

平成 26 年度

博士論文

ドメインスワッピングによる

好熱性水素細菌由来シトクロム  $c_{552}$  の多量体形成

林 有吾

奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学研究科

超分子集合体科学研究室

## 目次

### 第一章 序論

1-1. タンパク質の構造と変性	1
1-2. ドメインスワッピング	2
1-3. シトクロム <i>c</i> の構造と生合成	8
1-3-1. シトクロム <i>c</i> の機能と構造	
1-3-2. シトクロム <i>c</i> の生合成	
1-4. シトクロム <i>c</i> のドメインスワッピング	11
1-5. 好熱性水素細菌由来シトクロム <i>c</i> <sub>552</sub> と緑膿菌由来シトクロム <i>c</i> <sub>551</sub>	13
1-6. ウマシトクロム <i>c</i> とバクテリアシトクロム <i>c</i> の違い	14
1-7. 本研究の目的	15
1-8. 本論文の構成	15
参考文献	16

### 第二章 エタノール処理によるシトクロム *c*<sub>552</sub> の多量体形成

2-1. 緒言	23
2-2. 実験方法	24
2-3. 実験結果	27
2-3-1. cyt <i>c</i> <sub>552</sub> の多量体形成	
2-3-2. cyt <i>c</i> <sub>552</sub> 二量体の構造	
2-3-3. cyt <i>c</i> <sub>552</sub> 二量体の酸化還元電位	
2-3-4. cyt <i>c</i> <sub>552</sub> 二量体の熱安定性と熱力学的特性	
2-3-5. エタノールが cyt <i>c</i> <sub>552</sub> 構造に与える影響	
2-4. 考察	41
2-5. 結論	46
参考文献	44

### 第三章 大腸菌発現系におけるシトクロム *c*<sub>552</sub> の多量体形成

3-1. 緒言	51
3-2. 実験方法	52
3-3. 実験結果	56

3-3-1. 大腸菌内での <i>cyt c</i> <sub>552</sub> の多量体形成	
3-3-2. タンパク質発現量と安定性が大腸菌内での多量体形成に及ぼす影響	
3-3-3. 発現系から得た <i>cyt c</i> <sub>552</sub> 二量体の X 線結晶構造	
3-3-4. 多量体に含まれるアポ <i>cyt c</i> <sub>552</sub> の検出	
3-3-5. 巻き戻り反応によるホロ体とアポ体の多量体形成	
3-3-6. 好熱性水素細菌内での <i>cyt c</i> <sub>552</sub> の多量体形成	
3-4. 考察	70
3-5. 結論	73
参考文献	74
第四章 結論	78
論文目録	80
謝辞	81

## 第1章 序論

### 1-1. タンパク質の構造と変性

タンパク質のアミノ酸配列はタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列により決定される。Anfinsen はリボヌクレアーゼ A を変性剤により変性させ、酵素活性を無くした後、変性剤を取り除くと酵素活性が復活することを明らかにした<sup>1</sup>。Anfinsen の実験によりタンパク質の立体構造はそのアミノ酸配列によって一意に決定されることが示された。しかし、折れたたみ中間体や、何らかの原因で天然構造から変性し間違っただたみ状態になったタンパク質は、多量体や非特異的凝集体、アミロイド線維を形成することがある (Figure 1-1)<sup>2</sup>。アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳では、タンパク質凝集体が細胞に沈着していることが知られている<sup>3-5</sup>。アミロイドは間違っただたみ状態になったタンパク質が集合し、クロスβ構造を形成して線維状になったものである<sup>6</sup>。アミロイドが臓器に沈着する病気をアミロイドーシスと呼び、30 を超えるアミロイド形成タンパク質が病気と関連付けられている<sup>7,8</sup>。このように同じアミノ酸配列のタンパク質でも異なっただたみ状態の構造を取り得る。

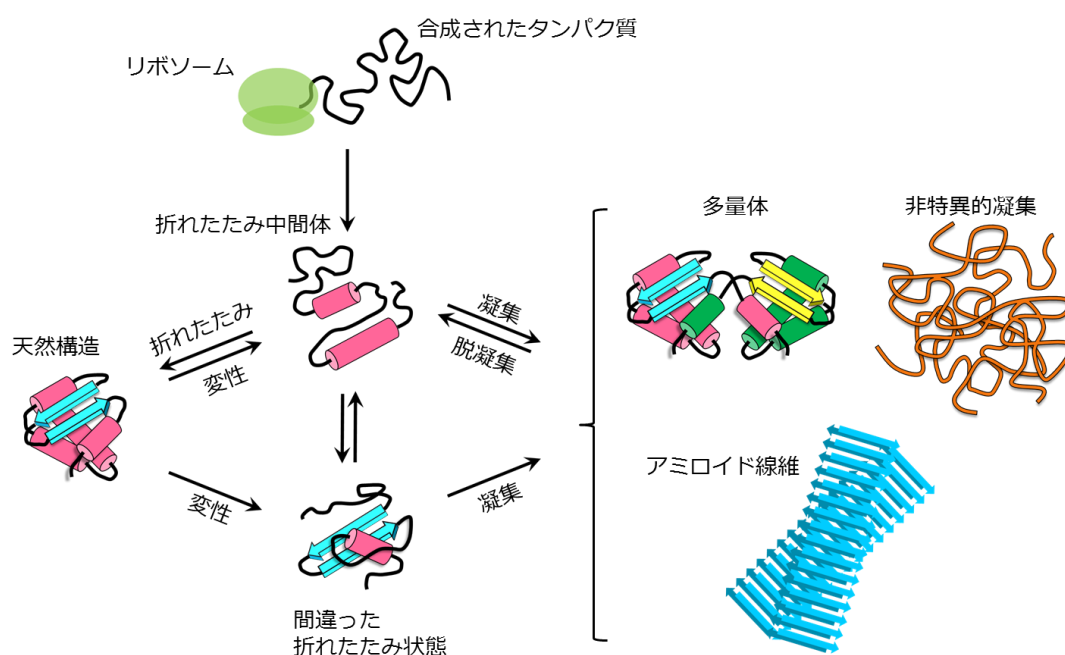


Figure 1-1. タンパク質の構造変化。

## 1-2. ドメインスワッピング (Domain swapping)

ドメインスワッピングは、タンパク質分子が一部の構造領域を、同じタンパク質の別分子の対応する構造領域と交換し、多量体を形成する機構である (Figure 1-2)。交換領域は一つの機能を持ったドメインであったり 1 本の  $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  ストランドであったりと様々である。交換領域と残りのタンパク質部分をつなぐループはヒンジループ (hinge loop) と呼ばれ、その構造は単量体中と多量体中とで大きく異なる (Figure 1-2 のオレンジと緑の線で示した部分)。ドメインスワッピングは 1994 年に Eisenberg らによってジフテリア毒素の二量体形成機構として初めて報告された<sup>9</sup>。

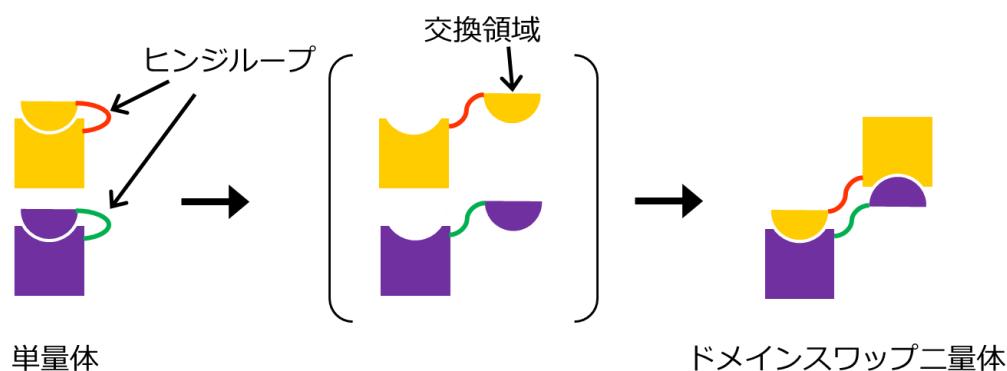
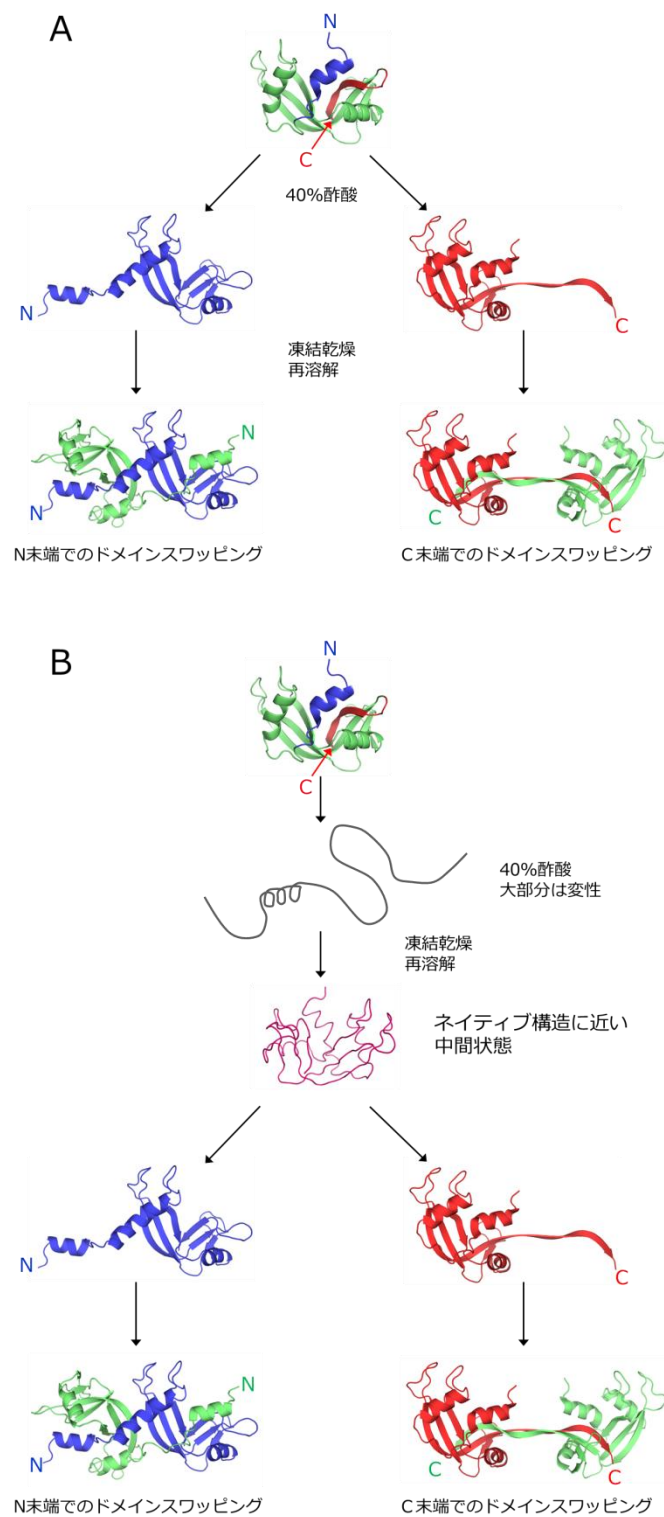


Figure 1-2. ドメインスワッピングの概念図。

ドメインスワッピングはアミロイド形成タンパク質においても観測されている<sup>10-13</sup>。これまでに多くのタンパク質がドメインスワップにより多量体を形成することが報告されている。例えば、リボヌクレアーゼ A は、C 末端  $\beta$  ストランドまたは N 末端  $\alpha$  ヘリックス領域のドメインスワッピングにより二種類の二量体を形成することが知られている。三量体も二種類存在することが知られており、その内の一つは C 末端  $\beta$  ストランドをスワップして形成された環状構造であることも明らかになっている<sup>14-16</sup>。多量体の機能については、リボヌクレアーゼ A は多量化することにより酵素活性が増大することが報告されている<sup>17</sup>。

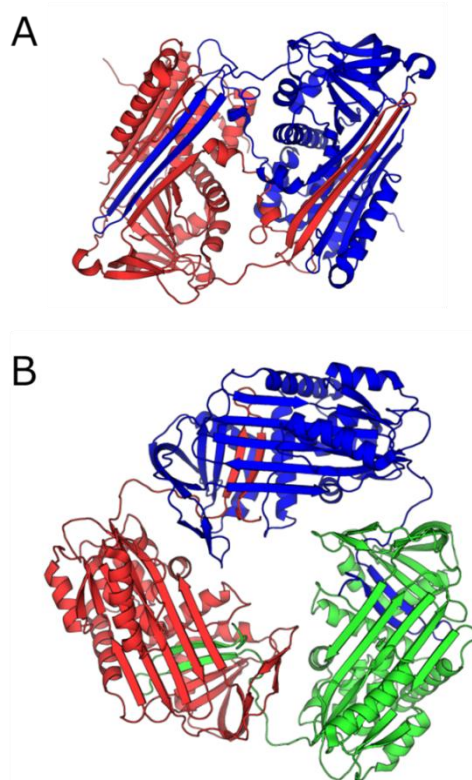
ドメインスワッピング構造の形成にはいくつかの経路があると考えられている。リボヌクレアーゼ A 多量体は 40% 酢酸溶液を凍結乾燥し、得られた沈殿を再溶解することで得られる。これまで酢酸存在下のリボヌクレアーゼ A は N 末端の  $\alpha$  ヘリックスまたは C 末端の  $\beta$  ストランドのみが開いた構造をとっており、凍結乾燥により酢酸を取り除き、緩衝液に再溶解させることで二種類のドメイ

ンスワップ構造が得られると考えられていた (Figure 1-3、A)。しかし、詳細な検討を行ったところ、40%酢酸中のリボヌクレアーゼ A は、一部の  $\alpha$  ヘリックスを除いて  $\beta$  シート部分は完全に変性していることが分かった。この部分的な変性状態からネイティブ構造に近い中間体に構造変化し、さらに完全に巻き戻る際に多量化するという新しい機構が提案されている (Figure 1-3、B) <sup>18</sup>。



