

解 説

熱安定性が異なるシトクロム *c* の構造と折り畳み

三本木 至宏, 山中 優, 長谷川 淳, 内山 進

(受取日: 2009 年 9 月 30 日, 受理日: 2009 年 11 月 2 日)

Structure and Folding of Cytochromes *c* with Different Thermal Stability

Yoshihiro Sambongi, Masaru Yamanaka, Jun Hasegawa, and Susumu Uchiyama

(Received Sep.30, 2009; Accepted Nov. 2, 2009)

Cytochrome *c* is found in a variety of bacterial species, from mesophiles to hyperthermophiles. Cytochrome *c* functions in respiratory electron transport chain, and is one of the best-characterized ones not only in terms of molecular biology such as biogenesis and evolution, but also in biophysical terms such as protein structure, stability, and folding. Four homologous cytochromes *c*, mesophilic *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*551 (PA *c*551), moderately thermophilic *Hydrogenophilus thermoluteolus* cytochrome *c*552 (PH *c*552), thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*552 (HT *c*552), and hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* cytochrome *c*555 (AA *c*555) have been subjected to mutagenesis and structural analyses and provided substantial clues to the mechanism underlying protein stability at the amino-acid level. HT *c*552 is stabilized through five specific amino acid residues compared with PH *c*552 and PA *c*551. AA *c*555 is further stabilized by an additional helix structure compared with the other three proteins. As to folding, the apo AA *c*555 polypeptide can intrinsically form a holo-like structure without heme binding, this being the first case for a cytochrome *c* polypeptide. Molecular mechanisms underlying protein stability and folding in these bacterial homologous cytochromes *c* with different thermal stability are understood.

Keywords: Cytochrome *c*; Protein folding; Stability

1. はじめに

細菌は原始的な生物であり, 生命誕生以来, 地球環境の変化に適応してきた。現存する細菌の中にも, 通常の生物が生存できないような過酷な環境に生息するものがある。温度や圧力といった物理条件の過酷さのみならず, 高いイオン強度や中性pHから大きく外れた酸性やアルカリ性の環境などの厳しい化学条件にも適応した細菌が存在する。

このように細菌の適応範囲は広くバラエティに富むが, 細菌を含めた生物には共通点がある。生息する環境がどの

ようなものであれ, 現在知られているすべての生物はアデノシン5'三リン酸(ATP)を生産する, という共通点である。そして, ATPを生産するために必要な電子伝達系の蛋白質も生物種間で類似している。

筆者らは, 電子伝達系の蛋白質, シトクロム*c*を対象に, その安定性, 構造, および折り畳みに関する研究を行っている。研究のスタイルとしては, 「現象からの科学」を踏襲している。具体的には, 生育温度が大きく異なる細菌のシトクロム*c*の性質を推量し, それを実験で確かめる。このようなアプローチで研究を行い, 個々のシトクロム*c*の性

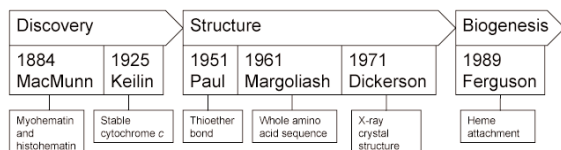


Fig.1 Research history of cytochrome *c*. Three stages (Discovery, Structure, and Biogenesis) are shown with the year, scientist, and important accomplishment.

質を比較することで、蛋白質の普遍的な性質を理解できると考えている。

本稿では、シトクロム*c*について、その研究史を述べた後、筆者らの研究を中心に、シトクロム*c*を対象とした蛋白質の安定化と折り畳みの機構について論じる。

2. シトクロム *c* 研究の歴史

Fig.1 にシトクロム*c* 研究の歴史をまとめた。

2.1 シトクロム *c* の発見

現在、ヘムを含む蛋白質性の細胞色素は、シトクロムと総称されている。その存在を最初に指摘したのがイギリスの医者、C. A. MacMunn で、1884 年に関連する研究成果を学会発表している。¹⁾ MacMunn は、自らが発見した細胞色素をミオヘマチンあるいはヒストヘマチンと名付けた。彼は、これらの色素は動物のみに存在して、血液色素であるヘモグロビンに変換されるものであると述べているが、後に間違っていることが分かった。

1925 年、D. Keilin は、MacMunn が発見した細胞色素を正しく特徴付け、シトクロムと命名した。Keilin はシトクロムが、(1) 動物だけでなくヘモグロビンを持たない微生物や植物にも存在すること、(2) 細胞内で可逆的に酸化還元されること、(3) ヘムを持つ 3 種類の蛋白質から構成されていること、を明らかにした。¹⁾ Keilin が報告した 3 種類のシトクロムは、それぞれ *a* タイプ、*b* タイプ、*c* タイプと命名され、そのうち *c* タイプが本稿で取り上げるシトクロム*c* である。

