32Kの変異型の T_m は野性型と同じであったが、チトクローム c-552との配列比較から耐熱性上昇を目的に作成したK28Aの変異型の T_m は予想に反して13°Cも低下していた (図6-7)。Lys28及びAla32は他の常温性 *Pseudomonas* 由来のチトクローム c-551においても保存

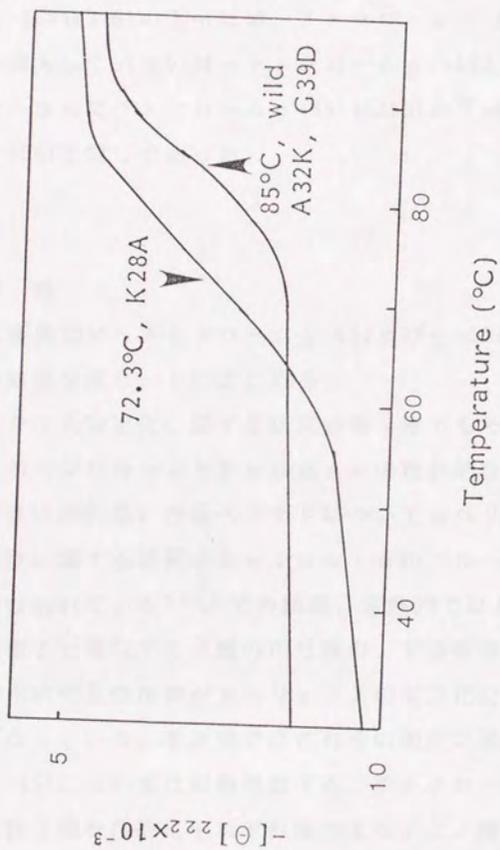


図6-7 チトクローム α -55I 及びその変異型の融解曲線

されており、それがチトクローム c-552ではそれぞれAla及びLysに置換されていること(図6-4)から、それらのアミノ酸残基が両者の耐熱性に影響を持つと予想したが、Lys28はその予想に反してチトクローム c-551の熱安定化のマイナス要因ではなく、プラスの効果を持つと思われた。また1.5M塩酸グアニジン存在下でのM-チトクローム c-552(D37G)のT_mはM-チトクローム c-552(A26K)と同様に置換を導入していないM-チトクローム c-552と同じであった(図6-1)。さらにチトクローム c-551(G39D)のT_mは野性型チトクローム c-551と同じであった。

第5節 考 察

本章では変異型M-チトクローム c-552及び c-551のT_mを測定した。その結果を表6-1にまとめる。

α ヘリックスの安定化に関する研究は第2章でもその知見によって考察したのだがChouとFasmanの統計的な研究²⁴⁾に続き、現在では比較的短い合成ペプチドについて α ヘリックスの形成能及び安定性に関する研究がBaldwinのグループ等によって精力的に行なわれている⁴⁴⁾。その結果、定性的ではあるが α ヘリックスの双極子と電荷アミノ酸の相互作用、芳香族環の影響、水素結合及び疎水の相互作用等が α ヘリックスの安定化に関与することが明らかになっている。本研究ではこれらの知見に基づいて、チトクローム c-552については耐熱性低下を、チトクローム c-551については耐熱性上昇を目的にそれぞれ相当するアミノ酸残基置換を施したが、目的の結果は得られなかった。その理由としては、

(1)これまでの α ヘリックスの安定性に関する知見は短いペプチド

表6-1 各種変異型チトクロームcのT_m

	T _m (°C)	T _m (1.5M Gdn-HCl) (°C)
cytochrome c-552	-	90
M-cytochrome c-552	-	85
A26K	-	85
K30A	-	85
A26K, K30A	-	85
D37G	-	85
cytochrome c-551	85	56
K28A	72	-
A32K	85	-
G39D	85	-

についてのもので、それがタンパク質全体の安定性まで影響を持たないこと、

(2)本研究において着目したアミノ酸残基がチトクロームc-551のLys28を除き全体的なタンパク質の耐熱性に影響を持たないことが考えられる。

本研究のようにアミノ酸残基置換を施した変異型タンパク質を用いてタンパク質の安定性を評価する方法も前述の合成ペプチドに関する研究と並んで有力視されている。例えばMatthewsのグループは変異型T4リゾチームのX線結晶解析によって α ヘリックスの安定性を評価している⁴⁵⁾。またShermanのグループは酵母iso-1-チトクロームcの短い α ヘリックス内のAsn57をIleに1

アミノ酸置換ただけで T_m を 17°C も上昇させるという画期的なデータを発表している⁴⁸⁾。しかし、実際問題として変異型タンパク質による評価では α ヘリックス構造がタンパク質分子内で種々の相互作用、例えば水素結合、ファンデルワールス力及び静電的な作用等を受けるため、 α ヘリックス内の置換アミノ酸とそれらの相互作用の関係を明らかにすることは困難である。Sherman自身「 17°C も T_m を上げたがその理由を評価することは難しい」と私信で述べている。しかし、近年コンピューターグラフィックス(CG)によってアミノ酸残基を置換したタンパク質の部分的な構造変化をタンパク質分子内の種々の相互作用を加味してシュミレーションすることが可能となった。チトクロームc-551の第3及び4番目の α ヘリックス内に位置するそれぞれAla42及びGln72はその立体構造上C α 間の距離は 6.88\AA と近い位置にある。チトクロームc-552ではそれらに相当するアミノ酸はそれぞれAsp及びLysであり、イオン対の形成が示唆された。そこでチトクロームc-551においてAla42 \rightarrow Asp及びGln72 \rightarrow Lysの置換を導入した変異型タンパク質の立体構造をCGでシュミレーションしたところ、側鎖の $-\text{COO}^-$ のO及び $-\text{NH}_3^+$ のN原子間の距離は 2.6\AA と計算され充分イオン対の形成が可能であると思われた(図6-8)。以上の考察から変異型チトクロームc-551(A42D、Q72K)の耐熱性に興味を持たれた。