**Figure 1-3.** 40%酢酸添加によるリボヌクレアーゼ A の多量化機構<sup>18</sup>。(A) これまで考えられてきた多量化機構、(B) 新しい多量化機構。N 末端、C 末端をそれぞれ N と C で示す。

セルピン (serpin: serine protease inhibitors の総称) の変異体は安定な多量体を形成して細胞内に沈着し、病気を引き起こすことが知られている<sup>19</sup>。例えばニューロセルピン変異体は若年性痴ほう症、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン変異体は肝硬変や肺気腫を引き起こす<sup>20</sup>。セルピンの多量化機構については長らく議論が続いてきたが、山崎らは 2008 年にアンチトロンビン二量体の X 線結晶構造解析を行い、アンチトロンビン二量体が、約 50 残基から成る 2 本の長い  $\beta$  シート領域を交換することで形成されると明らかにした (Figure 1-4、A)<sup>21</sup>。さらに、交換領域にシステインを導入した変異体を低濃度の GdnHCl 存在下、37°C でインキュベートすることで多量化させ、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンもアンチトロンビンと同様の部位でドメインスワップすることを示した<sup>21</sup>。ところが、細胞内で形成される  $\alpha_1$ -アンチトリプシン多量体と反応するモノクローナル抗体<sup>22</sup> は、GdnHCl 処理により形成させた  $\alpha_1$ -アンチトリプシン多量体とは反応しなかった<sup>23</sup>。そこで山崎らは抗体と反応した  $\alpha_1$ -アンチトリプシン多量体の X 線結晶構造解析を行い、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン三量体が C 末端の 34 残基のアミノ酸を交換することで形成されることを明らかにした (Figure 1-4、B)<sup>24</sup>。



**Figure 1-4.** セルピン多量体の構造。(A) アンチトロンビン二量体 (PDB code: 2ZNH)、(B)  $\alpha_1$ -アンチトリプシン三量体 (PDB code: 3T1P)。



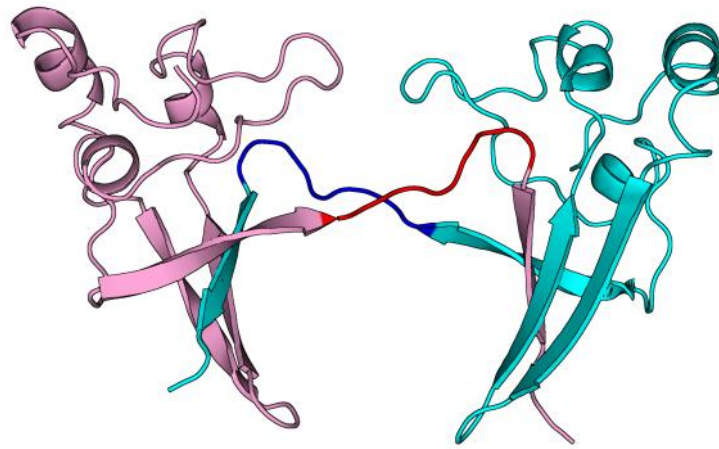
Itzhaki らは p13suc1 を用いてヒンジループとドメインスワッピングの関係を調べた<sup>16</sup>。単量体と二量体の間の平衡を考える場合、解離定数  $K_d$  は以下の式によって定義される。

$$K_d = \frac{[M]^2}{[D]}$$

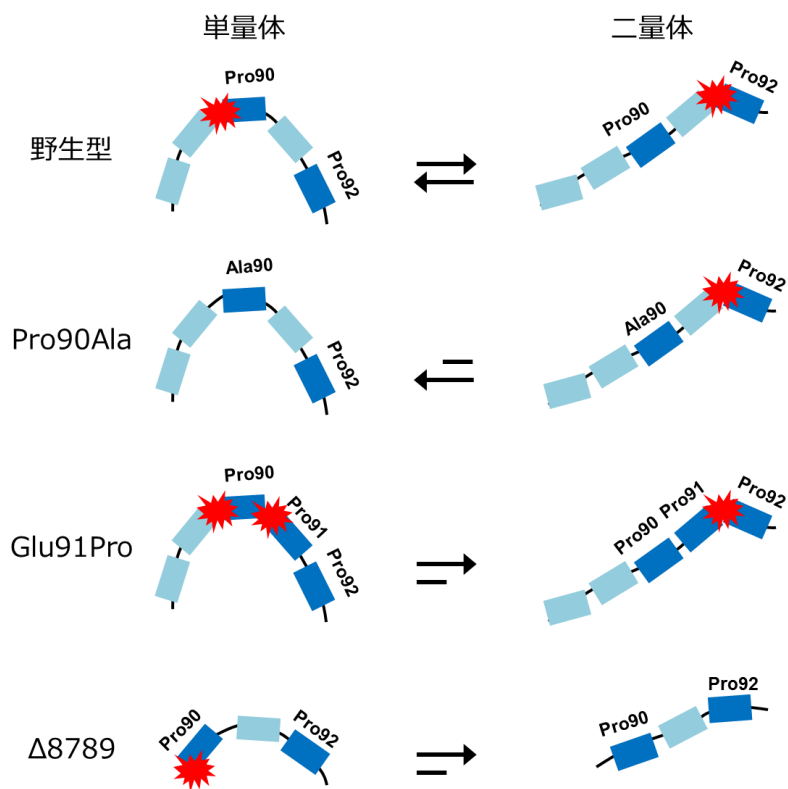
[M]は単量体の濃度、[D]は二量体の濃度である。p13suc1 (Figure 1-5) のヒンジループ (Val87-His93) には 2 つのプロリン残基 (Pro90、Pro92) が含まれる。プロリンは主鎖の窒素原子と側鎖が共有結合し環状になっており構造自由度が少ないため、プロリンの周囲では立体構造に制約がかかる。ヒンジループにおける変異箇所と  $K_d$  の関係を Table 1-1 に示す。Pro90 は単量体のヒンジループ中では好ましくない状況にあったため、Ala に置換すると平衡は単量体に偏った (Pro90Ala)。一方、Pro92 は二量体のヒンジループ中で好ましくない状況にあるため Ala に置換すると平衡は二量体へ偏った (Pro92Ala)。Glu91 を Pro に置換しさらに構造制約を強めると  $K_d$  は 0.0001 まで小さくなった (Glu91Pro)。また、Pro を 2 つとも Ala に置換するとヒンジループから構造制約が取り除かれ、平衡は単量体へ偏った (Pro90Ala/ Pro92Ala)。Val87-Val89 を取り除き、ヒンジループを短くすると、平衡は完全に二量体へ偏った ( $\Delta$  8789)。これはループが短くなり単量体構造を維持するのが困難になったためである。さらに会合によるエントロピーのロス、短いヒンジループがドメインスワッピングにより伸びた構造をとることで補償されるためでもある。このようにヒンジループ中の構造制約を変化させることでドメインスワッピングがコントロールできる (Figure 1-6) と報告されている。

**Table 1-1.** 野生型および変異型 p13suc1 の単量体と二量体の解離定数<sup>16, 25, 26</sup>

変異箇所	$K_d$ (mM)
野生型	1.9
Pro90Ala	890
Pro92Ala	0.2
Glu91Pro	0.0001
Pro90Ala/ Pro92Ala	11.2
$\Delta$ 8789	$1 \times 10^{-6}$



**Figure 1-5.** p13suc1 二量体の構造 (PDB code: 1SCE)<sup>27</sup>。二量体のプロトマーをピンクと水色で示す。ヒンジループ (Val87–His93) を赤と青で示す。

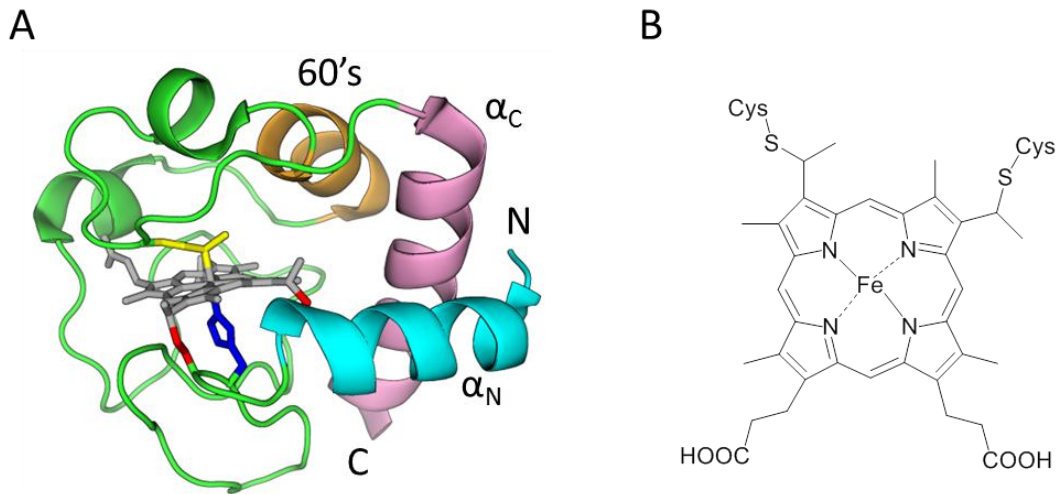


**Figure 1-6.** 野生型および変異型 p13suc1 のヒンジループ領域の模式図。Pro 残基を青の四角形、それ以外のアミノ酸残基を水色の四角形で表す。主鎖に構造制約のある個所を赤い印で示す。

### 1-3. シトクロム *c* の構造と生合成

#### 1-3-1. シトクロム *c* の機能と構造

シトクロム *c* (cyt *c*) は動物、植物、バクテリアなどほぼ全ての生物種中に存在し、光合成や呼吸などエネルギー生産に関わる酵素間の電子伝達を担うヘム（鉄-プロトポルフィリン IX 錯体）タンパク質である。cyt *c* は細胞がアポトーシスを引き起こす際、ミトコンドリアからサイトゾルへ多量に放出されることからアポトーシスの誘導因子としても注目されている<sup>28, 29</sup>。また、cyt *c* は安定性が高く、色素（ヘム）を有するので扱いやすいため最もよく研究されているタンパク質でもある<sup>30</sup>。1970年代に最初のミトコンドリア由来 cyt *c* の構造が解かれて以来<sup>31</sup>、様々な cyt *c* の構造が明らかにされている。小さく、可溶性のヘムタンパク質である cyt *c* は、種の由来を問わず、様々な分光学的手法の研究対象となり、生化学や生物物理学にとって重要なタンパク質である<sup>32</sup>。cyt *c* に共通する構造的特徴は3本の長い $\alpha$ ヘリックス（N末端ヘリックス、C末端ヘリックス、タンパク質中程のヘリックス：ミトコンドリアの cyt *c* では60'sヘリックスと呼ばれる）を持つことであり、ヘムの軸配位子はHis、もう一方はほとんどの場合Metである<sup>33-36</sup>。ミトコンドリアの cyt *c* は103-104残基のアミノ酸から成り、生物間でその配列はほとんど変わらない<sup>37</sup>。一方、原核生物の cyt *c* は79-134残基のアミノ酸から成り、その配列も多様である<sup>37</sup>が、3本の $\alpha$ ヘリックスや、ヘム周辺のアミノ酸側鎖の配置はミトコンドリアの cyt *c* と良く似ている。Figure 1-7にウマ cyt *c* の構造を示す<sup>38</sup>。ヘムはCys14とCys17側鎖のチオール基と、ヘムの3位と8位のビニル基との間でチオエーテル結合を形成することでタンパク質と結合している（Figure 1-7, A）。ヘム鉄の4つの配位座はポルフィリン環のピロールの窒素原子で占められている（Figure 1-7, B）。ポルフィリン平面に対して垂直方向に存在する5番目と6番目の配位座は、His18側鎖のイミダゾール環の窒素原子とMet80側鎖の硫黄原子で占められている（Figure 1-7, A）。



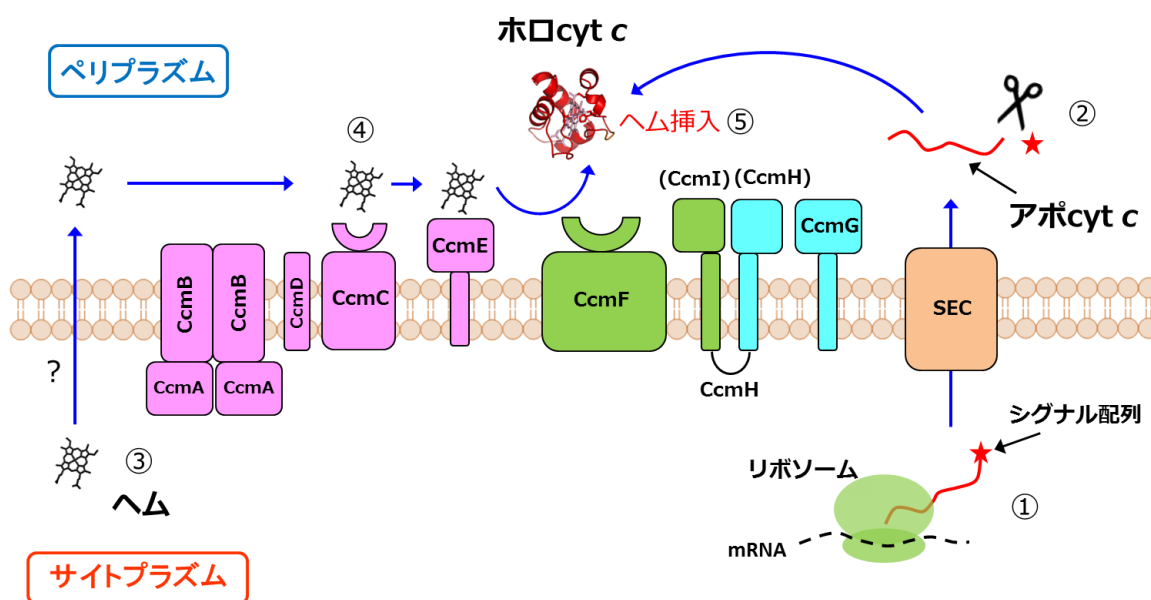
**Figure 1-7.** (A) Cyt *c* の立体構造。ヘムをグレーのスティックモデルで、ヘムに結合した Cys と軸配位子の Met、His をそれぞれ赤、黄色、青のスティックモデルで示す。N 末端、C 末端、60's ヘリックスをそれぞれピンク、水色、オレンジで示す。N 末端と C 末端をそれぞれ N、C、N 末端  $\alpha$  ヘリックスと C 末端  $\alpha$  ヘリックスをそれぞれ  $\alpha_N$ 、 $\alpha_C$  と表示した。(B) Heme *c* の構造。

### 1-3-2. シトクロム *c* の生合成

Cyt *c* の生合成では、まずタンパク質部分 (アポ cyt *c*) が合成され、その後翻訳後修飾によりヘムが挿入され成熟型 (ホロ cyt *c*) となる。Cyt *c* の成熟化機構は生物種ごとに様々で、System I から System VI と呼ばれる異なる機構が採用されている<sup>39-42</sup>。ここでは System I について説明する。System I は多くのグラム陰性菌や植物と原生動物のミトコンドリアに見られるヘム挿入機構で、最も複雑であり 20 年以上前から研究されてきた<sup>43-46</sup>。System I は 9 つ (または 8 つ) のタンパク質 Ccm (Cytochrome *c* maturation) ABCDEFGHI から成る (Figure 1-8)。Ccm タンパク質は CcmA を除き、全て膜中に存在し、ペリプラズムドメインを持つものもある。グラム陰性菌では、まず、サイトプラズムで N 末端にペリプラズム移行シグナル配列が付加したアポ cyt *c* が合成され、分泌タンパク質によってペリプラズムへと運ばれる (Figure 1-8、①)。可溶性の cyt *c* の場合、リーダーペプチダーゼによってシグナル配列が取り除かれる (Figure 1-8、②)<sup>47</sup>。ヘムもサイトプラズムで合成されるが、どのようにしてペリプラズムへ運ばれるかは不明である (Figure 1-8、③)。ペリプラズムへ運ばれたヘムは CcmABCDE によって、アポ cyt *c* にヘムを挿入する役目をもつと考えられる CcmF のもとへと運ばれる (Figure 1-8、④)。CcmG および CcmH はアポ cyt *c* のヘム結合モチ