Keilin はさらに、細菌を含む様々な生物由来のシトクロムの研究を積み重ね、*a* タイプや *b* タイプのシトクロムとは異なり、シトクロム*c* は水溶性であることを見出している。また、パン酵母由来のシトクロム*c* については、蛋白質を精製して、その分子量や等電点を測定するなど、分子そのものの特徴を明らかにしている。¹⁾

2.2 シトクロム *c* の構造

Keilin によって明らかにされたシトクロム*c* に関する知見は、1950 年代以降、他の研究者に受け継がれ、その構造に関する研究が盛んになった。まず、K. G. Paul によりヘムとシトクロム*c* のポリペプチド鎖は、チオエーテル結合

していることが明らかにされ、¹⁾ これがその後シトクロム*c* を定義する際の特徴となった。ちなみに、*a* タイプや *b* タイプのシトクロムにはこのような共有結合はないため、蛋白質が変性するとヘムは遊離する。

シトクロム*c* についてさらに研究が進み、ヘムとチオエーテル結合する部分のアミノ酸配列が多くの生物種由来のもので解明され、共通して Cys-Xaa-Xaa-Cys-His (Xaa は任意のアミノ酸残基) の配列を持つことが明らかにされた。¹⁾ この配列中の 2 つの Cys 残基にヘムがチオエーテル結合する。そして、1961 年には、E. Margoliash によってウマ心筋由来のシトクロム*c* の全アミノ酸配列 (104 残基) が決定され、²⁾ その 10 年後の 1971 年には、R. E. Dickerson によって同じくウマのシトクロム*c* の X 線結晶構造が発表された。³⁾ いずれも、シトクロム*c* としては最初の成果である。

ウマのシトクロム*c* の立体構造解析から、蛋白質分子当たり一つ存在するヘムは分子の内部にあり、ヘム鉄には His と Met が配位することが明らかになった (**Fig.2**)。さらに、疎水性のアミノ酸側鎖がヘムを取り囲むように分子の内側に埋もれていることも分かった。ウマのシトクロム*c* と相同なシトクロム*c* は、他の動物や植物、さらに Keilin が扱っていたパン酵母や細菌に至るまで広い生物種に存在している。現時点までに 160 種以上もの相同シトクロム*c* の立体構造がデータベースに登録されていて、それらの立体構造の特徴も共通している。シトクロム*c* は、生物進化の過程でよく保存されている。その配列の違いによって、生物の進化系統関係を考察できるようになり、分子進化研究の先駆けとなった。⁴⁾

2.3 シトクロム *c* の生合成と現在までの展開

様々な生物種由来のシトクロム*c* の構造に関する知見が蓄積する一方、1980 年代にはシトクロム*c* の細胞内での生合成過程についての知見が得られるようになった。ヘムと蛋白質間でチオエーテル結合が形成される仕組みに研究の焦点が当てられ、それに関わる細胞因子が同定されるようになった。⁵⁾ 本稿の第一著者は、シトクロム*c* 生合成研究の先駆者であるイギリスの S. J. Ferguson の元に留学し、細菌がシトクロム*c* を生合成するためには、Dsb (Disulfide bond formation) と呼ばれるジスルフィド酸化還元酵素が必須であることを実証している。⁶⁾

以上述べたように、Keilin によるシトクロム*c* の再発見に続いて、構造が明らかにされ、1980 年代以降は生合成の問題へと研究が進展した。シトクロム*c* は蛋白質科学の研究分野においてもっともポピュラーなものの一つになり、最近ではその折り畳み運動を一分子観察できるようになっている。⁷⁾ シトクロム*c* を用いた研究が進展した理由は、安定で精製が容易で、可視光を吸収する特徴的なヘムが存在するからである。

すでに述べたように、シトクロム *c* の定義は、ヘムと蛋白質がチオエーテル結合していることである。この定義でシトクロム *c* とされる蛋白質には、先行して研究が進んでいるウマのシトクロム *c* と相同でないものがある。例えば、蛋白質分子あたりヘムを複数個もつものやヘム鉄への配位様式が異なるものである。R. P. Ambler は、こういった多様なシトクロム *c* をクラス分けして、ウマのシトクロム *c* と相同なもの、すなわちヘムを一つ持ち、ヘム鉄に His と Met が配位しているものを「クラス I シトクロム *c*」と名付けている。⁸⁾

筆者らは1990年代から、幅広い温度環境に生息する細菌由来のクラス I シトクロム *c* (以下、断りが無い限りシトクロム *c* と表記する) を材料に、蛋白質の安定性や折り畳みの問題に取り組んできた。

3. 生育温度が異なる細菌由来のシトクロム *c*

筆者らは現在、生育温度が異なる4種類の細菌由来の相同なシトクロム *c* を研究対象としている。生育最適温度の範囲は、*Pseudomonas aeruginosa* の37℃から *Aquifex aeolicus* の85℃までである (Table 1)。それぞれ細菌の学名のイニシャルと還元型シトクロム *c* に特徴的な550 nm 付近のα吸収帯にちなんで対象としているシトクロム *c* を