今後、タンパク質の構造安定化機構に関する研究はアミノ酸残基の側鎖の物理化学的な性質を考慮して構築した α ヘリックスペプチドを評価するアプローチと本研究のように変異型タンパク質の安定性を評価するアプローチとを組合せた形で発展することが望まれる。

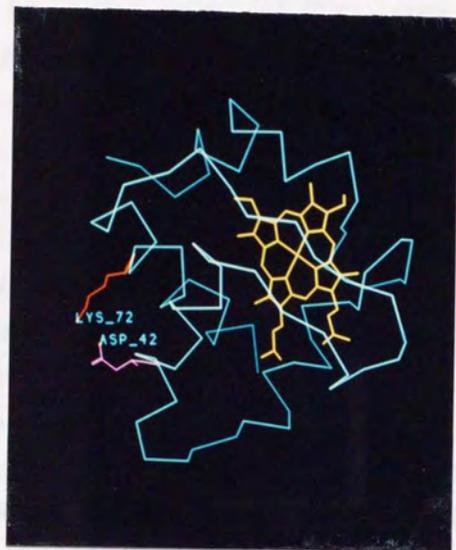


図6-8 コンピューターグラフィックスでシュミレーションした
変異型チトクローム c-551 (A42D、Q72K)

第7章 チトクローム c-552の性質

第1節 序

本章では *H. thermophilus* のチトクローム c-552の等電点及び酸化還元電位を測定した。またチトクローム c-552を将来電子素子等に利用することを考慮してその電気化学的特性として電流-電位曲線を測定した。

第2節 等電点測定

等電点電気泳動によって各チトクローム c の等電点を求めた。ゲルは LKB より市販されている等電点電気泳動用のゲル、Ampholine PAGplate (pH レンジ 3.5-9.5) を用いた。PAGplate (11×12 cm) を多用途電気泳動装置 (ATTO Co.) にのせサンプルをチャージし、陰電極、陽電極にはそれぞれ 1M NaCl、1M H₃PO₄ に浸した電極濾紙を用い、0~2℃で90分間、15Wの定電力で泳動を行った。pIマーカーにはオリエンタル酵母 (K.K) のウマ心筋のチトクローム c をアセチル化したものを用いた。各サンプルのバンドはチトクローム c の赤色を目印に検出した (図7-1)。*P. aeruginosa* のチトクローム c-551は文献通り pI4.7であった⁴⁷⁾。チトクローム c-552についてはそのpIがゲルのpH レンジを越えたため正確な値は得られなかったが、泳動結果を写真で見るとpI10.6のマーカーより上にあるので、そのpIは10.6以上であると思われた。

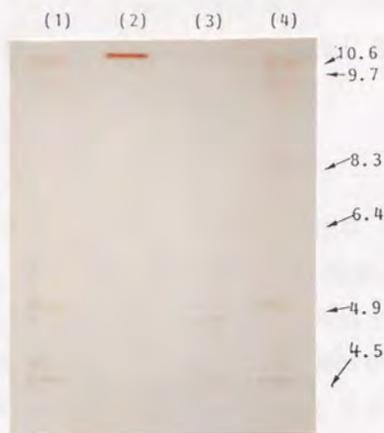


図7-1 チトクローム c の等電点電気泳動。レーン1、4、pIマーカー；
レーン2、チトクローム c-552；レーン3、チトクローム c-551

第3節 酸化還元電位測定

酸化還元電位測定用の白金及び飽和塩化銀の複合電極、PTS-5011 C (東亜電波工業)をpHメーターに接続し、タンパク質濃度約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液に浸すことによって酸化還元電位を測定した。緩衝液には $10\text{mM KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (pH7.0)を用いた。空気の影響を最小限に抑えるために、各試料溶液は実験直前に脱気し、 25°C に温度コントロールされた嫌気グローブボックス内で測定を行った。酸化還元電位測定には pH測定のような標準溶液がないので、酸化還元電位既知のウマチトクローム c ($E_h +251\text{mV}$)を用いて測定系の E_h を $+251\text{mV}$ に補正し、チトクローム c-552の酸化還元電位を測定した。測定溶液を少々動かすだけでもメーターの指針がぶれるため測定には骨を折ったが、補正とチトクローム c-552の酸化還元電位測定を何回か順番に

繰り返し、ウマチトクローム c の酸化還元電位が +251mV を安定して示す状態のとき、チトクローム c -552 の酸化還元電位は +279mV を示していた。

第4節 チトクローム c -552 の電気化学的性質

5 mg/mL のチトクローム c -552 溶液に白金電極を浸し、4,4'-ピピリジンプロモーター (図7-2) に用いて電流-電位曲線 (ボルタモグラム) を測定した。図7-3 は電位を経時的に変化させ、ある一定の電位に達したときに電流が流れることを示している。既に *P. aeruginosa* のチトクローム c -551 のボルタモグラムについては報告があるが⁴⁸⁾、本研究によってチトクローム c -552 も同様に自身の酸化還元に伴う電極との電子の授受が見られた。