ーフ (Cys-X-X-Cys-His) の Cys 残基の酸化還元に関係すると考えられている<sup>48-50</sup>。最終的なアポ cyt c へのヘム挿入は CcmF によって行われる (Figure 1-8、⑤)。CcmI はアポ cyt c のシャペロンであると考えられており<sup>50, 51</sup>、また、Ccm I はアポ cyt c の凝集を防ぐことで *in vivo* でのホロ cyt c の多量化を防いでいると示唆されている<sup>51</sup>が、実際のところは不明である。

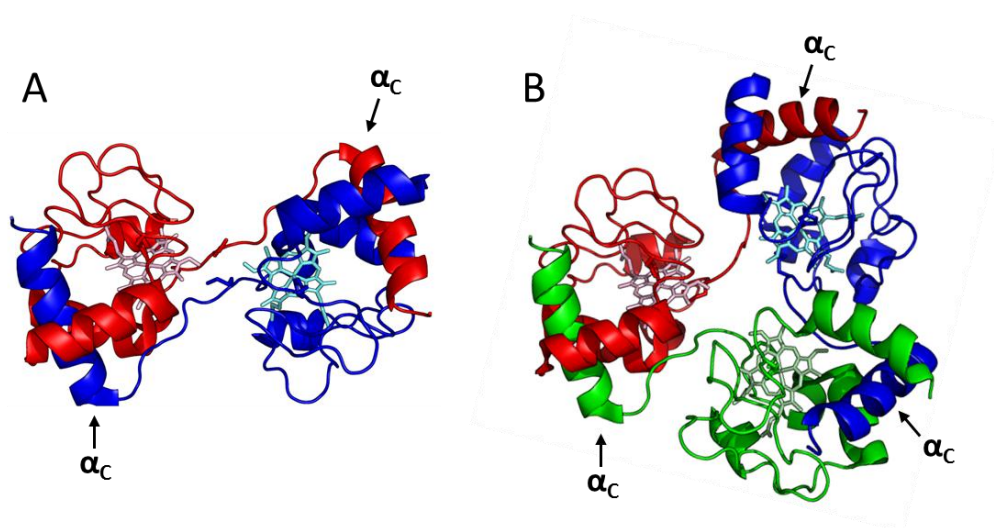
1-3-1 節でも述べたように cyt c は研究対象として魅力的なタンパク質であるが、大腸菌を用いた発現系の利用には限りがあった。例えば、シグナル配列部分の遺伝子を除去した *Thermus thermophilus* 由来 cyt c<sub>552</sub> (TT cyt c<sub>552</sub>) を大腸菌のサイトプラズムに発現させた場合、TT cyt c<sub>552</sub> に加え、ジスルフィド結合で形成された二量体も 30–40% 程度観測された<sup>52, 53</sup>。Ccm タンパク質は大腸菌内での cyt c 合成に必要であることが報告されている<sup>54, 55</sup>。Thöny-Meyer らは大腸菌由来の CcmABCDEFGH 遺伝子を一つのプラスミドに組み込んだ pEC86 を構築し、pEC86 と cyt c 遺伝子をコードした別のプラスミドを 1 つの大腸菌に導入することで収量よく cyt c を得ることができると示した<sup>56</sup>。先に述べた TT cyt c<sub>552</sub> の場合、N 末端にシグナル配列を付加した TT cyt c<sub>552</sub> を pEC86 にコードされた Ccm とともに共発現させると、オーセンティックと同様の分光学的性質、立体構造を持った TT cyt c<sub>552</sub> が得られ、サイトプラズムで発現させた時のような「エラー」は起こらなかった<sup>57</sup>。



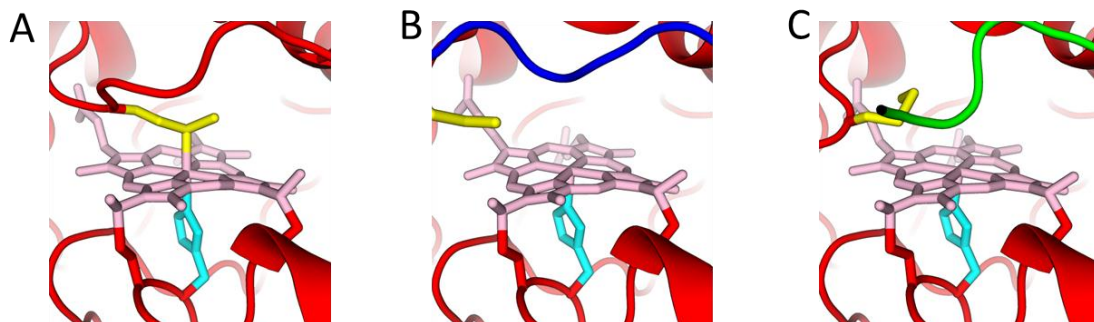
**Figure 1-8.** System I における cyt c 成熟化機構。ペリプラズムでのヘム輸送に関わる Ccm タンパク質をピンク、ヘム挿入に関わる Ccm タンパク質を黄緑、Cys 残基の酸化還元に関わる Ccm タンパク質を水色で示した。

#### 1-4. シトクロム *c* のドメインスワッピング

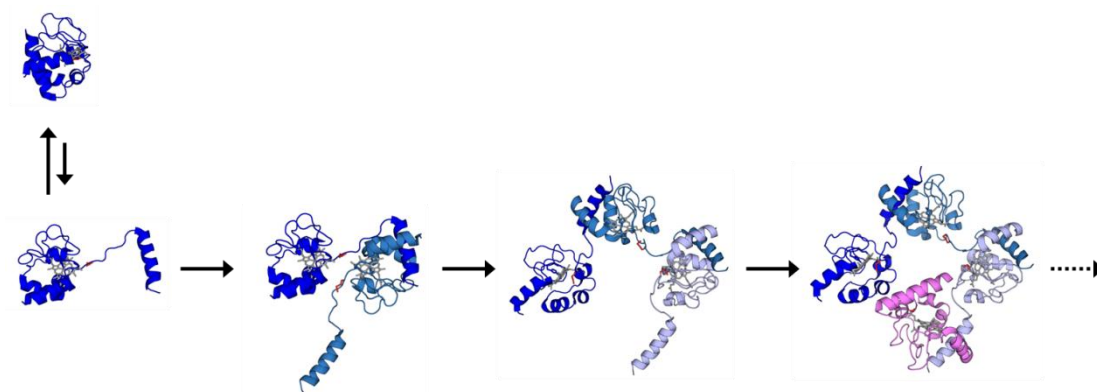
*cyt c* は単量体の状態で機能するタンパク質であるが、1962年に Margoliash らは *cyt c* がエタノール処理により多量化することを報告していた<sup>58</sup>。しかしその多量化機構は不明であった。廣田らはエタノール処理により形成したウマ *cyt c* 二量体と三量体の X 線結晶構造解析に成功し (Figure 1-9)、ウマ *cyt c* が C 末端  $\alpha$  ヘリックスでのドメインスワッピングにより多量化することを明らかにした<sup>59</sup>。ウマ *cyt c* 二量体、三量体の活性部位では軸配位子 Met80 がヘム鉄から解離し (Figure 1-10)、二量体は単量体よりも高いペルオキシダーゼ活性を示した<sup>59, 60</sup>。また、溶液中では二~四量体は鎖状に連なって伸びた構造をとっており、三量体はポリエチレングリコールとリン酸アンモニウムを添加すると鎖状構造から環状構造に変化した。*cyt c* は、Met80 がヘム鉄から解離し、Met80 以降の C 末端  $\alpha$  ヘリックスが開いた構造をとり、近傍の別の *cyt c* 分子と C 末端  $\alpha$  ヘリックスを交換することで多量体を形成すると推測されている (Figure 1-11)<sup>59</sup>。示差走査熱量測定 (DSC) よりウマ *cyt c* 二量体の解離温度は 58°C で、単量体への解離にともなうエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) はプロトマーあたり約 -20 kcal mol<sup>-1</sup> であると報告されている<sup>59</sup>。



**Figure 1-9.** (A) ウマ *cyt c* 二量体 (PDB code: 3NBS)、(B) 三量体 (PDB code: 3NBT) の構造。  $\alpha_c$  : C 末端  $\alpha$  ヘリックス。



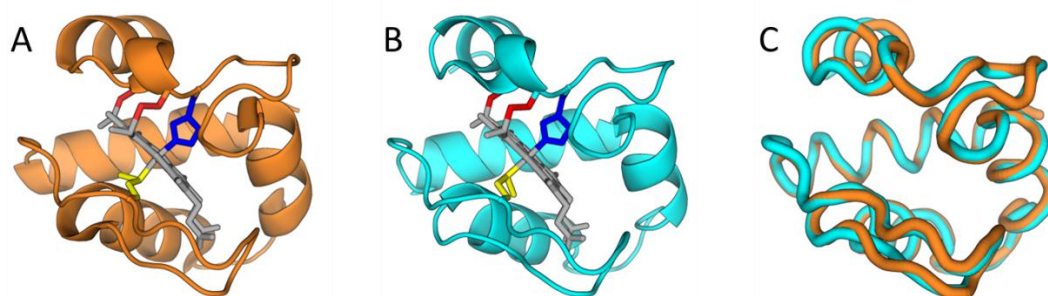
**Figure 1-10.** ウマ cyt *c* 単量体 (A)、二量体 (B)、三量体 (C) の活性部位構造。His14 と Met80 の側鎖をそれぞれ水色と黄のスティックモデルで示す。



**Figure 1-11.** ウマ cyt *c* の推定多量化機構。

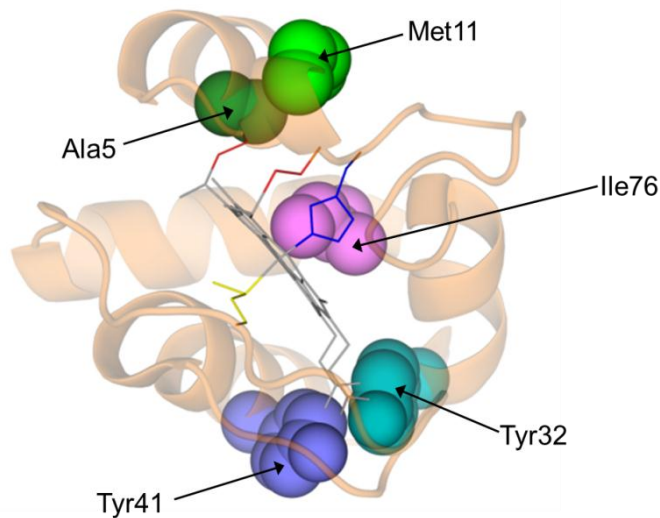
### 1-5. 好熱性水素細菌由来シトクロム $c_{552}$ と緑膿菌由来シトクロム $c_{551}$

至適生育温度が 72°C の好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来シトクロム  $c_{552}$  (cyt  $c_{552}$ )<sup>61</sup> はミトコンドリアの cyt  $c$  より小さく、80 残基のアミノ酸で構成され、分子量は約 9.2 kDa である。*Pseudomonas nautica* cyt  $c_{552}$  はシトクロム  $cd_1$  の電子供与体であると報告されているが<sup>62</sup>、好熱性水素細菌由来 cyt  $c_{552}$  の役割は明らかにされていない。Cyt  $c_{552}$  は、ミトコンドリアの cyt  $c$  同様、3 本の長い  $\alpha$  ヘリックスを有し、ヘムは Cys10 と Cys13 のチオール基とチオエーテル結合を形成し、ヘム鉄には His14 と Met59 が配位している (Figure 1-12, A)<sup>63, 64</sup>。また、cyt  $c_{552}$  は、熱安定性が非常に高いことが知られており、その変性温度は 100°C 以上である<sup>65-67</sup>。一方、常温菌の緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, 生育温度: 37°C) 由来 cyt  $c_{551}$  は cyt  $c_{552}$  とアミノ酸配列の相同性が 56% あり、主鎖の立体構造もよく一致する<sup>64</sup> が (Figure 1-12, B, C)、変性温度は約 80°C である<sup>67</sup>。長谷川らは cyt  $c_{551}$  のアミノ酸を cyt  $c_{552}$  の対応する位置のアミノ酸と置き換えた変異体を作製し、cyt  $c_{552}$  の Ala5、Met11、Tyr32、Tyr41、Ile76 が重要であることを示し (Figure 1-13)、cyt  $c_{552}$  は疎水性アミノ酸が密にパッキングすることによる疎水性相互作用により安定化されると説明した<sup>68-70</sup>。事実、F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78I cyt  $c_{551}$  は cyt  $c_{552}$  と同様の熱安定性を示した<sup>69</sup>。一方、及川らは cyt  $c_{552}$  の 5 つのアミノ酸を cyt  $c_{551}$  の対応する位置のアミノ酸と置き換えた変異体 (A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt  $c_{552}$ ) が cyt  $c_{551}$  と同程度の熱安定性を有することを示した<sup>66</sup>。このように安定性の異なる 2 つの相同タンパク質に双方向の変異を導入することで、アミノ酸側鎖がタンパク質の安定性に及ぼす影響が実験的に明らかにされている。



**Figure 1-12.** (A) cyt  $c_{552}$  の立体構造 (PDB code: 1YNR)、(B) cyt  $c_{551}$  の立体構造 (PDB code: 351C)、(C) cyt  $c_{552}$  と cyt  $c_{551}$  の主鎖構造の重ね合わせ。ヘム、ヘムと結合した Cys 側鎖、軸配位子の His および Met をそれぞれグレー、赤、黄、青のスティックモデルで示す。





**Figure 1-13.** *cyt c<sub>552</sub>* の熱安定性に寄与するアミノ酸残基。タンパク質構造をリボンモデルで示す。ヘムおよび Cys10、Cys13、His14、Met59 側鎖をそれぞれ灰、赤、青、黄のスティックモデルで示す。Ala5、Met11、Tyr32、Tyr41、Ile76 の側鎖を空間充填モデルで示す。