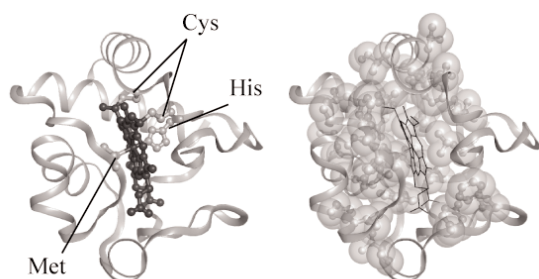


Fig.2 Three dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. (Left) Backbone and heme structure with relevant amino acid residues. (Right) Sphere models of hydrophobic amino acid residues.

略記している。アミノ酸残基数はいずれも80前後で、最低でも35%のアミノ酸は一致している (Fig.3)。

筆者らは、これらのシトクロム *c* 遺伝子をすべてクローン化し、大腸菌を宿主に用いて発現させる実験系を確立している。⁹⁾ 蛋白質のみならず遺伝子も扱えるので、系統的な変異導入実験が可能である。

4. PA *c*551, PH *c*552, および HT *c*552 の構造と安定性

4.1 3種の安定性比較

Table 1 に挙げた細菌のうち、常温菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 中程度好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus*, および好熱菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の最適生育温度は、それぞれ37, 52, および72℃である。*P. aeruginosa* 由来の PA *c*551, *H. thermoluteolus* 由来の PH *c*552, そして *H. thermophilus* 由来の HT *c*552 は、どの組合せで比較してもアミノ酸配列が50% 前後一致する。さらに、3種のシトクロム *c* の主鎖構造のRMSD (Root Mean Square Deviation, 構造間の平均二乗距離の平方根) は、1 Å程度であり立体構造も類似している (Fig.4)。

これら3種のシトクロム *c* の構造は類似しているにもかかわらず、由来する細菌の最適生育温度の違いから推測されるように、これらの安定性は大きく異なる。熱や化学変性剤に対する安定性を測定すると、HT *c*552 の安定性もとても高く、続いて PH *c*552, PA *c*551 の順番に低下する。¹⁰⁾ なお筆者らは、安定性測定の際に実験条件を可能な限り揃えるようにしているので、異なるシトクロム *c* 間の厳密な安定性比較が可能である。

4.2 PA *c*551 と HT *c*552 への変異導入

HT *c*552 と PA *c*551 の立体構造を比較することによって、HT *c*552 の安定化に寄与する可能性が高いアミノ酸として5残基 (Ala7, Met13, Tyr34, Tyr43, およびIle78。以下アミノ酸番号は、PA *c*551 のものに統一した) を推定した。^{11,12)} PA *c*551 でこれらに対応するアミノ酸はそれぞれPhe7, Val13, Phe34, Glu43, およびVal78である。変

Table 1 Bacteria used for our research.

Bacteria	Optimal growth temperature (°C), classes for growth temperature	Cytochrome <i>c</i> abbreviation	Amino acid residues
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37, mesophile	PA <i>c</i> 551	82
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> (formally <i>Pseudomonas hydrogenothermophila</i>)	52, moderate thermophile	PH <i>c</i> 552	79
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	72, thermophile	HT <i>c</i> 552	80
<i>Aquifex aeolicus</i>	85, hyperthermophile	AA <i>c</i> 555	87

```

PAc551  ED10EVLFK10KGC20ACHAID20K30VGPAYKDVA30K40AG40AEAE
PHc552  --IE10LAK10KGCMACHAID20K30VGPSYKDVAKKYTE30AD--V40PK
HTc552  --IE10LAK10QKGC20MACH20DLK20K30VGPAY30DVAKKYAGRID40AV40Y
AAc555  ADGKAIF10QKGC20GSCH20QANVD20VGPS30K40AA40Q40YAGKED40QLIKF

PAc551  LA50RIK50GS60GVWGPIMP60PPNA----VSD70EAQ70LA80WVLS80K
PHc552  LVEK40KKGG50GVWGPVMP50PPHPQ----VAL60ADIEKIVRW70VLTK80
HTc552  LA40KIKKGG50GVWG60VPMP60QN----V70DAAK70LA80WILS80K
AAc555  LKGEAPAIVDP50AKER60I60M60PQL70TM70LKGL70SDAE80K80LA80WILS80K

```

Fig.3 Amino acid sequence comparison of four cytochromes *c* used for our research. The sequences are aligned so as to the heme binding Cys, His, and Met residues are matched. Identical residues in at least two sequences are black. Residue numbers are on the each sequence and the five amino acid residues responsible for the high stability in HT c552 are marked with asterisks. Amino acids are represented by the single letter notation (for example, C, H, and M stand for Cys, His, and Met, respectively).