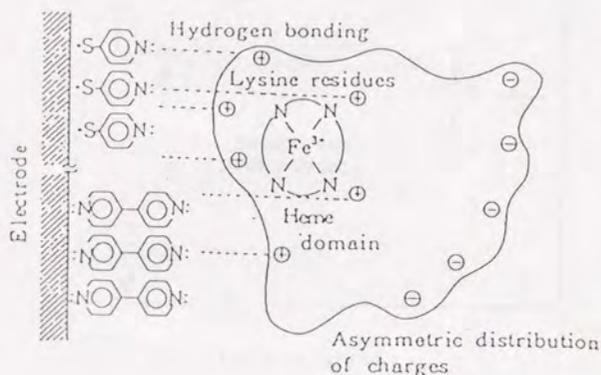


図7-2 チトクローム c と電極上のプロモーターの配置

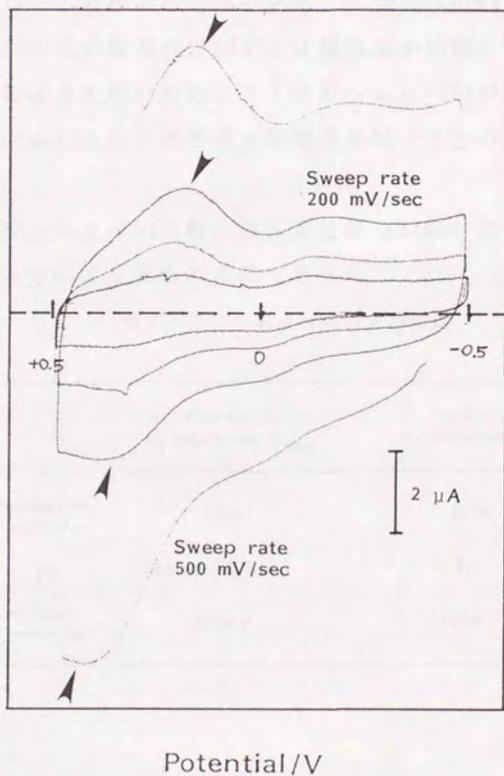


図7-3 チトクロームc-552のサイクリックボルタモグラム。
矢印は電流のピークを示す。

第5節 考察

本章の実験結果を表7-1にまとめる。

*H. thermophilus*のチトクローム c-552のpIは10.6以上で、塩基性のタンパク質であった。細菌由来の塩基性のチトクローム cとしては、他に *Thermus thermophilus* と *Chlorobium thiosulfatophilum* のチトクローム c があるのみである。*H. thermophilus*のチトクローム c-552の高い塩基性は80アミノ酸残基中13個ものLysが見出されることによると思われる。チトクローム c-552が原核生物由来のチトクローム c としては特異な等電点を持つことの生理的意義は不明である。

チトクローム c-552の酸化還元電位は +279mV で、細菌由来のチトクローム c によく見られる値であった。

表7-1 チトクローム c の性質

	<i>H. thermophilus</i> cytochrome <u>c</u> ₅₅₂	<i>P. aeruginosa</i> cytochrome <u>c</u> ₅₅₁
molecular weight	7600	8100
pI	above 10.6	4.7
redox potential	279mV	286mV

チトクローム c は生体内でチトクロームオキシダーゼ、レダクターゼなどの酸化還元酵素と速やかに電子の授受を行なっている。こ

の電子の授受はヘム鉄の酸化還元反応に基づいている。最近、チトクローム c を中心とした金属タンパク質について、こうした電子移動反応を応用的に発展させる研究が始まっている。その将来的な展望は生物の素材、素子を真似た新素材、すなわちバイオチップの開発である。従来の半導体素子では得られなかった、生物学的な新しい機能が期待されているのであるが、当面の研究目標としては、

- 1) 生体内での電子伝達のメカニズムの研究に簡便で迅速な電子化学的方法の利用
- 2) 生体分子間のモデルの提供
- 3) 生体分子機能を有する触媒電極の作成

等がある。現時点では、溶液中でプロモーターを介してチトクローム c と金属電極表面との電子移動を行う研究が行なわれている⁴⁹⁾。プロモーターとは電極に吸着するサイトと溶媒側にのびてチトクローム c との相互作用できるサイトを持つ化合物である。チトクローム c と電極との相互作用のモデルは前述の図7-2のように考えられている。チトクローム c のヘム近傍の正電荷を有するLysと電極上のプロモーターとの静電的な相互作用によってチトクローム c が電極に対して電子移動に適した配向をとり、電極とチトクローム c 間の速い電子移動が可能になるというのである。事実、Lysを一部変更したところ、電極反応が不活性となった報告もある⁵⁰⁾。チトクローム c -552はアミノ酸配列の結果からLysを多く含み、さらに特異的に等電点が高いことから、それらのLysの多くは分子表面に分布していると思われる。本研究の予備的な実験からチトクローム c -552が溶液中で白金電極と電子の授受を行なうことが確認された。今後、チトクローム c -552の高い熱安定性及びLysが多いという特徴を生かした電気化学的特性に関する研究に興味を持たれる。

総括と展望

C型チトクロームは電子伝達系のコンポーネントであり、精製が容易なためタンパク質の構造と機能の関係を調べる格好の研究材料である。現在までに、約150種類ものC型チトクロームのアミノ酸配列が決定されており、そのうち代表的なものについてはX線結晶解析により立体構造も決定されている。またタンパク質工学的手法を用いて一部の生物由来のチトクロームcにアミノ酸置換を施し、得られた変異型チトクロームcについて構造と機能の関係が調べられている。