#### 1-6. ウマシトクロム *c* とバクテリアシトクロム *c* の違い

ミトコンドリアとバクテリアの *cyt c* はいくつかの構造的共通点 (1-3-1 節参照) を有し、共通の中間体や遷移状態を経て折りたたまれると提案されている<sup>71,72</sup>。しかしヘムの軸配位子である Met の解離条件は異なる。ウマ *cyt c* では穏やかな変性条件やアルカリ性の pH で Met が解離する<sup>73,74</sup>。一方、バクテリア由来の小型の *cyt c* の場合、鉄-Met 結合の開裂にはタンパク質がほとんど完全に変性する必要がある<sup>75,76</sup>。主鎖のアミド水素の交換反応を核磁気共鳴法 (NMR) で追跡することにより、ウマ *cyt c* では両末端ヘリックスが最も安定性が高く、軸配位子の Met80 を含んだループ領域は安定性が低いことが分かっている<sup>77</sup>。同様に、緑膿菌 *cyt c<sub>551</sub>* では、C 末端ヘリックスが最も安定性が高く、軸配位子の Met61 を含んだループ領域は比較的安定であり、ループ 1 から 2 番目のヘリックスを含む領域の安定性が低いことが分かっている<sup>78</sup>。このように同じタンパク質ファミリーに属する分子でも、分子内の局所的な安定性は異なる。

### 1-7. 本研究の目的

ウマ *cyt c* は C 末端  $\alpha$  ヘリックスのドメインスワッピングにより多量化することが明らかになっている。しかし、1-6 節に述べたようにミトコンドリア *cyt c* とバクテリア *cyt c* には構造的な違いが有り、*cyt c* ファミリータンパク質におけるドメインスワッピングという点では知見が不十分である。また、単量体の安定性とドメインスワップ多量体の安定性の関係は詳細に調べられていない。そこで、構造と熱安定性の関係が知られている好熱性水素細菌由来 *cyt c*<sub>552</sub> を用いて多量体の構造と安定性を調べた。

生体内でのドメインスワッピングによるタンパク質多量体形成に関する知見は限られている。生体内でのタンパク質多量体形成を調べるとき、生体組織からタンパク質を抽出する操作によってタンパク質が変性し巻き戻る際に単量体から多量体が生成したり、逆に多量体が解離する可能性がある。高い安定性を有する *cyt c*<sub>552</sub> 用いれば、単量体や多量体の変化を抑えることができると考えた。そこで発現系を用いて大腸菌内での *cyt c*<sub>552</sub> 多量体形成について調べた。

### 1-8. 本論文の構成

本論文は 4 つの章で構成されている。第 1 章では序論そして本研究に関連する先行研究について概説した。第 2 章ではエタノール処理により形成した *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の構造と安定性および熱力学的特性について調べ、*cyt c*<sub>552</sub> 二量体の構造と安定性の関係やスワップ領域決める要因について考察した。第 3 章では *cyt c*<sub>552</sub> の大腸菌発現系における多量体形成について調べ、大腸菌内での多量体形機構について考察した。第 4 章では本論文を総括し、今後の展望についても述べた。

## 参考文献

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181, 223-230.
2. Hartl, F. U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* 475, 324-332.
3. Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A. I., Steur, E., and Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol Aging* 24, 197-211.
4. Braak, H., and Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
5. Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002) Phases of amyloid- $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD, *Neurology* 58, 1791-1800.
6. Eisenberg, D., and Jucker, M. (2012) The Amyloid State of Proteins in Human Diseases, *Cell* 148, 1188-1203.
7. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S.-i., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., and Westermarck, P. (2012) Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis, *Amyloid* 19, 167-170.
8. Buxbaum, J. N., and Linke, R. P. (2012) A molecular history of the amyloidoses, *J. Mol. Biol.* 421, 142-159.
9. Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994) Domain swapping - entangling alloances between proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3127-3131.
10. Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization, *Nat. Struct. Biol.* 8, 770-774.
11. Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., and Jaskolski, M. (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping, *Nat. Struct. Biol.* 8, 316-320.
12. Guo, Z. F., and Eisenberg, D. (2006) Runaway domain swapping in amyloid-like fibrils of T7 endonuclease I, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8042-8047.
13. Liu, C., Sawaya, M. R., and Eisenberg, D. (2011)  $\beta_2$ -microglobulin forms three-dimensional domain-swapped amyloid fibrils with disulfide linkages, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 49-55.

14. Gronenborn, A. M. (2009) Protein acrobatics in pairs - dimerization via domain swapping, *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 39-49.
15. Liu, Y., and Eisenberg, D. (2002) 3D domain swapping: As domains continue to swap, *Protein Sci.* *11*, 1285-1299.
16. Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., and Itzhaki, L. S. (2003) The unfolding story of three-dimensional domain swapping, *Structure* *11*, 243-251.
17. Gotte, G., Bertoldi, M., and Libonati, M. (1999) Structural versatility of bovine ribonuclease A - Distinct conformers of trimeric and tetrameric aggregates of the enzyme, *Eur. J. Biochem.* *265*, 680-687.
18. Lopez-Alonso, J. P., Bruix, M., Font, J., Ribo, M., Vilanova, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C., and Laurents, D. V. (2010) NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: Implications for oligomer formation by 3D domain swapping, *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 1621-1630.
19. Lomas, D. A., and Carrell, R. W. (2002) Serpinopathies and the conformational dementias, *Nat. Rev. Genet.* *3*, 759-768.
20. Lomas, D. A., Belorgey, D., Mallya, M., Miranda, E., Kinghorn, K. J., Sharp, L. K., Phillips, R. L., Page, R., Robertson, A. S., and Crowther, D. C. (2005) Molecular mousetraps and the serpinopathies, *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 321-330.
21. Yamasaki, M., Li, W., Johnson, D. J. D., and Huntington, J. A. (2008) Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization, *Nature* *455*, 1255-1258.
22. Miranda, E., Perez, J., Ekeowa, U. I., Hadzic, N., Kalsheker, N., Gooptu, B., Portmann, B., Belorgey, D., Hill, M., Chambers, S., Teckman, J., Alexander, G. J., Marciniak, S. J., and Lomas, D. A. (2010) A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency, *Hepatology* *52*, 1078-1088.
23. Ekeowa, U. I., Freeke, J., Miranda, E., Gooptu, B., Bush, M. F., Perez, J., Teckman, J., Robinson, C. V., and Lomas, D. A. (2010) Defining the mechanism of polymerization in the serpinopathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 17146-17151.
24. Yamasaki, M., Sendall, T. J., Pearce, M. C., Whisstock, J. C., and Huntington, J. A. (2011) Molecular basis of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer, *EMBO Rep.* *12*, 1011-1017.
25. Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., Wilkinson, H. R., and Itzhaki, L. S. (2001) Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*,

- 5596-5601.
26. Schymkowitz, J. W. H., Rousseau, F., Wilkinson, H. R., Friedler, A., and Itzhaki, L. S. (2001) Observation of signal transduction in three-dimensional domain swapping, *Nat. Struct. Biol.* 8, 888-892.
  27. Bourne, Y., Arvai, A. S., Bernstein, S. L., Watson, M. H., Reed, S. I., Endicott, J. E., Noble, M. E., Johnson, L. N., and Tainer, J. A. (1995) Crystal structure of the cell cycle-regulatory protein *suc1* reveals a beta-hinge conformational switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 10232-10236.
  28. Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U., and Green, D. R. (2005) Connected to death: The (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis, *Science* 310, 66-67.
  29. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. D. (1997) Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91, 479-489.
  30. Butt, W. D., and Keilin, D. (1962) Absorption spectra and some other properties of cytochrome *c* and of its compounds with ligands, *Proc. R. Soc. B* 156, 429-458.
  31. Swanson, R., Trus, B. L., Mandel, N., Mandel, G., Kallai, O. B., and Dickerson, R. E. (1977) Tuna cytochrome *c* at 2.0 Å resolution. I. Ferricytochrome structure analysis, *J. Biol. Chem.* 252, 759-775.
  32. Bertini, I., Cavallaro, G., and Rosato, A. (2006) Cytochrome *c*: occurrence and functions, *Chem. Rev.* 106, 90-115.
  33. Chothia, C., and Lesk, A. M. (1985) Helix movements and the reconstruction of the haem pocket during the evolution of the cytochrome *c* family, *J. Mol. Biol.* 182, 151-158.
  34. Benini, S., Gonzalez, A., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Van Beeumen, J. J., and Ciurli, S. (2000) Crystal structure of oxidized *Bacillus pasteurii* cytochrome *c*<sub>553</sub> at 0.97-Å resolution, *Biochemistry* 39, 13115-13126.
  35. Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., and Varani, G. (1999) Mitochondrial cytochromes *c*: a comparative analysis, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 824-837.
  36. Bartalesi, I., Rosato, A., and Zhang, W. (2003) Hydrogen exchange in a bacterial cytochrome *c*: a fingerprint of the cytochrome *c* fold, *Biochemistry* 42, 10923-10930.
  37. Voet, D., and Voet, G. J. (2004) *Biochemistry third edition*, Wiley.
  38. Bushnell, G. W., Louie, G. V., and Brayer, G. D. (1990) High-resolution

- three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.* 214, 585-595.
39. Allen, J. W. A. (2011) Cytochrome *c* biogenesis in mitochondria - Systems III and V, *FEBS J.* 278, 4198-4216.
  40. de Vitry, C. (2011) Cytochrome *c* maturation system on the negative side of bioenergetic membranes: CCB or System IV, *FEBS J* 278, 4189-4197.
  41. Simon, J., and Hederstedt, L. (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis System II, *FEBS J.* 278, 4179-4188.
  42. Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D., and Ferguson, S. J. (2011) Cytochrome *c* biogenesis System I, *FEBS J* 278, 4170-4178.
  43. Beckman, D. L., Trawick, D. R., and Kranz, R. G. (1992) Bacterial cytochromes *c* biogenesis, *Genes Dev.* 6, 268-283.
  44. Thonymeyer, L., Ritz, D., and Hennecke, H. (1994) Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: A possible pathway begins to emerge, *Mol. Microbiol.* 12, 1-9.
  45. Ramseier, T. M., Winteler, H. V., and Hennecke, H. (1991) Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes, *J. Biol. Chem.* 266, 7793-7803.
  46. Sanders, C., Turkarslan, S., Lee, D. W., and Daldal, F. (2010) Cytochrome *c* biogenesis: the Ccm system, *Trends Microbiol.* 18, 266-274.
  47. ThonyMeyer, L., and Kunzler, P. (1997) Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome *c* depend on *sec* and *lep*, but not on the *ccm* gene products, *Eur J Biochem* 246, 794-799.
  48. Page, M. D., and Ferguson, S. J. (1997) *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulphide oxidoreductase required for *c*- and *aa*<sub>3</sub>-type cytochrome biogenesis; Evidence for a reductase role *in vivo*, *Mol. Microbiol.* 24, 977-990.
  49. Edeling, M. A., Guddat, L. W., Fabianek, R. A., Thony-Meyer, L., and Martin, J. L. (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 angstrom resolution: High-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment, *Structure* 10, 973-979.
  50. Verissimo, A. F., Yang, H. H., Wu, X. M., Sanders, C., and Daldal, F. (2011) CcmI subunit of CcmFHI heme ligation complex functions as an apocytochrome *c* chaperone during *c*-type cytochrome maturation, *J. Biol. Chem.* 286, 40452-40463.
  51. Di Silvio, E., Di Matteo, A., Malatesta, F., and Travaglini-Allocatelli, C. (2013)

- Recognition and binding of apocytochrome *c* to *P. aeruginosa* CcmI, a component of cytochrome *c* maturation machinery, *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1554-1561.
52. Keightley, J. A., Sanders, D., Todaro, T. R., Pastuszyn, A., and Fee, J. A. (1998) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cytochrome *c*<sub>552</sub> gene from *Thermus thermophilus* HB8 - Evidence for genetic linkage to an ATP-binding cassette protein and initial characterization of the *cycA* gene products, *J. Biol. Chem.* 273, 12006-12016.
  53. McRee, D. E., Williams, P. A., Sridhar, V., Pastuszyn, A., Bren, K. L., Patel, K. M., Chen, Y., Todaro, T. R., Sanders, D., Luna, E., and Fee, J. A. (2001) Recombinant cytochrome *rC*<sub>557</sub> obtained from *Escherichia coli* cells expressing a truncated *Thermus thermophilus cycA* gene: heme inversion in an improperly matured protein, *J. Biol. Chem.* 276, 6537-6544.
  54. Thöny-Meyer, L., Fischer, F., Kunzler, P., Ritz, D., and Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation, *J. Bacteriol* 177, 4321-4326.
  55. Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Crooke, H., and Cole, J. (1996) *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of *c*-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm, *Molecular Microbiology* 19, 467-481.
  56. Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Kunzler, P., and Thöny-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb*<sub>3</sub> oxidase in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 744-747.
  57. Fee, J. A., Chen, Y., Todaro, T. R., Bren, K. L., Patel, K. M., Hill, M. G., Gomez-Moran, E., Loehr, T. M., Ai, J. Y., Thöny-Meyer, L., Williams, P. A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D. E. (2000) Integrity of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> synthesized by *Escherichia coli* cells expressing the host-specific cytochrome *c* maturation genes, *ccmABCDEFGHIH*: Biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein, *Protein Sci.* 9, 2074-2084.
  58. Margoliash, E., and Lustgarten, J. (1962) Interconversion of horse heart cytochrome *c* monomer and polymers, *J. Biol. Chem* 237, 3397-3405.
  59. Hirota, S., Hattori, Y., Nagao, S., Taketa, M., Komori, H., Kamikubo, H., Wang, Z. H., Takahashi, I., Negi, S., Sugiura, Y., Kataoka, M., and Higuchi, Y. (2010) Cytochrome *c* polymerization by successive domain swapping at the C-terminal