異導入によってPA c551の5残基のアミノ酸をすべてHT c552型に置換すると、化学変性剤グアニジン塩酸に対する安定性は、HT c552とほぼ同程度になった。¹³⁾ 反対に、HT c552の5残基のアミノ酸をすべてPA c551型に置換するとPA c551とほぼ同程度の安定性を示した。¹⁴⁾ これらの結果から、この5残基のアミノ酸がHT c552の高い安定性に必須であると結論した。

さらに筆者らは、示差走査熱量計 (DSC) を用いてHT c552とPA c551の熱力学量を求め、興味深い結果を得ている。HT c552は熱変性に伴う比熱変化 (ΔC_p) がPA c551と比べると小さく、そのため変性に伴うギブス自由エネルギー変化 (ΔG) の温度依存性が小さくなっていた。一方、安定化に寄与するHT c552型の5残基をPA c551に導入したPA c551の5残基置換体の ΔC_p は、HT c552と比べて大きくなっていた。そのため、野生体のHT c552の方が広い温度範囲において安定性が高いという特徴を持つことが分かった。¹⁵⁾ この結果は、自然進化による蛋白質安定化と蛋白質工学による安定化には違いがあることが熱測定により示された例である。

4.3 PH c552 から得られた知見

HT c552とPA c551から得たアミノ酸レベルでの蛋白質安定化機構に関する結論は、PH c552を加えることで説得力が増した。PH c552においてHT c552の高い安定性に寄与する5残基に対応するアミノ酸は、Ala7, Met13, Tyr34, Lys43, およびVal78である。PH c552をHT c552

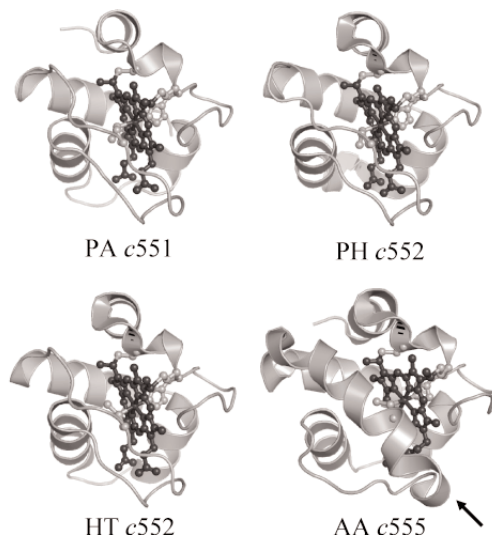


Fig.4 Structure comparison of four cytochromes *c* used for our research. Extra helix in AA c555 is indicated by the arrow.

やPA c551と比較すると、7番、13番、および34番はHT c552と同じアミノ酸であり、43番はPH c552独自のアミノ酸、そして78番はPA c551と同じアミノ酸である (Fig.3)。つまり、Lys43を除く4残基に注目すると、PH c552はHT c552型とPA c551型の折衷型となっている。それが理由で、PH c552の安定性はHT c552とPA c551の間になったと予測できる。

実際に、PH c552についても変異導入実験を実施した。その結果、HT c552型のアミノ酸をPA c551型に置換すると安定性が低下し、PA c551型をHT c552型に置換すると安定性が向上することを確認できた。¹⁶⁾ 予測通りの結果であった。

5. 熱安定性実験を可能にした新しい手法

5.1 従来の手法

蛋白質の熱安定性の評価には古くから分光法が利用されてきた。特に、円偏光二色性 (CD) や蛍光スペクトルを測定すると、蛋白質溶液の加熱に伴う構造変化を敏感に捉えることができるので、蛋白質の熱安定性評価において頻繁に用いられてきた。

ただし、これらの測定法では通常、水の沸点を超える温度での測定が不可能である。一般に、シトクロム *c* は熱に対して高い安定性を持っており、実際にHT c552やPH c552などは100℃でも変性しない。そこで熱変性を観測するために、常温では変性しないが変性温度が100℃以下になるくらいの濃度の変性剤を蛋白質溶液に添加して熱変性

実験を行う方法が利用されてきた。しかしこの方法では、変性剤存在下での熱安定性を観測するため、熱に対する蛋白質の安定性を純粋に評価できないことが問題である。

さらに、各温度で変性剤の濃度依存性を測定し、変性剤濃度ゼロの外挿値から熱変性温度を推定する方法も考案されている。変性温度が100℃を超える蛋白質の熱安定性評価によく適用されているが、変性剤濃度ゼロに外挿するため、誤差が大きくなる可能性を認識しておかなければならない。

5.2 開発した新しい手法とその利点

そこで筆者らは、CD専用の耐圧性のセルホルダーを独自に開発し、蛋白質溶液に10気圧程度の圧力をかけ水の沸点を180℃に上げることにより、100℃を超えても熱変性を追跡できるようにした。このようにして、変性剤非存在下でHT c552のpH 7.0における変性温度を約110℃と見積もることができた。¹⁷⁾ なお、この方法で蛋白質溶液にかかる圧力(10気圧程度)は、蛋白質の安定性に影響を及ぼさない程度である。