筆者は主に好熱菌 *H. thermophilus* のチトクローム c-552及び常温菌 *P. aeruginosa* のチトクローム c-551を材料としてタンパク質の耐熱化機構に関する研究を行ない、その成果を一論文としてここにまとめた。その内容を以下章を追って概説し、総括としてしめくくると共に今後の課題及び展望を提言する。

第1章において *H. thermophilus* のチトクローム c-552のアミノ酸配列を報告した。70℃、水素ガス下で培養した *H. thermophilus* TK-6株の菌体よりチトクローム c-552を抽出、精製し、ヘム c を除去した後、CysをS-カルボキシメチル化した。得られた試料をリジルエンドペプチダーゼまたはCNBrで処理することによって断片化し、自動アミノ酸シーケンサーによってチトクローム c-552の全アミノ酸配列を決定した。チトクローム c-552は80アミノ酸残基から成り、立体構造既知の *P. aeruginosa* 由来のチトクローム c-551と全アミノ酸配列中56%の残基が一致し、相同置換を含めた類

似性は70%と高かった。また両者のヒドロバシープロフィールはほぼ一致し、さらに二次構造を推定したところ α ヘリックス構造も同じ領域にあると考えられたことから、両者はアミノ酸配列のみならず立体構造も類似していると思われた。

第2章においては、CDスペクトルによりチトクロームc-552、c-551及びウマチトクロームcの耐熱性を測定し、比較検討した。222 nmのモル楕円係数をパラメータとして各チトクロームc溶液を100°Cまで昇温したところチトクロームc-552の変性は見られなかったが、チトクロームc-551は85°Cで変性した。さらに同様の実験を1.5M塩酸グアニジン存在下で行なったところチトクロームc-551の融解点(T_m)は56°Cであったのに対してチトクロームc-552は90°Cであった。またウマチトクロームcの塩酸グアニジンによる変性過程における融解点は2.5Mであったのに対してチトクロームc-552は4.5Mであり、チトクロームc-552は変性の自由エネルギー変化を増大させることによって常温生物由来のチトクロームcより安定な構造を保持していることが明らかになった。チトクロームc-552とc-551の構造は類似しているにもかかわらず、それらの安定性には大きな差が見られ、これは両者の立体構造上の何らかの違いによるものと思われた。そこでチトクロームc-552及びc-551のアミノ酸配列を比較することによって、チトクロームc-552における構造安定化機構の要因を推定した。ChouとFasmanによって求められた α ヘリックス傾向性指数を両者間で比較したところ、チトクロームc-552はその α ヘリックス領域内ではより安定に α ヘリックス構造を形成していると考えられた。また別の要因としては、チトクロームc-552には α ヘリックスの双極子相互作用を安定化するア

ミノ酸置換が見られることが挙げられた。

第3章においては、高温菌 *P. hydrogenothermophila* 由来のチトクローム c-552の部分アミノ酸配列を決定し、その T_m を測定した。本菌の生育至適温度 (52°C) は *H. thermophilus* 及び *P. aeruginosa* の生育至適温度 (それぞれ70°C 及び37°C) の中間であり、そのチトクローム c-552の T_m も中間的な値であったことから、それぞれの細菌の生育至適温度とそのチトクローム c の耐熱性が相関関係にあると思われた。またN末端から20番目のアミノ酸配列は後二者の両方に類似しており、三者の耐熱性の差がそれらのアミノ酸配列と関連付けられることが示唆された。本チトクローム c-552の全配列が決定されれば、構造は極めて似ているが耐熱性が大きく異なる3種類のチトクローム c のアミノ酸配列を比較することによって耐熱化に関与するアミノ酸残基をよりの確に推定できると思われる。

第4章においては、C型チトクロームのタンパク質工学的研究を目的として *H. thermophilus* のチトクローム c-552遺伝子をクローニングし、該遺伝子を大腸菌においてホロ型タンパク質として発現させることに成功した。まず、チトクローム c-552のアミノ酸配列より推定される塩基配列に基づき合成した2本のオリゴヌクレオチドをプローブに用いてゲノムDNAよりチトクローム c-552遺伝子をクローニングした。DNA塩基配列を決定したところ、チトクローム c-552には18アミノ酸残基から成るシグナル配列が存在することが明らかになった。このシグナル配列を除去したチトクローム c-552遺伝子を大腸菌を宿主に用いて Hc が共有結合したホロ型タンパク質として発現させることに成功した。またその発現産物はサ

イトプラズムに局在していた。大腸菌で合成されたチトクローム c-552 遺伝子産物には N 末端に Met が付加されていたことから本論文では M-チトクローム c-552 と命名した。さらに本章では大腸菌においてはヘム c の生合成またはヘム c のアポ型チトクローム c-552 への共有結合過程が酸素または硝酸によって制御されているという示唆的な結果を得た。またチトクローム c-552 遺伝子を酵母で発現させる試みをしたが、得られた発現産物はヘム c の結合がないアポ型タンパク質であった。原核生物由来の C 型チトクロームはペリプラズムでヘム c が結合し、最終的な折りたたみ構造を形成すると考えられているが、M-チトクローム c-552 は大腸菌サイトプラズムに局在すること、及び酵母においてはアポ型チトクローム c-552 にヘム c が結合せず、酵母のチトクローム c 生合成系には種特異性があるらしいことからチトクローム c の生合成過程に興味を持たれた。