- helix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12854-12859.
60. Wang, Z., Matsuo, T., Nagao, S., and Hirota, S. (2011) Peroxidase activity enhancement of horse cytochrome *c* by dimerization, *Org. Biomol. Chem.* 9, 4766-4769.
  61. Sanbongi, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1989) Amino acid sequence of cytochrome *c*-552 from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*, *J. Bacteriol.* 171, 65-69.
  62. Lopes, H., Besson, S., Moura, I., and Moura, J. J. G. (2001) Kinetics of inter- and intramolecular electron transfer of *Pseudomonas nautica* cytochrome *cd*<sub>1</sub> nitrite reductase: regulation of the NO-bound end product, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6, 55-62.
  63. Travaglini-Allocatelli, C., Gianni, S., Dubey, V. K., Borgia, A., Di Matteo, A., Bonivento, D., Cutruzzola, F., Bren, K. L., and Brunori, M. (2005) An obligatory intermediate in the folding pathway of cytochrome *c*<sub>552</sub> from *Hydrogenobacter thermophilus*, *J. Biol. Chem.* 280, 25729-25734.
  64. Hasegawa, J., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sambongi, Y., Yu, Y. H., Igarashi, Y., Kodama, T., Yamazaki, K., Kyogoku, Y., and Kobayashi, Y. (1998) Solution structure of thermostable cytochrome *c*<sub>552</sub> from *Hydrogenobacter thermophilus* determined by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, *Biochemistry* 37, 9641-9649.
  65. Sanbongi, Y., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1989) Thermostability of cytochrome *c*-552 from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*, *Biochemistry* 28, 9574-9578.
  66. Oikawa, K., Nakamura, S., Sonoyama, T., Ohshima, A., Kobayashi, Y., Takayama, S. J., Yamamoto, Y., Uchiyama, S., Hasegawa, J., and Sambongi, Y. (2005) Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>: reciprocal mutation analysis, *J. Biol. Chem.* 280, 5527-5532.
  67. Uchiyama, S., Ohshima, A., Nakamura, S., Hasegawa, J., Terui, N., Takayama, S. I. J., Yamamoto, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2004) Complete thermal-unfolding profiles of oxidized and reduced cytochromes *c*, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14684-14685.
  68. Uchiyama, S., Hasegawa, J., Tanimoto, Y., Moriguchi, H., Mizutani, M., Igarashi, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2002) Thermodynamic characterization of variants of mesophilic cytochrome *c* and its thermophilic counterpart, *Protein Eng.* 15, 455-461.
  69. Hasegawa, J., Uchiyama, S., Tanimoto, Y., Mizutani, M., Kobayashi, Y.,



- Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (2000) Selected mutations in a mesophilic cytochrome *c* confer the stability of a thermophilic counterpart, *J. Biol. Chem.* 275, 37824-37828.
70. Hasegawa, J., Shimahara, H., Mizutani, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Ferguson, S. J., Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (1999) Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>, *J. Biol. Chem.* 274, 37533-37537.
71. Ptitsyn, O. B. (1998) Protein folding and protein evolution: Common folding nucleus in different subfamilies of *c*-type cytochromes?, *J. Mol. Biol.* 278, 655-666.
72. Travaglini-Allocatelli, C., Gianni, S., and Brunori, M. (2004) A common folding mechanism in the cytochrome *c* family, *Trends Biochem. Sci.* 29, 535-541.
73. Russell, B. S., Melenkivitz, R., and Bren, K. L. (2000) NMR investigation of ferricytochrome *c* unfolding: Detection of an equilibrium unfolding intermediate and residual structure in the denatured state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8312-8317.
74. Hong, X. L., and Dixon, D. W. (1989) NMR-study of the alkaline isomerization of ferricytochrome *c*, *Febs Lett.* 246, 105-108.
75. Yamamoto, Y., Terui, N., Tachiiri, N., Minakawa, K., Matsuo, H., Kameda, T., Hasegawa, J., Sambongi, Y., Uchiyama, S., Kobayashi, Y., and Igarashi, Y. (2002) Influence of amino acid side chain packing on Fe-methionine coordination in thermostable cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11574-11575.
76. Bartalesi, L., Bertini, I., Ghosh, K., Rosato, A., and Turano, P. (2002) The unfolding of oxidized *c*-type cytochromes: The instructive case of *Bacillus pasteurii*, *J. Mol. Biol.* 321, 693-701.
77. Bai, Y. W., Sosnick, T. R., Mayne, L., and Englander, S. W. (1995) Protein-folding intermediates: native-state hydrogen-exchange, *Science* 269, 192-197.
78. Michel, L. V., and Bren, K. L. (2008) Submolecular unfolding units of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*-551, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 837-845.

## 第2章 エタノール処理によるシトクロム *c*<sub>552</sub> の多量体形成

### 2-1. 序論

1-2節で述べたように、ドメインスワッピングは、タンパク質分子が一部の構造領域を、同じタンパク質の別分子の対応する構造領域と交換し、高次構造体を形成する機構である。これまでに多くのタンパク質がドメインスワッピングによって多量化することが報告されている<sup>1-4</sup>。いくつかのヘムタンパク質もドメインスワッピングすることが報告されている<sup>5-8</sup>。連続的に起こるドメインスワッピングはセルピンのポリマー化や<sup>9,10</sup>、リボヌクレアーゼ A の線維形成（三次元ドメインスワッピングジッパー-背骨モデル）機構であると考えられている<sup>1,11</sup>。分子動力学シミュレーションより、ドメインスワッピングはヒト  $\gamma$ D-クリスタリンの多量化機構であると推定されている<sup>12</sup>。我々はウマ *cyt c* が C 末端  $\alpha$  ヘリックス領域でのドメインスワッピングにより多量化することを明らかにした<sup>13</sup>。ウマ *cyt c* 二量体では、ヘム鉄から Met80 が解離し、単量体よりも高いペルオキシダーゼ活性を示した<sup>13,14</sup>。しかし、しかし、1-6節に述べたようにミトコンドリア *cyt c* とバクテリア *cyt c* には構造的な違いがあり、*cyt c* ファミリータンパク質のドメインスワッピングという視点では理解が不十分である。また、単量体の安定性とドメインスワップ多量体の安定性の関係は詳細に調べられていない。そこで、構造と熱安定性の関係が知られている好熱性水素細菌由来 *cyt c*<sub>552</sub><sup>15-18</sup> (*cyt c*<sub>552</sub>) を用いて多量体の構造と安定性を調べた。本研究により、*cyt c*<sub>552</sub> 二量体はウマ *cyt c* 二量体とは異なり、ヘムを含む N 末端  $\alpha$  ヘリックス領域でのドメインスワッピングにより形成され、活性部位の Met の配位は保持されていた。*cyt c*<sub>552</sub> 二量体はウマ *cyt c* 二量体より高い熱安定性を示し、熱安定性の高いタンパク質のドメインスワップ多量体は安定であることがわかった。

## 2-2. 実験方法

### タンパク質精製と多量体形成

cyt *c*<sub>552</sub> の発現と精製は以前報告された方法に従って行った<sup>16, 17</sup>。酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> はフェリシアン化カリウム (Wako、日本) を添加後、DE52 カラム (Whatman) で精製することにより得た。

cyt *c*<sub>552</sub> 多量体を得るため、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた 200 μM 酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 単量体に 0–50 °C でエタノールを添加 (終濃度 80%) した。遠心分離後、沈殿を凍結乾燥し、残ったエタノールを取り除いた。得られた cyt *c*<sub>552</sub> 粉末を 4 °C の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた。Cyt *c*<sub>552</sub> 二量体を含んだ溶液を 80 °C で 1 時間加熱した後、FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10、Bio-rad) と Hiload 26/60 Superdex75 カラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより cyt *c*<sub>552</sub> 二量体を精製した。酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 単量体と二量体のモル吸光係数はピリジンヘモクロム法<sup>19</sup>により決定した。具体的に、100 mM NaOH と 20% (v/v) ピリジン存在下で、まず酸化型の cyt *c*<sub>552</sub> 単量体または二量体の吸収スペクトルを測定し、続いて少量のジチオナイトを加え還元型の吸収スペクトルを測定した。550 nm における還元型と酸化型の吸光度の差とそのモル吸光係数 ( $\epsilon_{550} = 21.84 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) を用いてタンパク質溶液中のヘム濃度を求め、求めたヘム濃度から 410 nm における酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 単量体と二量体それぞれのモル吸光係数を計算した。以後、タンパク質の濃度決定は 410 nm の吸光度と吸光係数を用いて行った。

エタノール処理により二量体から単量体が形成されるか調べるため、0.5 mL の 10 μM cyt *c*<sub>552</sub> 二量体溶液 (ヘム濃度、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) に 50 °C でエタノール 2 mL を加え、遠心分離により cyt *c*<sub>552</sub> の沈殿を得た。沈殿を凍結乾燥し、得られた cyt *c*<sub>552</sub> 粉末を 4 °C の 50 mM リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解させた。cyt *c*<sub>552</sub> 二量体の安定性を調べるため、100 μM のフェリシアン化カリウムを含む 10 μM cyt *c*<sub>552</sub> 二量体溶液 (ヘム濃度、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) を、60% (v/v) エタノール存在下では 36–43 °C、非存在下では 82.5–92 °C で加熱した。

エタノール存在下での cyt *c*<sub>552</sub> 二量体形成を調べるため、40 μM 酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 単量体 (10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) に 20 °C または 50 °C でエタノールを添加 (終濃度 60%) し、1 分間同じ温度でインキュベートした。インキュベート後の cyt *c*<sub>552</sub> 溶液を 4 °C の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 7 倍希釈し、ゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。

## ゲルろ過クロマトグラフィー分析

cyt *c*<sub>552</sub> 多量体を含んだ溶液を FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10) と Superdex75 10/300 GL カラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した[流速 0.5 mL/min、検出波長 410 nm、溶媒 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、温度 4 °C]。溶出曲線のピーク面積を Igor Pro 6.0 (WaveMetrics, Portland)を用いて求めることにより、多量体形成量を見積もった。

## 紫外可視吸収スペクトルおよび CD スペクトル測定

紫外可視吸収スペクトルは分光光度計 UV-2450 (Shimadzu) と光路長 1 cm の石英セルを用いて 20 °Cで行った。CD スペクトル測定には円偏光二色性分散計 J-725 (日本分光)を用いた。光路長 1 mm の石英セルを用い、室温で測定した。

## X 線結晶構造解析

精製した二量体溶液の緩衝液を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0)に置換し、二量体濃度を 18.4 mg/L に調製した。タンパク質溶液 1 μL と沈殿剤を 1 μL を混合し、蒸気拡散によるシッティングドロップ法により結晶化を行った。100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0)、800 mM 硫酸アンモニウム、45% (v/v) 2-メチル-2, 4-ペンタンジオールを沈殿剤に用いた条件で結晶が得られたため、SPRING-8 (ビームライン: BL38B1) にて X 線回折実験を行った。cyt *c*<sub>552</sub> 単量体の原子座標 (PDB code: 1YNR) を用い、分子置換法 (MOLREP) により cyt *c*<sub>552</sub> 二量体の初期構造を得た。構造精密化には REFMAC を用いた。COOT を用いて分子モデルの細かな修正や水分子の配置を行った。回折データと精密化の統計値を Table 2-1 に示す。

## 電気化学測定

サイクリックボルタンメトリー測定には ALS-612DN (BAS、日本) を使用した。金電極を作用電極、白金線と銀/塩化銀電極をそれぞれ対極電極と参照電極に使用した。得られた酸化還元電位は標準水素電極を参照した値に変換した。修飾金電極を作製するため、まず金電極表面を 0.05 μm アルミナ懸濁液を用いて研磨し、超純水でさらに洗浄した。さらに電気化学的酸化還元処理を施し電極表面を洗浄した<sup>20</sup>。洗浄した金電極を 1 mM 4-メルカプトピリジン (Wako、日本) を含んだ超純水に 30 秒間浸し、超純水で電極を洗った。測定にはヘム濃度 200 μM に調製し、真空ラインで脱気した cyt *c*<sub>552</sub> 単量体と二量体 (50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)) を用いた。測定は室温、スキャン速度: 50 mV/s、アルゴン雰囲気で行った。

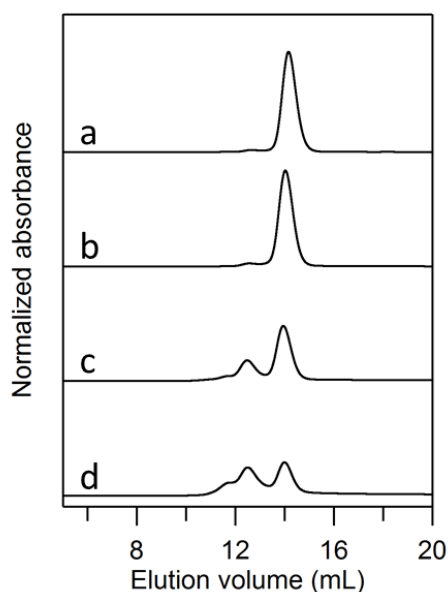
### 示差走査熱量測定

示差走査熱量測定 (DSC) は VP-DSC (MicroCal、GE Healthcare、セル容量 500  $\mu\text{L}$ ) を用いて行った。測定に用いたタンパク質溶液はヘム濃度 100  $\mu\text{M}$  に調製し (50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0))、測定はスキャン速度 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で行った。

## 2-3. 実験結果

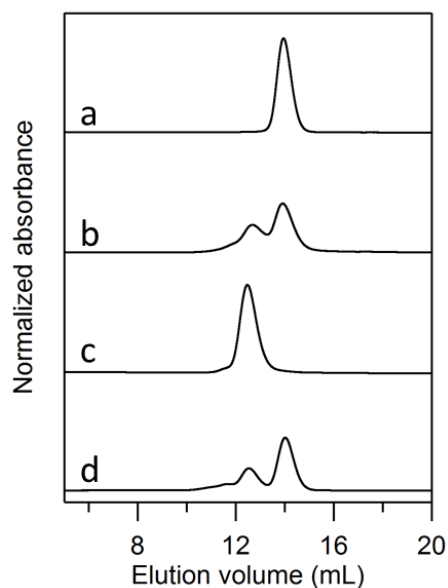
### 2-3-1. cyt *c*<sub>552</sub> の多量体形成

エタノール処理後の cyt *c*<sub>552</sub> をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析すると、溶出体積約 14 mL の位置に酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 単量体のピークが観測された (Figure 2-1)。また、単量体のピークに加え、酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 二量体、三量体のピークがそれぞれ約 12.5 mL および 11.6 mL に観測され、形成された多量体量はエタノール添加時の温度を 0 °C から 50 °C へ上げるに伴って増加した (Figure 2-1、溶出曲線 a-d)。



**Figure 2-1.** cyt *c*<sub>552</sub> 単量体にエタノール添加し得た沈殿を再溶解させた後のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線。(a) 0 °C、(b) 20 °C、(c) 35 °C、(d) 50 °C でエタノールを添加した。[カラム：Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液：50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速：0.5 mL/min、温度：4 °C、検出波長：410 nm]