ところで、シトクロム *c* は酸化型と還元型の状態があり、還元型の方が安定であることが知られている。耐圧セルホルダーを用いてHT c552の還元型でのCD測定を行ったところ、pH 7.0での変性温度は、前述の酸化型の変性温度(110℃)よりも20℃高い約130℃であった。¹⁷⁾

なお、市販のDSCでは測定温度の上限が130℃付近であるため、これほど高い変性温度を持つ蛋白質の安定性評価は困難である。またDSCの場合、測定溶液の濃度が高いために、熱変性後の蛋白質の凝集に伴う発熱反応が熱変性に伴う吸熱反応と同時に観測され、蛋白質変性に伴う比熱変化の観測が難しい場合が多い。その点、CD測定に必要な蛋白質濃度ははるかに低く、凝集の影響を受けにくいという利点がある。こうしてCD測定から得た変性曲線について、二状態転移と仮定し、さらにDSCから得られたpH 3.6での ΔC_p を用いて非線形フィッティングを行い、酸化型と還元型両方の25℃での熱力学量を得ることに成功した。¹⁷⁾ このようにして得られた熱力学量とシトクロム *c* の機能の関係については、すでにYamamotoおよびTaiが本誌にて解説している。¹⁸⁾

6. AA c555 の安定性と構造の関係

筆者らは、シトクロム *c* の耐熱性の限界を求めて、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* のAA c555を対象にした研究も展開している。

6.1 先行研究の矛盾

AA c555のアミノ酸配列、大腸菌での発現、そして熱変性については、すでに他の研究グループによって報告されている。¹⁹⁾ それによると、AA c555溶液を100℃まで加熱しても変性せず、特に高い熱安定性を持つことが示唆され

ている。同報告では、ヘム鉄に配位するMet近傍のアミノ酸数残基 (Fig.3) が、AA c555には存在するが他のシトクロム *c* にはないことから、AA c555は高い熱安定性を持つと推測している。ここでは特に実験的な証明はなされていない。

他のシトクロム *c* では、ヘム鉄に配位するMetの近傍はループ構造を形成している。AA c555の対応する部分でも同様にループ構造を形成しているのならば、多いアミノ酸の分だけループが長くなるはずである。ループの伸長によって蛋白質が不安定化する例もあり、²⁰⁾ AA c555でも安定化には不利な要因となり得る。これでは、既報の考え方と矛盾を生じる。

6.2 新たに分かったAA c555の特徴

筆者らはまず、前述の耐圧セルホルダーを用いてAA c555の完全な熱変性過程をCDで追跡し、その変性温度を130℃と決定することができた。²¹⁾ 次に、AA c555のX線結晶構造解析を行ったところ、ヘム鉄に配位するMet残基を含む部分は、Metを中心にヘリックス構造を形成していることが明らかになった (Fig.4)。²²⁾ 他のシトクロム *c* ではループ構造を形成する部分がAA c555ではヘリックス構造となっているため、AA c555は熱変性に対して安定化していると考察できる。筆者らが用いている4種類のシトクロム *c* には、4本のヘリックス領域が存在し、それらの位置関係は保存されている (Fig.4)。AA c555も例外ではなく、これら4本のヘリックスは保存されている。それらに加えて、AA c555は5本目のヘリックス構造を持っているのである。

AA c555では他のシトクロム *c* に比べてヘリックス構造が一つ増えただけという一見単純な差が見られる。しかし、それにより蛋白質が安定化され、結果として極度に温度が高い環境に適応できたのかもしれない。AA c555には蛋白質安定性の向上という複雑な現象がまだまだ眠っているようである。例えば、AA c555が持つ5本のヘリックスには疎水性残基が多く、そのほとんどが蛋白質分子の内側を向いている (Fig.5)。5本目のヘリックスの存在意義と併せて、変異導入実験による実証が必要である。

7. AA c555 の特異な折り畳み

蛋白質の折り畳みと変性、すなわち構造の形成と崩壊は表裏一体の関係にある。つまり構造を安定化している要因は、同時に折り畳みを進める要因でもあり得る。

前のセクションで、AA c555は特に高い安定性を持つことを述べた。この高い安定性は、AA c555のアミノ酸配列に帰着でき、それは蛋白質の折り畳みにも影響している可能性がある。筆者らは、蛋白質の安定性と折り畳みの関連性を調べるため、AA c555を対象とした実験を行っている。以下、大腸菌を宿主とした標準的な発現系におけるAA c555の例外的な発現、および試験管内でのAA c555の特

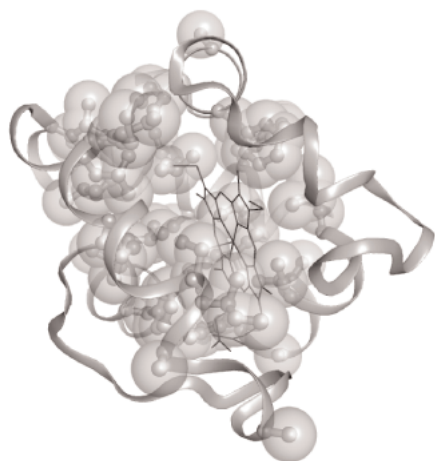


Fig.5 Hydrophobic amino acid residues facing protein interior of AA c555.