第 5 章においては、第 4 章と同様の目的で *P. aeruginosa* のチトクローム c-551 遺伝子のクローニング及びその発現について報告した。第 4 章の方法と同様に *P. aeruginosa* ゲノム DNA よりチトクローム c-551 遺伝子をクローニングした。シグナル配列存在型のチトクローム c-551 遺伝子を広宿主域発現ベクターに導入し、自己クローニングすることによってチトクローム c-551 遺伝子産物を高発現させることに成功した。また本章では耐熱性チトクローム c の構造のバリエーションに関する知見を得るため、*H. thermophilus* 6 株のうち他の 5 株とは異なる菌学的性質を持つ TK-G 株からチトクローム c 遺伝子のクローニングを試みた。しかし、得られた遺伝子の配列は既にクローニングしたチトクローム c-552 遺伝子と全く同様の配列であった。

第6章においては、チトクローム c-552及び c-551についてそれぞれアミノ酸残基を相補的に置換した変異型タンパク質の耐熱性について報告した。先ず、大腸菌で合成されたM-チトクローム c-552の耐熱性を測定したところ、1.5M塩酸グアニジン存在下でのT_mは *H. thermophilus*由来のチトクローム c-552より5℃低くなっていた。これはM-チトクローム c-552のN末に付加されているMetの影響であるのか、仮にMetが付加されていなくとも両者の折りたたみ構造が異なることによるのか不明である。

第2章でチトクローム c-552において耐熱性に関与するアミノ酸残基を推定した。そのうちAla26及びAsp37に着目し、M-チトクローム c-552の耐熱性低下を目的にこれらの残基をチトクローム c-551においてそれぞれに相当するLys(チトクローム c-551では28番)及びGly(同じく39番)に置換した変異型M-チトクローム c-552を作製した。それらの変異型のT_mは置換を導入していないものと同じであった。逆にチトクローム c-551の耐熱性上昇を目的にLys28→Ala及びGly39→Aspの置換を施したが、後者の変異型のT_mは野生型と同じであり、前者についてはT_mが13℃低下した。以上の結果からAla26及びAsp37はチトクローム c-552の耐熱性に関与していないと思われた。

第7章においては、*H. thermophilus*由来のチトクローム c-552の等電点、酸化還元電位及び電気化学的性質を測定した。酸化還元電位はC型チトクロームとしては普通に見られる値であったが、等電点は極めて塩基性の高い値であった。またサイクリックボルタモグラムの結果から本チトクローム c-552は溶液状態で白金電極と電

子の授受を行なうことが確認された。本章の電気化学特性に関する研究は今後チトクローム c-552の高い熱安定性を生かしたバイオエレクトロニクスの素材として応用的な研究へ発展することが望まれる。

以上概説した通り、本論文では第7章を除いて主に構造は類似しているが耐熱性が大きく異なるチトクローム c-552及び c-551を材料に用いた研究成果を記載した。第2章で2つのチトクローム cのアミノ酸配列を比較することによって耐熱性の差を生み出すアミノ酸置換を推定した。そして第6章でそのアミノ酸残基の一部を置換した変異型タンパク質の耐熱性を測定したところ、置換したアミノ酸残基は全体的な耐熱性に関与していないことが明らかになった。今後の課題としては耐熱性に関与するアミノ酸残基の解明が挙げられる。本研究ではアミノ酸配列という一次元での比較しか行なっていないが、今後三次元での比較が必須であると思われる。チトクローム c-551については既に立体構造が決定されProtein Data Bankにその情報が登録されているので、コンピューターグラフィックス及び分子模型によってその立体構造に関する理解を深める必要がある。一方、チトクローム c-552についてはその立体構造決定が望まれる。既に大阪大学理学部との共同研究でエタノールを沈殿剤として用いた蒸気拡散法によってチトクローム c-552の結晶化に成功している。得られた結晶は斜方(直方)晶系で予備的なX線解析によると空間群 $P2_12_12$ 、 $a=93.4 \text{ \AA}$ 、 $b=32.4 \text{ \AA}$ 、 $c=52.9 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であった。また近年、W u t h r i c hにより2次元NMRを用いたタンパク質の立体構造決定の方法論が確立した感があるが、本チトクローム c-552についてもブルッカー社AM-600を用いて

1次元の $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、2次元NMRによって充分プロトンの化学シフトの帰属が行なえることが確認された。今後、チトクロームc-552のNMRによる立体構造決定に関しては大阪大学蛋白研究所との共同研究で進めて行く予定である。X線解析²³⁾及びNMR⁵¹⁾とも既に発表されているチトクロームc-551についての情報を参考にすればチトクロームc-552についての解析が容易に行なえると思われる。アミノ酸配列の類似性が70%と高い両者の立体構造上のどのような違いによって大きな耐熱性の差が生じるのか興味を持たれる。

C型チトクロームの生体内における役割については第7章の考察で述べた。近年、種々C型チトクローム遺伝子近傍のDNA配列から明らかになったことであるが、チトクロームc遺伝子の近くには生体内で電子の授受を行なう相手方の遺伝子がコードされている場合が多い。*Paracoccus denitrificans*のチトクロームc-550遺伝子の下流にはチトクロームaa₃サブユニット1に相同的な遺伝子がコードされていることが報告されている⁵²⁾。また本研究を遂行するにあたって*P. aeruginosa*のチトクロームc-551遺伝子の上流にはその電子受容体であるnitrite reductaseの遺伝子がコードされていることが明らかになった。さらにnitrite reductaseとチトクロームc-551はオペロンを形成し、その転写は酸素によって制御されていることが当研究室の新井によって明らかにされている。一方、*H. thermophilus*のチトクロームc-552の生理的な役割については、インククトな菌体を70°C、水素ガス下に置くとチトクロームc-552の還元が観察され、続いて酸素ガス下に置くとチトクロームc-552が酸化されるという予備的な実験結果から、チトクロームc-552は水素からのエネルギー代謝系の構成成分であると思われる。