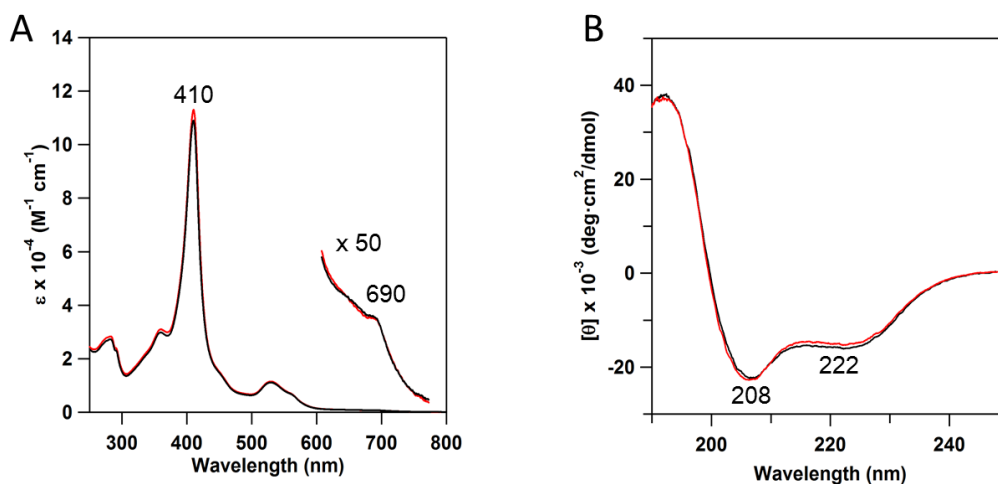
精製した酸化型 cyt *c*<sub>552</sub> 二量体および単量体 (それぞれヘム濃度 10 μM、50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0) に 50 °C で終濃度 80% (v/v) のエタノールを添加し、液体窒素で急速凍結した。試料を凍結乾燥させた後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた。再溶解後の試料を、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分析すると、単量体、二量体どちらから出発しても単量体～四量体が観測され (Figure 2-2)、多量体の形成比も両者の場合でよく一致した。この結果から、エタノールは単量体、二量体の双方の構造に影響を与え、多量体が形成することが分かった。



**Figure 2-2.** cyt  $c_{552}$  単量体を 80% (v/v)エタノールで処理する前 (a) と後 (b) および二量体を 80% (v/v)エタノールで処理する前 (c) と後 (d) のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線。[カラム：Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液：50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速：0.5 mL/min、温度：4 °C、検出波長：410 nm]

### 2-3-2. cyt $c_{552}$ 二量体の構造

cyt  $c_{552}$  二量体の Soret 帯の極大吸収波長は単量体の吸収スペクトルと同様、410 nm に観測された (Figure 2-3、A)。ピリジンヘモクロム法<sup>19</sup>より、cyt  $c_{552}$  二量体の 410 nm における吸光係数は、 $113,000 \pm 3,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ヘムユニット) と求めた。この値は同様に求めた単量体の 410 nm の吸光係数 ( $109,000 \pm 2,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) と近い値であった。また以前報告された酸化型 cyt  $c_{552}$  単量体のモル吸光係数 (409 nm、 $105,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) とも近い値であった<sup>21</sup>。cyt  $c_{552}$  の 690 nm の吸収帯はヘム鉄と Met59 の結合に由来すると報告されている<sup>22</sup>。690 nm の吸収強度も単量体と二量体でほとんど変わらなかったため (Figure 2-3、A)、ヘム鉄と Met59 の結合は二量体でも維持されていることが分かった。cyt  $c_{552}$  二量体の CD スペクトルは、208 nm と 222 nm に負の極大を示し、ピーク強度は単量体と類似していた (Figure 2-3、B)。これらの分光学的特徴は cyt  $c_{552}$  二量体が単量体と同様の活性部位構造と二次構造を有することを示唆している。



**Figure 2-3.** *cyt c*<sub>552</sub> 単量体と二量体の (A) 吸収スペクトルと (B) CD スペクトル。単量体と二量体のスペクトルをそれぞれ黒と赤で示す。

X線結晶構造解析により 2.0 Å の分解能で *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の構造を得た。結晶構造より、ウマ *cyt c* 二量体とは異なり<sup>13</sup>、*cyt c*<sub>552</sub> 二量体では、Ala18–Lys20 の位置が単量体での位置から大きくずれ、Asn1 から Lys17 までの N 末端 α ヘリックスとヘムを含む領域をプロトマー間で交換していることが分かった (Figure 2-4、A、B)。ヘム鉄にはヘムが属するプロトマーとは異なるプロトマー由来の Met59 が配位していた (Figure 2-4、C、D)。また、Met59 側鎖の末端メチル基配向が単量体と二量体で変化していた。二量体のヘム鉄–His14 結合とヘム鉄–Met59 結合の結合距離はそれぞれ 1.89 Å と 2.28 Å で、単量体 (ヘム鉄–His14、2.05–2.09 Å ; ヘム鉄–Met59、2.28 Å) と比較して結合距離は短くなっていた (Table 2-2)。

*cyt c*<sub>552</sub> 二量体結晶の非対称単位には 1 分子のプロトマーが存在した。単量体と二量体の構造を重ね合わせると、全体構造は良く一致した (Figure 2-5)。単量体 (非対称単位中に 4 分子の *cyt c*<sub>552</sub> が存在) と二量体プロトマーそれぞれの α 炭素について、ヒンジループ (Ala18–Lys20) を除いた N 末端領域 (Asn1–Lys17) と C 末端領域 (Val21–Lys80) の平均二乗偏差 (RMSD) をそれぞれ計算した。計算の結果、N 末端領域では 0.43–0.58 Å、C 末端領域では 0.32–0.41 Å と求まり、単量体と二量体の構造は N 末端領域と C 末端領域でそれぞれよく似た構造をもつことが分かった (Table 2-3)。

単量体中でのアミノ酸間の相互作用は、ほとんど二量体でも保たれていた。ヒンジループ (Ala18–Lys20) 周辺の水素結合 (重原子間距離 < 3.2 Å) の有無を調べたところ、単量体では Asp15(Oδ2)/Lys17(N)、Asp15(Oδ2)/Ala18(N)、



Lys19(N $\zeta$ )/Asp27(O $\delta$ 1)の原子間に水素結合が存在したが、二量体ではこれらの水素結合は壊れていた (Figure 2-6)。しかし、Asp15<sub>A</sub>(O $\delta$ 1)/Lys20<sub>B</sub>(N $\zeta$ ) (同様に Lys20<sub>A</sub>(N $\zeta$ )/ Asp15<sub>B</sub> (O $\delta$ 1)) に新しく水素結合が形成されていた (Figure 2-6)。これらの新しい水素結合は二量体構造を安定化していると考えられる。また、Met11(O)/Lys20(N $\zeta$ )と Leu16(O)/Ala26 (N)の水素結合は二量体でも保存されていたが、異なるプロトマー間で形成されていた (Figure 2-6)。Ala5、Met11、Tyr32、Tyr41、Ile76 のパッキングが *cyt c*<sub>552</sub> 単量体の熱安定性において重要である<sup>15-18</sup>。二量体において、これら5つのアミノ酸残基の位置は維持されており、Ala5、Met11が Tyr32、Tyr41、Ile76 とは異なるプロトマー由来であっても単量体同様の密なパッキングは保たれていた (Figure 2-7)。

**Table 2-1.** データ収集と構造精密化に用いた統計値

Data collection	
X-ray source	SPring-8 (BL38B1)
Wavelength (Å)	1.000
Space group	$P3_121$
Unit cell parameters	
$a, b, c$ (Å)	46.1, 46.1, 78.4
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 120
Resolution (Å)	50.0-2.00 (2.07-2.00)
Number of unique reflections	6916 (670)
$R_{\text{merge}}^a$	0.083 (0.859)
Completeness (%)	99.9
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	37.591 (3.0)
Redundancy	10.1 (10.0)
Refinement	
Resolution (Å)	40.0-2.00
Number of reflections	6526
$R_{\text{work}}^b$ (%)	0.2040
$R_{\text{free}}^b$ (%)	0.2635
Completeness (%)	99.2
Number of atoms in an asymmetric unit	
Protein	606
Water	32
Heme	43
Average $B$ factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	38.7
Water	45.2
Heme	27.8
Ramachandran plot (%)	
Favored	100.0
Allowed	0.0
Outlier	0.0

Statistics for the highest-resolution shell are given in parentheses.

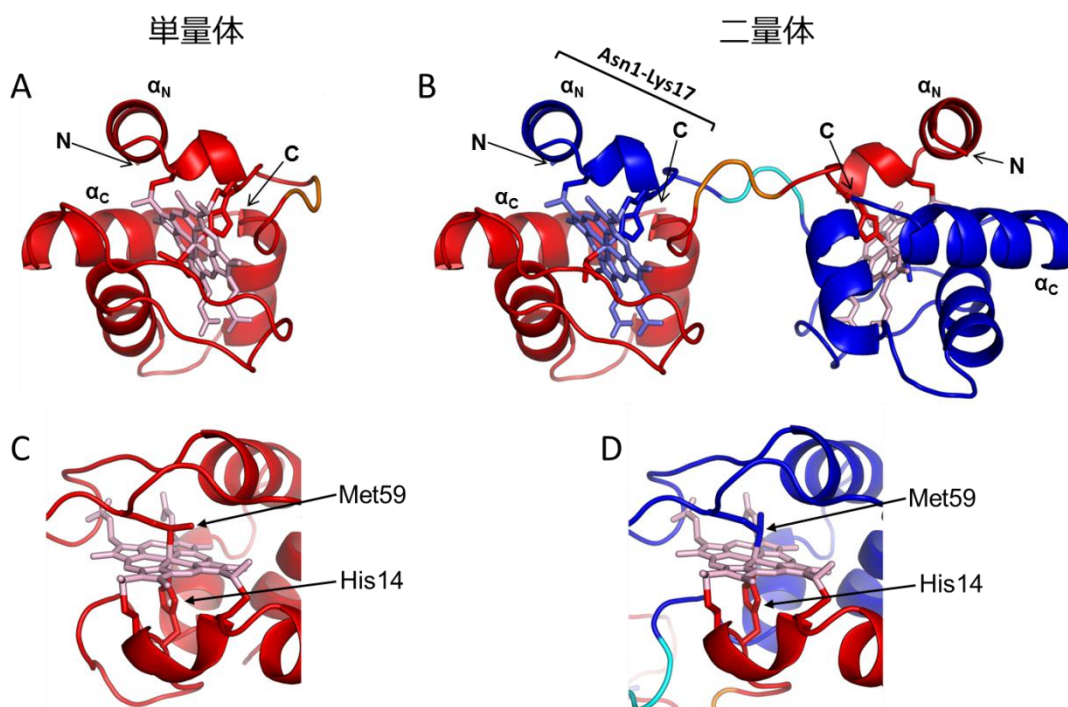
<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} |I - \langle I \rangle| / (\sum_{\text{hkl}} |I|)^{-1}$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| | / (\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|)^{-1}$ ,  $k$ : scaling factor.  $R_{\text{free}}$  was computed identically, except where all reflections belong to a test set of 10 % of randomly selected data.

**Table 2-2.** cyt *c*<sub>552</sub> 二量体と単量体のへム鉄–His14 結合とへム鉄–Met59 結合の結合距離

	Fe–His14 (Å)	Fe–Met59 (Å)
二量体	1.89	2.28
単量体 <sup>a</sup>	2.09	2.40
	2.05	2.33
	2.06	2.34
	2.05	2.33

<sup>a</sup>PDB: 1YNR。非対称単位に 4 つの分子を含む。



**Figure 2-4.** cyt *c*<sub>552</sub> 単量体 (PDB code: 1YNR) と二量体 (PDB code: 3VYM) のタンパク質構造と活性部位構造。cyt *c*<sub>552</sub> 単量体の (A) タンパク質構造、(C) 活性部位構造、および二量体の (B) タンパク質構造、(D) 活性部位構造。へムと His14、Met59 をスティックモデルで示す。二量体のプロトマーをそれぞれ赤と青で示す。ヒンジループ (Ala18–Lys20) をオレンジと水色で示す。N 末端、C 末端、N 末端  $\alpha$  ヘリックス、C 末端  $\alpha$  ヘリックスをそれぞれ N、C、 $\alpha_N$ 、 $\alpha_C$  で示す。

**Table 2-3.** 単量体<sup>a</sup>と二量体構造間の平均二乗偏差 (rmsd)

N 末端領域 <sup>b</sup> (Å)	C 末端領域 <sup>c</sup> (Å)
0.43–0.58	0.32–0.41

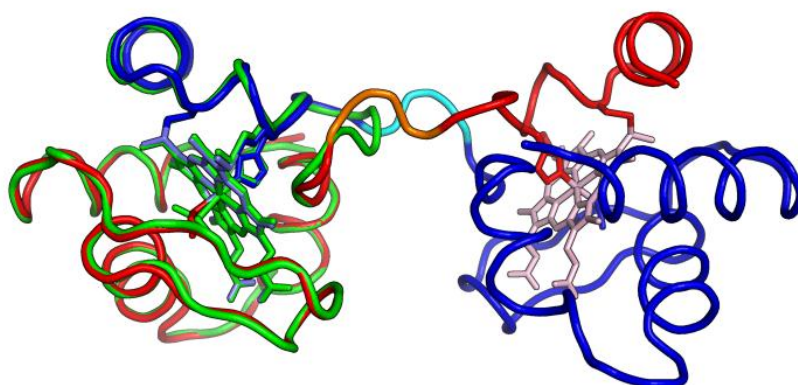
<sup>a</sup>PDB: 1YNR。非対称単位に 4 つの分子を含む。

<sup>b</sup>1–17 番目のアミノ酸残基。

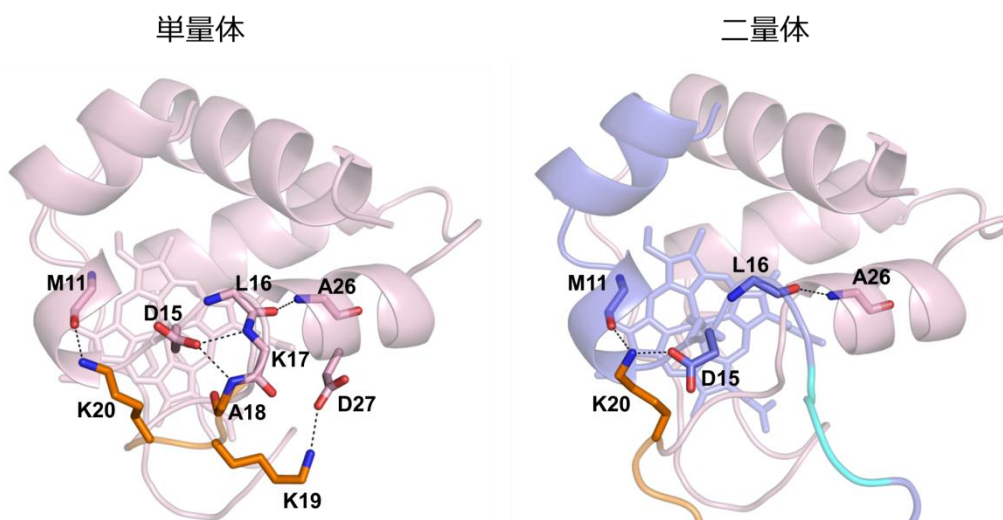
<sup>c</sup>21–80 番目のアミノ酸残基。

$$\text{rmsd} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n \delta_i^2}$$