異なる折り畳みについて紹介する。

7.1 シトクロム *c* 折り畳みの定説と AA c555 の例外的な発現

一般的に、ヘムを含まないアポ型のシトクロム *c* は、二次構造がないランダムな状態であり、ヘムの結合によって蛋白質の折り畳みが進み三次構造が形成されると考えられている。²³⁾ これがシトクロム *c* 折り畳みの定説である。シトクロム *c* が細胞内で生合成される場合でも、アポ型シトクロム *c* にヘムを結合するための装置が準備されていることから、⁵⁾ ヘムとの結合がシトクロム *c* の生合成過程で重要なポイントとなっていることが想像できる。

筆者らは、実験に用いているシトクロム *c* を大腸菌で発現させているが、その大腸菌においては、Ccm (Cytochrome *c* maturation) と名付けられた9種類の蛋白質とDsb蛋白質が、アポ型シトクロム *c* とヘムとの結合を触媒している。CcmやDsbは、シトクロム *c* が最終的に局在する細胞表層 (大腸菌の場合、ペリプラズム) で機能している (Fig.6)。

Dsbを欠損する大腸菌でシトクロム *c* を細胞表層に発現させると、ことごとく失敗する。これは、筆者らが色々なシトクロム *c* を大腸菌で発現させてきた経験からいえることである。しかし、唯一の例外がAA c555である。AA c555だけは、Dsbを欠損する大腸菌でも発現する。²⁴⁾

余談であるが、Dsbを欠損する細菌を使う実験には注意を要する。なぜならば、システインやジチオスレイトールなど、チオール・ジスルフィドの酸化還元に関わる低分子化合物が培地中に混入していると、Dsbの欠損を補ってしまふからである。したがって、培地は最少培地を用い、使う試薬にもともと含まれる混入物にも注意を払う必要がある。このような注意を怠ると、Dsbを欠損する細菌でもシ

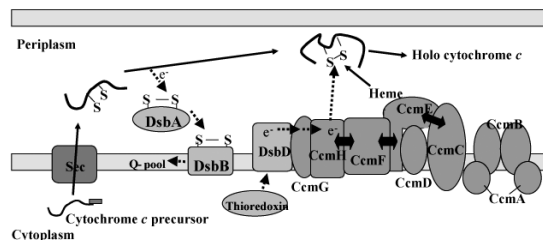


Fig.6 Cytochrome *c* biogenesis machinery in *Escherichia coli*. Cytochrome *c* precursor polypeptide is translocated to periplasm via Sec proteins. The two heme binding Cys residues in the cytochrome *c* polypeptide first form disulfide bond by means of DsbA protein, which is followed by reduction through CcmH before the heme binding. The heme is supplied by CcmE protein and finally holo cytochrome *c* is formed. Other proteins in this machinery are supposed to function indirectly for the cytochrome *c* biogenesis.

トクロム *c* が発現する可能性があり、「Dsbはシトクロム *c* 生合成に必要なではない」という、誤った判断を下すことになってしまう。²⁵⁾ 筆者らは、AA c555以外のシトクロム *c* ならば発現しないという培養条件で、AA c555のDsb非依存的な発現を観察しているのである。

7.2 仮説の設定

なぜAA c555だけが、Dsbを欠損する大腸菌で発現するのか？そこで筆者らが立てた仮説は、「アポ型のAA c555は自発的に折り畳み構造を形成し、そこへヘムが自発的に入り込む」というものである。

この仮説を導出した根拠は、ヘムとチオエーテル結合しないシトクロム *b* の折り畳みとヘム結合に関する先行研究の成果による。シトクロム *b* の折り畳みに関する先行研究によって、

- (1) シトクロム *b* は、ヘムを含まないアポ型でもホロ型に近い立体構造を形成する
- (2) シトクロム *b* は、CcmやDsbの触媒作用を必要とせず大腸菌でホロ型として発現する

ということが明らかにされている。²⁶⁾ 筆者らは、AA c555がDsb非依存的に大腸菌で発現することから、AA c555もシトクロム *b* のようにヘムがないアポ型でもホロ型に近い立体構造を形成し、ヘムを自発的に取り込むと考えたのである。

7.3 仮説の検証と今後の課題

前項で述べた仮説を検証するために、筆者らはAA c555の特徴を調べた。²¹⁾ 具体的には、AA c555の配列中、ヘムが結合するCys-Xaa-Xaa-Cys-Hisの2つのCys残基をAla