またその遺伝子上流にはコドン利用頻度の偏りがチトクローム c-552と極めて類似しているオープンリーディングフレームが存在し、そのC末端配列はチトクローム P-450の酸化還元酵素と相同的であり、H. thermophilusのチトクローム c-552遺伝子上流にその相手方の遺伝子がコードされている可能性が示唆された。以上のようなエネルギー代謝という生物に必要不可欠な現象におけるC型チトクロームの役割にも興味を持たれ、タンパク質の耐熱化機構を解明する材料としての研究と合わせてこれからの発展に期待する。

Studies on Thermostability of c-Type Cytochromes

Abstract of this thesis

c-type cytochrome is a heme c-containing protein and functions as an essential component of the energy-conserving electron transfer system. It is a small protein, and can be easily isolated. Amino acid sequences of c-type cytochromes are known for scores of species, and the tertiary structures of some of them have been determined by X-ray crystallography. c-type cytochrome is one of the best known proteins with regard to structure-function and evolutionary relationships.

In this thesis, the complete amino acid sequence of cytochrome c-552 from an extremely thermophilic hydrogen bacterium, Hydrogenobacter thermophilus, was determined. It is a single polypeptide chain of 80 residues, and its molecular weight, including heme, was calculated to be 7,599. The sequence closely resembles that of cytochrome c-551 from Pseudomonas aeruginosa. Moreover, the tertiary structure of these cytochromes are suggested to be similar to with each other.

The denaturation of the cytochromes c-552 and c-551 by heat and guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) was studied by measuring the changes in circular dichroic spectra. The melting temperature (T_m) of cytochrome c-552 in the presence of 1.5 M Gdn-HCl was 34 °C higher than that of the cytochrome c-551. Hydrogenobacter cytochrome c-552 is a much more stable protein than cytochrome c-551 of the mesophilic P. aeruginosa, even though their amino acid sequences are 56% identical and they have numerous other

similarities. However, notwithstanding these similarities between the sequences of the cytochromes c-552 and c-551 that were compared, it is very likely that these differences in stability could be due to some so far undefined differences in their tertiary structures. It has been suggested that α -helix structure and electrostatic interaction could be the source of the stable tertiary structure of cytochrome c-552.

A moderately thermophile, Pseudomonas hydrogenothermophila cytochrome c-552 was also partially sequenced and its T_m value was measured. The amino acid sequence up to 20th residue were similar to those of Hydrogenobacter and P. aeruginosa, and the T_m was between them. Three cytochromes c from H. thermophilus, P. hydrogenothermophila, and P. aeruginosa are thought to be most appropriate materials for examining the structure-thermostability relationship of proteins because they have a high degree of similarity in sequences but differ in thermostability, and the tertiary structure of cytochrome c-551 from P. aeruginosa has been already determined by X-ray analysis.

For protein engineering studies to investigate protein thermostability, the cytochrome c genes from H. thermophilus and P. aeruginosa were cloned by using oligonucleotide probes, which had been synthesized based on the known amino acid sequences. The cytochrome c genes from H. thermophilus and P. aeruginosa could be functionally expressed in Escherichia coli and P. aeruginosa, respectively. Mutant proteins of both cytochromes c were constructed by site directed mutagenesis and produced by each expression system. The thermostability of the resulting mutant proteins were measured as previously. Ala26 and Asp37 in

cytochrome c-552, which correspond to Lys28 and Gly39 respectively in cytochrome c-551, are better α -helix formers than corresponding residues and thought to stabilize electrostatic interactions between charged side chains and α -helix dipole moments. However, T_m value of the mutant cytochromes c-552 (A26K) and (D37G) were not changed comparing with the wild type protein. In contrast, T_m of cytochrome c-551 (G39D) was same as the wild type and that of K28A was decreased as much as 13°C comparing with the wild type. Thus, Ala26 and Asp37 were concluded not to be important residues with regard to the thermostability of cytochrome c-552.

謝 辞

本論文を終えるにあたり
終始御指導と御討論を賜わりました
東京大学教授 恩玉 徹博士
有益な御助言、御助力を頂きました
東京大学助教授 大森俊雄博士に
深く感謝の意を表します。

また、終始適切かつ丁寧な
御指導、御助力を頂いた
当研究室助手 五十嵐泰夫博士
常に有益な御助言、御助力を頂いた
当研究室助手 山川 隆博士
タンパク質の精製方法を教えて頂いた
当研究室助手 石井正治博士に
厚く感謝いたします。

さらに、タンパク質のアミノ酸配列決定に
有益な御助言を賜わりました

本学科生物有機化学研究室助手
長沢寛道博士
片岡宏誌博士に
深く感謝の意を表します。

ＣＤスペクトルの測定及びコンピューター
グラフィックスに関し
有益な御指導、御討論を賜りました
本学科酵素学研究室教授
太田隆久博士
同研究室助手
酒井 坦博士に
深く感謝の意を表します。

サイクリックボルタモグラムの測定に関し
有益な御指導を賜りました
本学科食品工学研究室助教授
宮脇長人博士に
深く感謝の意を表します。

遺伝子操作技術に関して
有益な御指導を賜わり
貴重な酵母 CYCI 欠損株及び発現ベクターを
提供していただき、そして
Fred Sherman 教授と討論する機会を
与えて下さった
サントリー基礎研究所
天知輝夫博士
芦刈俊彦博士
田中良和博士に
深く感謝の意を表します。