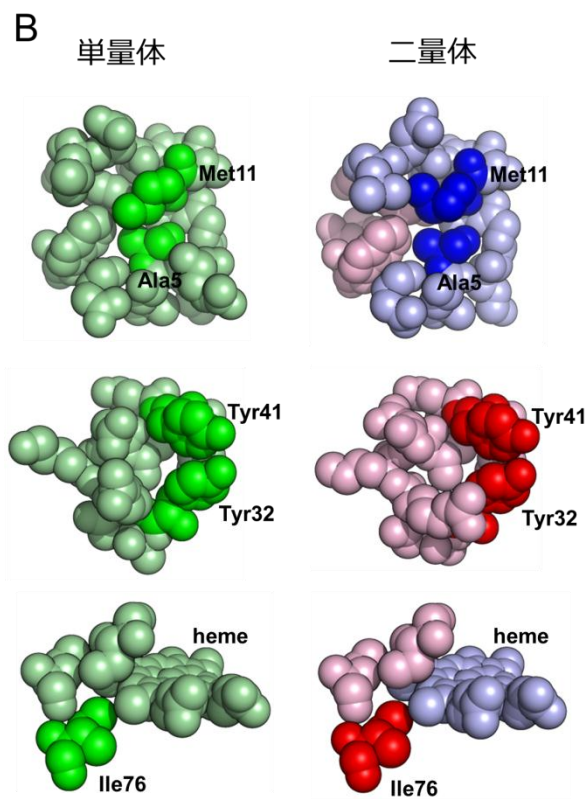
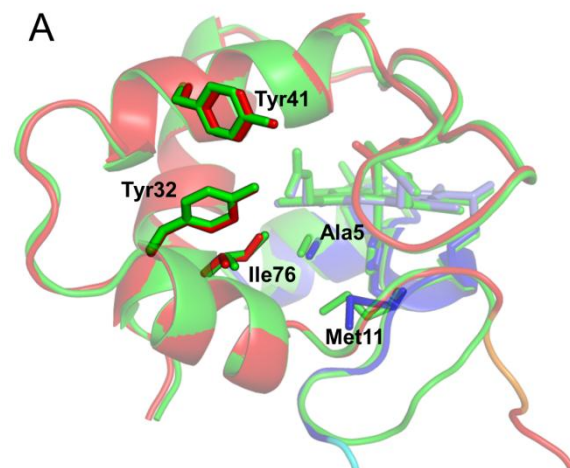
$\delta$  : 対応する 2 原子間の距離



**Figure 2-5.** cyt *c*<sub>552</sub> 単量体 (PDB code: 1YNR) と二量体 (PDB code: 3VYM) の主鎖構造の重ね合わせ。単量体を緑、二量体のプロトマーを赤と青で示す。



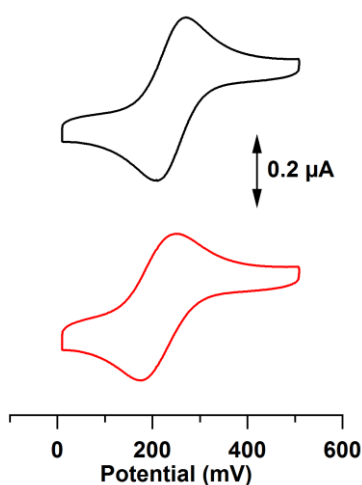
**Figure 2-6.** ヒンジループ (Ala18-Lys20) 周辺の水素結合 (重原子間距離 $< 3.2$  Å)。cyt  $c_{552}$  単量体 (Met11(O)/Lys20(N $\zeta$ )、Asp15(O $\delta$ 2)/Lys17(N)、Asp15(O $\delta$ 2)/Ala18(N)、Leu16(O)/Ala26(N)、Lys19(N $\zeta$ )/Asp27(O $\delta$ 1))。cyt  $c_{552}$  二量体 (Met11<sub>A</sub>(O)/Lys20<sub>B</sub>(N $\zeta$ )、Asp15<sub>A</sub>(O $\delta$ 1)/Lys20<sub>B</sub>(N $\zeta$ )、Leu16(O)<sub>A</sub>/Ala26<sub>B</sub>(N); Lys20<sub>A</sub>(N $\zeta$ )/Met11<sub>B</sub>(O)、Lys20<sub>A</sub>(N $\zeta$ )/Asp15<sub>B</sub>(O $\delta$ 1)、Ala26<sub>A</sub>(N)/Leu16(O)<sub>B</sub>)。A と B はそれぞれ二量体のプロトマーを表す。二量体中の 2 つのプロトマーを薄い赤と青で示す。Ala20-Lys20 をオレンジと水色で示す。黒破線は水素結合を示す。



**Figure 2-7.** *cyt c<sub>552</sub>* 単量体と二量体の構造。(A) タンパク質構造をリボンモデルで示し、熱安定性に寄与するアミノ酸残基 (Ala5、Met11、Tyr32、Tyr41、Ile76) の側鎖をスティックモデルで示す。(B) 熱安定性に寄与するアミノ酸残基周辺の構造を空間充填モデルで示す。単量体を緑、二量体のプロトマーをそれぞれ赤と青で示す。

### 2-3-3. 酸化還元電位

サイクリックボルタモグラム (Figure 2-8) より求めた cyt  $c_{552}$  二量体の酸化還元電位は  $213 \pm 2$  mV で、同様に求めた単量体の酸化還元電位  $240 \pm 2$  mV よりやや低い値を示した。原因として、ヘム鉄-His14 結合とヘム鉄-Met59 結合の距離が短くなり電子供与性が高まったことや、二量化に伴う溶媒の活性部位への近づきやすさなどが変化したことなどが考えられる<sup>23,24</sup>。しかし、単量体と二量体の酸化還元電位の差は小さく、二量体は単量体と同様の活性部位構造をもつため、依然として高い酸化還元電位を示した。



**Figure 2-8.** cyt  $c_{552}$  単量体 (黒) と二量体 (赤) のサイクリックボルタモグラム。スキャン速度：50 mV/s、温度：室温。

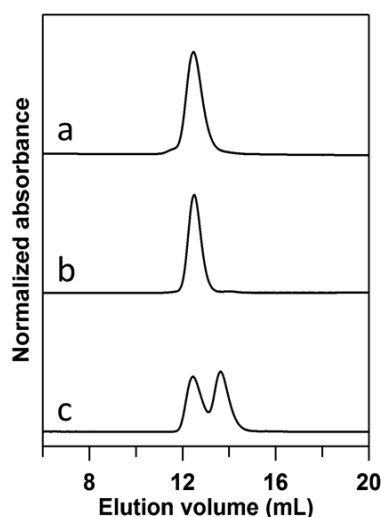
### 2-3-4. cyt $c_{552}$ の熱安定性と熱力学的特性

酸化型ウマ cyt  $c$  二量体を  $70$  °C で 5 分間インキュベートすると単量体へ解離するが<sup>13</sup>、酸化型 cyt  $c_{552}$  二量体は同様の条件で単量体へ解離しなかった (Figure 2-9、溶出曲線 b)。 $90$  °C で 5 分間インキュベートしても約半分しか cyt  $c_{552}$  二量体は単量体へ解離しなかった (Figure 2-9、溶出曲線 c)。これらの結果より、単量体で高い熱安定性を示す cyt  $c_{552}$  二量体はウマ cyt  $c$  二量体より高い熱安定性を持つことが分かった。

酸化型 cyt  $c_{552}$  二量体が単量体へ解離する際の活性化エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ ) と活性化エントロピー ( $\Delta S^\ddagger$ ) を求めるため、温度の逆数に対して  $\ln(k/T)$  をプロットし、アイリングプロットをおこなった (Figure 2-10)。直線の傾きより  $\Delta H^\ddagger$ 、Y 切片より  $\Delta S^\ddagger$  の値を計算した。計算の結果、エタノール非存在下では  $\Delta H^\ddagger = 140 \pm 9$  kcal mol<sup>-1</sup>、 $\Delta S^\ddagger = 310 \pm 30$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>、60% (v/v) エタノール存在下では  $\Delta H^\ddagger$

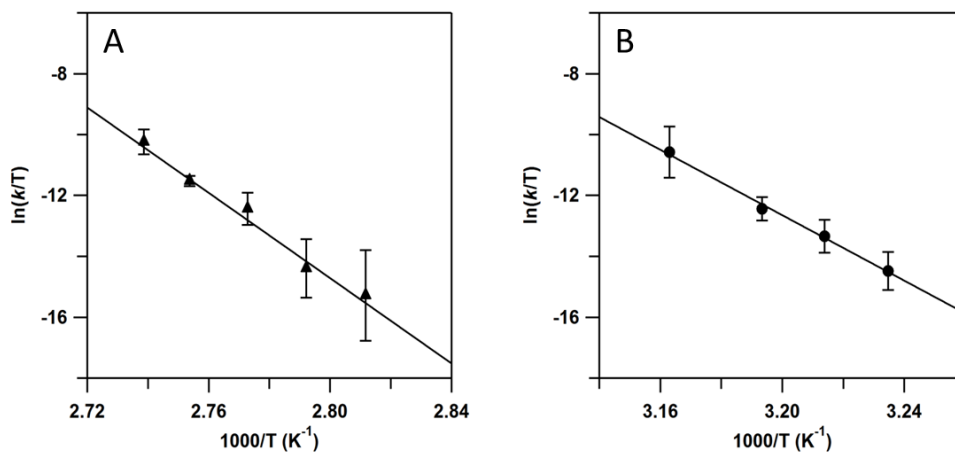
$=110 \pm 5 \text{ kcal mol}^{-1}$ 、 $\Delta S^\ddagger = 270 \pm 20 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と求まった。求めた値を用いて  $43 \text{ }^\circ\text{C}$ における活性化ギブズエネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ ) を計算すると、エタノール非存在下で  $\Delta G^\ddagger = 42 \text{ kcal mol}^{-1}$ 、60% (v/v)エタノール存在下で  $\Delta G^\ddagger = 25 \text{ kcal mol}^{-1}$ と求まった。

より詳細に *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の熱力学的特性を明らかにするために酸化型 *cyt c*<sub>552</sub> 単量体と酸化型 *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の DSC 測定を行った (Figure 2-11)。二量体の熱容量曲線では、 $92.3 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ にピークが観測された (Figure 2-11、赤線)。二量体を  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ まで DSC 測定を行った後、試料をゲルろ過クロマトグラフィーで分析すると、ほとんどが単量体として観測されたため、このピークは二量体の解離に由来するものであることが分かった。また単量体の DSC 測定では、 $90\text{--}95 \text{ }^\circ\text{C}$ の範囲にはピークは観測されなかった (Figure 2-11、黒線)。DSC 曲線のピーク面積は二量体から単量体へ解離する際のエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) を表している。解離に伴う  $\Delta H$  は  $14 \pm 2 \text{ kcal/mol}$  と正の値を示したため、二量体は単量体よりもエンタルピー的に有利な状態であることが分かった。

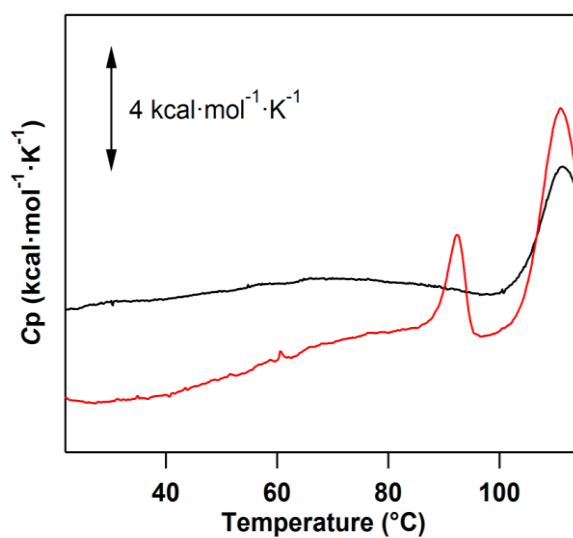


**Figure 2-9.** *cyt c*<sub>552</sub> 二量体 (a) を  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  (b) または  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  (c) でインキュベートした後のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線。[カラム：Superdex 75 10/300 GL、緩衝液：50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速：0.5 mL/min、温度： $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、検出波長：410 nm]





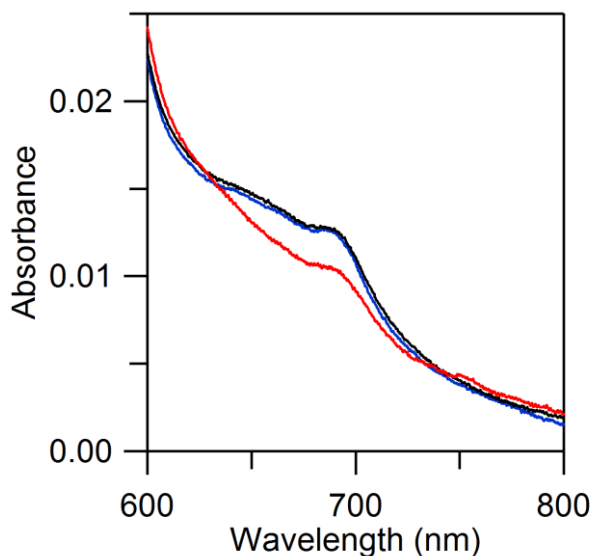
**Figure 2-10.** (A) エタノール非存在下および (B) 60% (v/v)エタノール存在下における *cyt c<sub>552</sub>* 二量体解離時の  $\ln(k/T)$  vs. 温度の逆数プロット。直線は最少二乗法でフィッティングすることを得た。試料濃度  $10 \mu\text{M}$  (へム濃度)、緩衝液:  $50 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0)、温度 (A)  $82.5\text{--}92 \text{ }^\circ\text{C}$ 、(B)  $36\text{--}43 \text{ }^\circ\text{C}$ 。



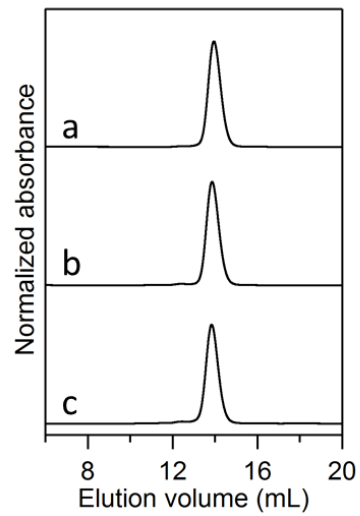
**Figure 2-11.** 酸化型 *cyt c<sub>552</sub>* 単量体 (黒線) と二量体 (赤線) の DSC 曲線。試料濃度:  $100 \mu\text{M}$  (へム濃度)、緩衝液:  $50 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0)、スキャン速度:  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 、セル容量:  $500 \mu\text{L}$ 。