に置換し、ヘムとチオエーテル結合できないようにした。この変異体が*大腸菌*で発現したときにシトクロム *b* のようにヘムを取り込むのかどうか、さらにアポ変異体はヘムがなくても構造を取り得るのかどうかを調べた。

実験の結果、構築したAA *c*555変異体は、*大腸菌*でホロ型のシトクロム *b* 様の蛋白質として発現した。さらに精製したAA *c*555変異体からヘムを除去しても、*大腸菌*の生育温度、37℃ではホロ型のAA *c*555と匹敵するヘリックス含量を持つことを突き止めた。そしてアポ型は試験管内で速やかにヘムを取り込みホロ型となった。以上、変異体を用いた実験から、AA *c*555はアポ型でも構造を形成していると結論した。この結果は、ヘムの結合によってシトクロム *c* の折り畳みが進むとされている定説を覆すものであり、シトクロム *c* ポリペプチドそのものがヘムなしでも折り畳む最初の例である。

AA *c*555がアポ型でも構造を形成しているということは、ヘムとポリペプチドの相互作用による安定化とは別に、ポリペプチドのみの相互作用によって構造を安定化している可能性を示唆する。前のセクションで解説したホロ型AA *c*555の立体構造から、高い安定性に寄与するアミノ酸を推定した。これらのうち、アポ型AA *c*555の安定性や折り畳みに貢献している残基があるかもしれない。AA *c*555やその変異体を使って、アミノ酸レベルで現象に潜む実体論に迫ることが今後の課題である。

8. おわりに

Keilinが再発見したシトクロム *c* は、これまで蛋白質科学の研究対象として重宝されてきた。筆者らが研究材料としているシトクロム *c* は、由来する細菌の生育温度が異なるため、熱安定性が異なる。しかし、アミノ酸配列や立体構造はそれ程変わらない。したがって、わずかなアミノ酸の違いによってシトクロム *c* の安定性に違いが生じている。このような一連の蛋白質は、蛋白質の安定化問題を熱力学と構造から理解するのに適している。また蛋白質の折り畳みの面でも、系統的に研究を進めることができるメリットがある。特に安定性が高いAA *c*555と他のシトクロム *c* の性質を比較することで、従来の考え方を改めるような問題提起が可能になった。

謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果は、五十嵐泰夫博士（東京大学）、小林祐次博士（大阪薬科大学）、山本泰彦博士（筑波大学）、および大久保忠恭博士（大阪大学）との共同研究によるものであり、これらの方々に深く感謝する。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、科学技術振興機構CRESTタイプにより行われた。

文 献

- 1) D. Keilin, and J. Keilin, The history of cell respiration and cytochrome, Cambridge University Press, London (1966).
- 2) E. Margoliash, E. L. Smith, G. Kreil, and H. Tuppy, *Nature* **192**, 1125 (1961).
- 3) R. E. Dickerson, T. Takano, D. Eisenberg, O. B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, and E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* **246**, 1511 (1971).
- 4) R. E. Dickerson, *Sci. Am.* **242**, 137 (1980).
- 5) M. D. Page, Y. Sambongi, and S. J. Ferguson, *Trends Biochem. Sci.* **23**, 103 (1998).
- 6) Y. Sambongi, and S. J. Ferguson, *FEBS Lett* **398**, 265 (1996).
- 7) M. Kinoshita, K. Kamagata, A. Maeda, Y. Goto, T. Komatsuzaki, and S. Takahashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10453 (2007).
- 8) I. Bertini, G. Cavallaro, and A. Rosato, *Chem. Rev.* **106**, 90 (2006).
- 9) Y. Sambongi, S. Uchiyama, Y. Kobayashi, Y. Igarashi, and J. Hasegawa, *Eur. J. Biochem.* **269**, 3355 (2002).
- 10) S. Nakamura, S. Ichiki, H. Takashima, S. Uchiyama, J. Hasegawa, Y. Kobayashi, Y. Sambongi, and T. Ohkubo, *Biochemistry* **45**, 6115 (2006).
- 11) J. Hasegawa, T. Yoshida, T. Yamazaki, Y. Sambongi, Y. Yu, Y. Igarashi, T. Kodama, K. Yamazaki, Y. Kyogoku, and Y. Kobayashi, *Biochemistry* **37**, 9641 (1998).
- 12) J. Hasegawa, H. Shimahara, M. Mizutani, S. Uchiyama, H. Arai, M. Ishii, Y. Kobayashi, S. J. Ferguson, Y. Sambongi, and Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **274**, 37533 (1999).
- 13) J. Hasegawa, S. Uchiyama, Y. Tanimoto, M. Mizutani, Y. Kobayashi, Y. Sambongi, and Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **275**, 37824 (2000).
- 14) K. Oikawa, S. Nakamura, T. Sonoyama, A. Ohshima, Y. Kobayashi, S. J. Takayama, Y. Yamamoto, S. Uchiyama, J. Hasegawa, and Y. Sambongi, *J. Biol. Chem.* **280**, 5527 (2005).
- 15) S. Uchiyama, J. Hasegawa, Y. Tanimoto, H. Moriguchi, M. Mizutani, Y. Igarashi, Y. Sambongi, and Y. Kobayashi, *Protein Eng.* **15**, 455 (2002).
- 16) S. Hakamada, T. Sonoyama, S. Ichiki, S. Nakamura, S. Uchiyama, Y. Kobayashi, and Y. Sambongi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2103 (2008).
- 17) S. Uchiyama, A. Ohshima, S. Nakamura, J. Hasegawa, N. Terui, S. J. Takayama, Y. Yamamoto, Y. Sambongi, and Y. Kobayashi, *J. Am. Chem.*