共同研究者として日々研究に励み
データの一部を借らせていただいた
当研究室の
新井博之氏
楊 俊豪氏
横山敬一氏に
深く感謝の意を表します。

本研究に御助言、御討論を頂いた
当研究室の諸先輩、同僚及び後輩の方々に
深く感謝いたします。

最後に博士課程進学のお機会を私に与えて
下さった両親、弟、妹に深く感謝いたしま
す。

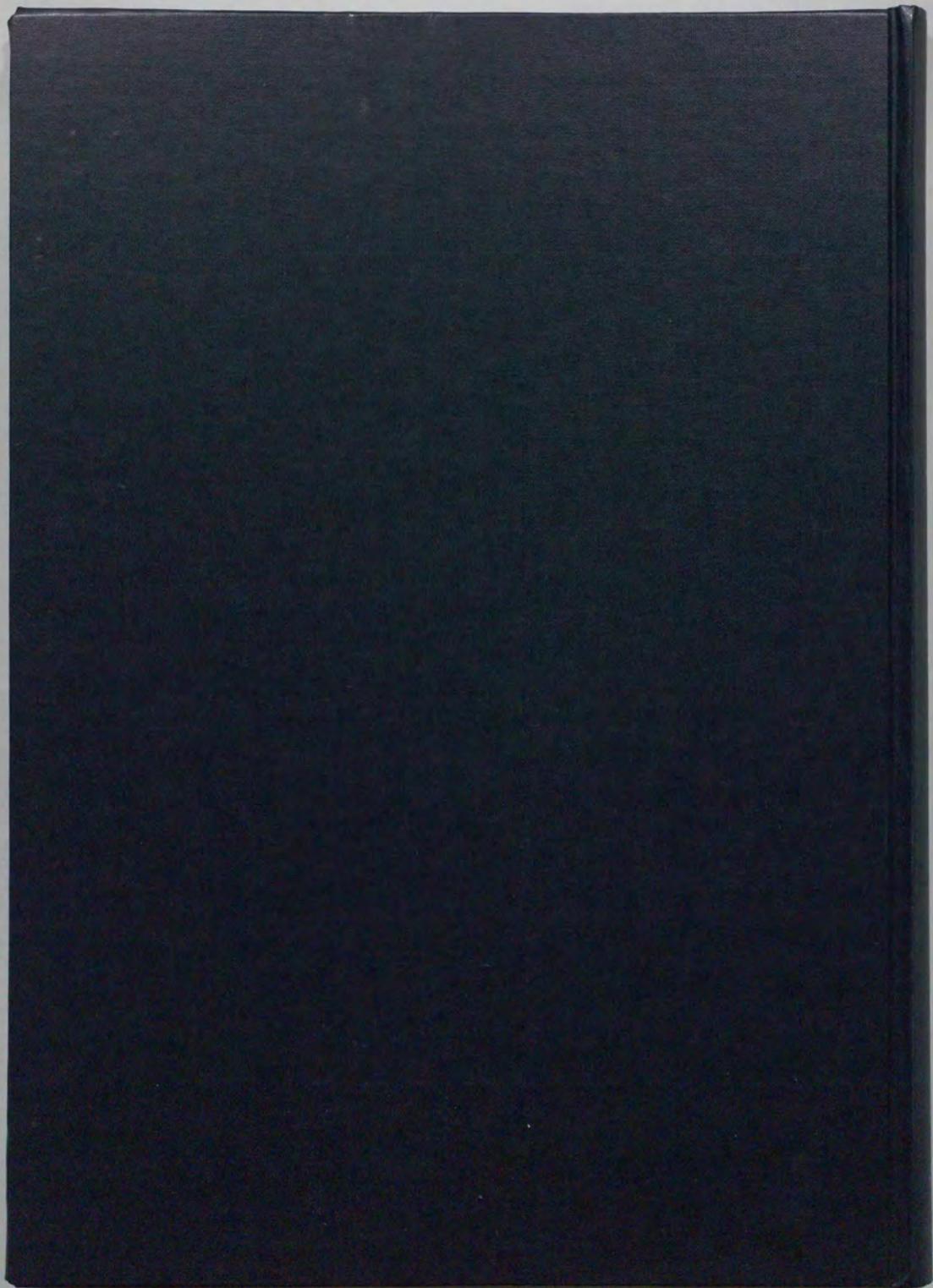
参考文献

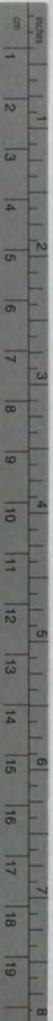
1. Tanaka, Y., Ashikari, T., Shibano, Y., Amachi, T., Yoshizumi, H., and Matsubara, H. (1988) *J. Biochem.* 103, 954-961.
2. Scarpulla, R. C., and Nye, S. H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6352-6356.
3. McEwan, A. G., Kaplan, S., and Donohue, T. J. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 59, 243-248.
4. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1990) *FEBS Lett.* 270, 147-151.
5. Takagi, H., Takahashi, T., Momose, H., Inouye, M., Maeda, Y., Matsuzawa, H., and Ohta, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 6874-6878.
6. Imanaka, T., Shibasaki, M., and Takagi, M. (1986) *Nature* 324, 695-697.
7. Titani, K., Ericsson, L. H., Hon-nami, K., and Miyazawa, T. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1023-1029.
8. Nojima, H., Hon-nami, K., Ohshima, T., and Noda, H. (1978) *J. Mol. Biol.* 122, 33-42.
9. Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodoma, T., and Minoda, Y. (1984) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 5-10.
10. Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51, 1695-1696.
11. Ambler, R. P., Wynn, M. (1973) *Biochem. J.* 131, 485-498.

12. Crestfield, A. M., Moore, S., and Stein, W. H. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 622-627.
13. Igarashi, Y., Sanbongi, Y., Ishii, M., and Kodama, T.
(1988) FEMS Microbiol. Lett. 49, 179-182.
14. Dickerson, R. E. (1980) Sci. Am. 242, 137-153.
15. Bowien, B., and Schlegel, H. G. (1981) Ann. Rev.
Microbiol. 35, 405-452.
16. Van Beeumen, J., Ambler, R. P., Meyer, T. E., Kamen, M.
D., Olson, J. M., and Shaw, E. K. (1976) Biochem. J. 159,
757-774.
17. Ambler, R. P., Meyer, T. E., Trudinger, P. A., and Kamen,
T. E. (1985) Biochem. J. 227, 1009-1013.
18. Miller, D. T., and Nicholas, J. D. (1986) Biochem. Int.
12, 167-172.
19. Tanaka, Y., Fukumori, Y., and Yamanaka, T. (1982)
Biochem. Biophys. Acta. 707, 14-20.
20. 蛋白質工学入門、崎山文夫 編、秀潤社 (1987)
21. Knapp, J. A., and Pace, C. N. (1974) Biochemistry 13,
1289-1294.
22. Matthews, B. W. (1987) Biochemistry 26, 6885-6888.
23. Matsuura, Y., Takano, T., and Dickerson, R. E. (1982)
J. Mol. Biol. 156, 389-409.
24. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) Ann. Rev. Biochem.
47, 251-276.
25. Hol, W. G. J., Van Duijnen, P. T., and Berendes, H. J.
C. (1978) Nature 273, 443-446.

26. Goto, E., Kodama, T., and Minoda, Y. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41, 685-690.
27. Perutz, M. F., and Raidt, H. (1975) *Nature*, 255, 256-259.
28. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
29. Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 367-382.
30. Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S. Y., Myambo, K., Boosman, A., and Chang, S. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 751-757.
31. Nicholson, D. W., Kohler, H., and Neupert, W. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 147-157.
32. Teale, F. W. J. (1959) *Biochem. Biophys. Acta.* 35, 543.
33. Thomas, P. E., Ryan, D., and Ledwin, W. (1976) *Anal. Biochem.* 75, 168-176.
34. Fujita, T., and Sato, R. (1966) *J. Biochem.* 60, 691-700.
35. Tai, S., and Kaplan, S. (1985) *J. Bacteriol.* 164, 181-186.
36. Kitto, G. B. (1969) *Methods Enzymol.* 13, 106-116.
37. Sargent, M. G. (1968) *J. Bacteriol.* 95, 1493-1494.
38. Dumont, M. E., Ernst, J. R., Hampsey, D. M., and Sherman, F. (1987) *EMBO J.* 6, 235-241.
39. Fukuda, M., and Yano, K. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 2719-2724.
40. Franklin, F. C. H. (1985) *DNA Cloning*, vol. I, p.165 IRL Press.

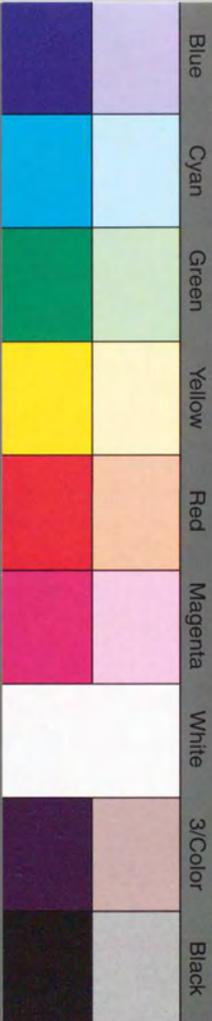
41. Kryukov, V. R., Savel'eva, N. D., and Pusheva, M. A. (1983) *Mikrobiologiya*, 52, 781-783.
42. Nishihara, H., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1990) *Arch. Microbiol.* 153, 294-298.
43. Zoller, M. J., and Smith, M. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 6487-6500.
44. Shoemaker, K. R., Kim, P. S., York, E. J., Stewart, J. M., and Baldwin, R. L. (1987) *Nature* 326, 563-657.
45. Nicholson, H., Bechtel, W. J., and Matthews, B. W. (1988) *Nature* 336, 651-656.
46. Das, G., Hickey, D. R., Mclendon, D., Mclendon, G., and Sherman, F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 496-499.
47. Horio, T., Higashi, T., Sasagawa, M., Kusai, K., Nakai, K., and Okunuki, K. *Biochem. J.* (1960) 77, 194-201.
48. Hill, H. A. O., Page, D. J., and Walton, N. J. (1987) *J. Electroanal. Chem.* 217, 129-140.
49. 谷口功、安河内一夫：表面、23、597 (1985)
50. Eddowes, M. J., Hill, H. A. O., and Vosaki, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101, 7113-7120.
51. Chau, M. H., Cai, M. L., and Timkovich, R. (1990) *Biochemistry* 29, 5076-5087.
52. Van Spanning, R. j. m., Wansell, C., Harms, N., Oltmann, L. F., and Stouthamer, A. H. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 986-996.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