- Soc.* **126**, 14684 (2004).
- 18) Y. Yamamoto and H. Tai, *Netsu Sokutei* **35**, 131 (2008).
- 19) C. Aubert, F. Guerlesquin, P. Bianco. G. Leroy. P. Tron, K. Stetter, and M. Bruschi, *Biochemistry* **40**, 13690 (2001).
- 20) A. Yamagishi, *Netsu Sokutei* **33**, 2 (2006).
- 21) M. Yamanaka, H. Mita, Y. Yamamoto, and Y. Sambongi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2022 (2009).
- 22) M. Obuchi, K. Kawahara, D. Motooka, S. Nakamura, M. Yamanaka, T. Takeda, S. Uchiyama, Y. Kobayashi, T. Ohkubo, and Y. Sambongi, *Acta Crystallogr.* **D65**, 804 (2009).
- 23) W. R. Fisher, H. Taniuchi, and C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* **248**, 3188 (1973).
- 24) N. Kojima, M. Yamanaka, S. Ichiki, and Y. Sambongi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1418 (2005).
- 25) M. Deshmukh, S. Turkarslan, D. Astor, M. Valkova-Valchanova, and F. Daldal, *J. Bacteriol.* **185**, 3361 (2003).
- 26) P. D. Barker, E. P. Nerou, S. M. Freund, and I. M. Fearnley, *Biochemistry* **34**, 15191 (1995).

要 旨

シトクロム*c*は、常温性から超好熱性に至るまで多くの細菌に存在する。シトクロム*c*は、呼吸鎖電子伝達系で機能し、生合成や進化といった分子生物学的な面のみならず、蛋白質の構造、安定性、および折り畳みといった生物物理学的な面でも、もっとも特徴づけられている蛋白質の一つである。4種の相同なシトクロム*c*、常温性の*Pseudomonas aeruginosa* シトクロム*c*551 (PA *c*551)、中程度好熱性の*Hydrogenophilus thermoluteolus* シトクロム*c*552 (PH *c*552)、好熱性の*Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム*c*552 (HT *c*552)、そして超好熱性の*Aquifex aeolicus* シトクロム*c*555 (AA *c*555)を対象に、変異導入実験や構造解析が実施され、アミノ酸レベルで蛋白質の安定化機構が明らかになった。HT *c*552 は、特定の5残基のアミノ酸によってPH *c*552 やPA *c*551 よりも安定であることが分かった。AA *c*555は他の3種よりもヘリックス構造を一つ多く持つために、さらに安定化されているようである。また、ヘムのないアポ型のAA *c*555が自発的に折り畳み、ホロ型と同様な構造を取ることが、シトクロム*c*では初めて実証

された。このように、熱安定性が異なる4種のシトクロム*c*を対象にして、蛋白質の構造と折り畳みの分子機構が明らかになりつつある。

三本木 至宏 Yoshihiro SAMBONGI

広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻, Department of Bio-functional Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

TEL/FAX. 082-424-7924,

e-mail: sambongi@hiroshima-u.ac.jp

研究テーマ：微生物学, エネルギー代謝, 蛋白質科学

趣味：読書, 散歩, 野球観戦

山中 優 Masaru YAMANAKA

広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻, Department of Biofunctional Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

TEL/FAX. 082-424-7924,

e-mail: d073078@hiroshima-u.ac.jp

研究テーマ：ヘム蛋白質構造形成, シトクロム*c*生合成

趣味：酒

長谷川 淳 Jun HASEGAWA

第一三共株式会社 製薬技術本部 分析評価研究所, Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Pharmaceutical Technology Division, DAIICHI SANKYO CO., LTD.

TEL. 03-3680-0151, FAX. 03-5696-8035, e-mail:

hasegawa.jun.mg@ daiichisankyo. co.jp

研究テーマ：蛋白質の立体構造, 相互作用および物理化学的性質の解析

趣味：音楽

内山 進 Susumu UCHIYAMA

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

TEL. 06-6879-4215, FAX. 06-6879-7442

e-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

研究テーマ：蛋白質および蛋白質複合体の生物物理化学

趣味：料理