### 2-3-5. エタノールが *cyt c*<sub>552</sub> 構造に与える影響

*cyt c*<sub>552</sub> はエタノール処理により多量体を形成し (Figure 2-1)、エタノール存在下では二量体の解離が促進された (Figure 2-2、2-10)。そこで、エタノールが *cyt c*<sub>552</sub> 構造に及ぼす影響を調べた。20 °C で 60% (v/v) エタノール存在下または 50 °C でエタノール非存在下では、690 nm の吸光度は変化しなかった (Figure 2-12)。しかし 50 °C において 60% (v/v) エタノール存在下では、690 nm の吸光度は減少した (Figure 2-12)。これらの結果は、20 °C よりも 50 °C でエタノールを加えた方がより鉄–Met 結合が摂動を受けることを示している。実際、高い温度でエタノールを添加した場合の方が多く多量体が形成された (Figure 2-1)。しかし、*cyt c*<sub>552</sub> の 60% (v/v) エタノール溶液からは多量体は検出されなかった (Figure 2-13)。



**Figure 2-12.** エタノール存在下および非存在下での *cyt c*<sub>552</sub> の吸収スペクトル。エタノール非存在下 (黒線)、60% (v/v) エタノール存在下 20°C (青線)、および 50°C (赤線) での *cyt c*<sub>552</sub> の吸収スペクトル。

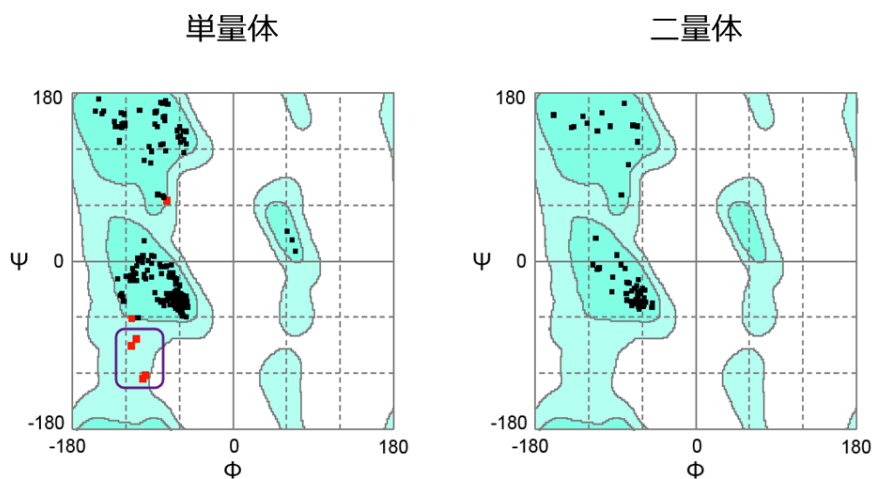


**Figure 2-13.** cyt  $c_{552}$  単量体 (a) に 60% (v/v) エタノールを 20 °C (b) または 50 °C (c) で 60% (v/v) エタノールを加えた時のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線。  
[カラム : Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速 : 0.5 mL/min、温度 : 4 °C、検出波長 : 410 nm]

## 2-4. 考察

cyt *c*<sub>552</sub> 二量体の活性部位では、Met59 はヘム鉄に配位していたが、ヘムが属するプロトマーとは異なるプロトマー由来の Met59 が配位していた (Figure 2-4)。ヘムのリガンド交換はセラチア菌由来ヘム獲得タンパク質 HasA 二量体においても観測されている<sup>7</sup>。ドメインスワッピングは同一タンパク質の異なる分子同士でヘムのリガンドを交換するための機構であるかもしれない。cyt *c*<sub>552</sub> 二量体は単量体と同様、高い酸化還元電位を維持していた (Figure 2-8)。ドメインスワッピングにより形成されたミオグロビン二量体は、単量体と同様の活性部位構造と酸素親和性を有していた<sup>8</sup>。これらの結果より、ドメインスワッピングは単量体の機能を保ったまま多量体タンパク質をデザインするのに有用であると期待される。

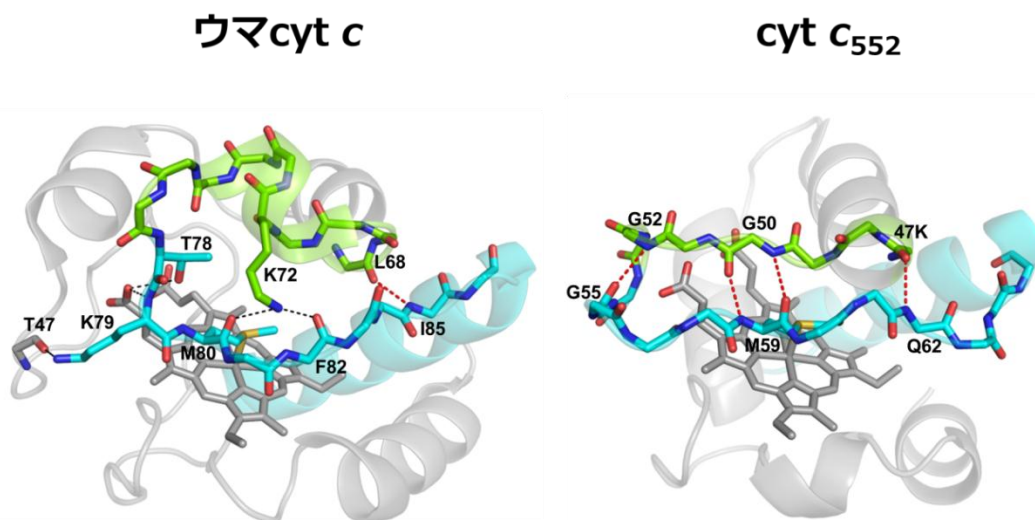
ウマ cyt *c* 二量体、三量体では C 末端領域が交換されていたが<sup>13</sup>、cyt *c*<sub>552</sub> 二量体では N 末端領域が交換されていた (Figure 2-4)。ラマチャンドランプロット<sup>25</sup>では、cyt *c*<sub>552</sub> 単量体の Lys20 部分の主鎖の二面角の組み合わせは allowed 領域に位置していたのに対し、二量体では Favored 領域に位置していた (Figure 2-14)。ヒンジループ (Ala18-Lys20) の部分が Lys20 部分の歪を無くすように構造変化したためであると考えられる。



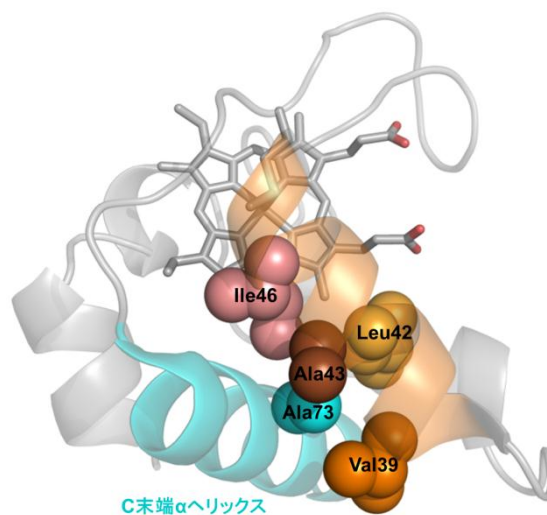
**Figure 2-14.** cyt *c*<sub>552</sub> 単量体 (PDB code : 1YNR) と二量体 (PDB code : 3VYM) ラマチャンドランプロット。プロットの作製には RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) を用いた。1YNR は非対称単位に 4 つの分子を含む。単量体の Lys20 は紫の線で囲った範囲内にある点である。

ウマ cyt *c* はエタノール処理により、C 末端領域を交換し多量体を形成した<sup>13</sup>。cyt *c* の Met80 周辺の構造は、ベンジルアルコールや *m*-クレゾールの添加によって崩れ、凝集の引き金となる「ホットスポット」であると報告されている<sup>26,27</sup>。ウマ cyt *c* 単量体の Thr78–Lys87 間のループ領域では、広範囲に渡って ( Leu68(O)/Ile85(N) 、 Lys72(Nζ)/Met80(O) 、 Lys72(Nζ)/Phe82(O) 、 Thr78(Oγ)/Hem(O2D)、Lys79(N)/Hem(O2D)、Lys79(Nζ)/Thr47(O)) 水素結合 (重原子間距離 < 3.2 Å) が形成されていた (Figure 2-15)。一方、cyt *c*<sub>552</sub> 単量体の対応する領域 (Trp54–Thr65) は、主鎖原子間の水素結合 (Lys47(O)/Gln62(N)、Gly50(N)/Met59(O)、Gly50(O)/Met59(N)、Gly52(N)/Gly55(O)) により β シート様の比較的強固な構造を形成していた (Figure 2-15)。実際、アポ cyt *c*<sub>552</sub> の分子動力学シミュレーションによると、Gly50 と Met59 の間で短い β シートが形成されると報告されている<sup>28</sup>。加えて、cyt *c*<sub>552</sub> では C 末端 α ヘリックス中の Ala73 と、隣り合う α ヘリックス (Ala38–Lys48) の Val39、Leu42、Ala43、Ile46 との間に疎水性相互作用が存在するが (Figure 2-16)、ウマ cyt *c* では同様の相互作用は見られなかった。このような理由により、cyt *c*<sub>552</sub> では C 末端 α ヘリックスが交換されなかったと考えられる。

NMR 測定を用いた水素/重水素交換実験により、ウマ cyt *c* の Met80 を含んだループ領域はウマ cyt *c* の構造中で最も安定性が低く、折れたたみ過程では最後に構造が形成されると報告されている<sup>29,30</sup>。一方、同様に水素/重水素交換実験により、cyt *c*<sub>552</sub> と同じ主鎖構造を持つ緑膿菌 cyt *c*<sub>551</sub> (Figure 1-12) では、1 番目のループから 2 番目の α ヘリックスまたがる領域が構造的に不安定であると報告されている<sup>31</sup>。この領域は cyt *c*<sub>552</sub> 二量体構造のヒンジループに相当する。このようにスワップ領域とタンパク質の部分的な構造安定性には関連があると考えられる。



**Figure 2-15.** ウマ cyt *c* (PDB code: 1HRC) と cyt *c*<sub>552</sub> (PDB code: 1YNR) の C 末端  $\alpha$  ヘリックス手前のループ領域における水素結合ネットワーク。軸配位子の Met を含むループを黄緑と水色のスティックモデルで示す。C 末端  $\alpha$  ヘリックスを水色で示す。ヘムは灰色のスティックモデルで示す。主鎖原子間の水素結合とそれ以外の水素結合をそれぞれ赤破線、黒破線で示す。窒素原子、酸素原子、硫黄原子をそれぞれ青、赤、黄で示す。



**Figure 2-16.** C 末端  $\alpha$  ヘリックス (水色) 中の Ala73 と、隣り合う  $\alpha$  ヘリックス (Ala38–Lys48) (オレンジ) の Val39、Leu42、Ala43、Ile46 との間に疎水性相互作用。Ala73、Val39、Leu42、Ala43、Ile46 をそれぞれ水色、暗橙色、茶色、ピンクの空間充填モデルで示す。

ウマ *cyt c* では高次多量体が観測されたが、*cyt c<sub>552</sub>* では 5 量体までしか観測されなかった。X 線小角散乱測定より、ウマ *cyt c* の多量体は溶液中で鎖状に伸びた構造をとっていると報告されている<sup>13</sup>。一方、*cyt c<sub>552</sub>* 二量体の活性部位では、結晶構造中と溶液中で共にヘム鉄-Met 結合は維持されていた (Figure 2-3、Figure 2-4)。これらの結果は *cyt c<sub>552</sub>* 二量体が溶液中で閉環構造をとっていることを示している。ウマ *cyt c* 多量体では末端分子の C 末端  $\alpha$  ヘリックスが解離し、連続的にドメインスワッピングが起こるため、高次多量体が形成されるが、*cyt c<sub>552</sub>* 多量体は閉環構造をとるため連続的なドメインスワッピングが起こりにくく、高次多量体が形成されなかったと考えられる。また、*cyt c<sub>552</sub>* のヒンジループは僅か 3 残基 (Ala18-Lys19) であるのに対して、ウマ *cyt c* のヒンジループは比較的長く 10 残基 (Thr78-Lys87) であった。*cyt c<sub>552</sub>* の場合、ヒンジループが短いため、ウマ *cyt c* の場合に比べて交換領域での立体障害が大きくなり、結果として高次多量体形成が妨げられたと考えられる。

酸化型ウマ *cyt c* 二量体を 70 °C で 5 分間インキュベートすると単量体へ解離するが<sup>13</sup>、酸化型 *cyt c<sub>552</sub>* 二量体は同様の条件で単量体へ解離しなかった (Figure 2-9)。これらの結果は *cyt c<sub>552</sub>* 二量体がウマ *cyt c* 二量体より高い熱安定性をもつことを示している。疎水性相互作用による Ala5、Met11、Tyr32、Tyr41、Ile76 周辺の密なパッキングが *cyt c<sub>552</sub>* 単量体の熱安定性において重要であると報告されており<sup>15-18</sup>、これら 5 つのアミノ酸残基の側鎖のパッキングは二量体でも維持されていた (Figure 2-7)。これらの結果より、*cyt c<sub>552</sub>* 二量体は単量体同様の密なアミノ酸側鎖のパッキングにより安定化されていると解釈した。

Stefin A、p13suc1 および cyanovirin-N のドメインスワッピングによる多量化では高い  $\Delta H^\ddagger$  が観測され、ドメインスワッピングは完全な変性状態を経て起こると示唆されている<sup>32-34</sup>。また、リボヌクレアーゼ A は部分変性状態から巻き戻る際に多量化し<sup>35</sup>、N 末端領域を交換した二量体と C 末端領域を交換した二量体の量はリボヌクレアーゼ A の変性状態に依存すると報告されている<sup>36</sup>。*cyt c<sub>552</sub>* 二量体が単量体へ解離する際の  $\Delta H^\ddagger$  と  $\Delta S^\ddagger$  (Figure 2-10A) より *cyt c<sub>552</sub>* 二量体の解離温度 (92.3 °C) における  $\Delta G^\ddagger$  を計算すると約 27 kcal mol<sup>-1</sup> であった。酸化型 *cyt c<sub>552</sub>* の天然状態と変性状態のエネルギー差 ( $\Delta G$ ) は約 20 kcal mol<sup>-1</sup> と報告されており<sup>37</sup>、*cyt c<sub>552</sub>* 二量体は完全変性状態を経て単量体へ解離している可能性がある。DSC 測定では、*cyt c<sub>552</sub>* 二量体が単量体へ解離する際の  $\Delta H$  は正の値であったが、ウマ *cyt c* 二量体が単量体へ解離する際の  $\Delta H$  は負であると報告されている<sup>13</sup>。*cyt c<sub>552</sub>* 二量体では、ヘム鉄と His、Met の強い配位結合や (Table 2-2)、Lys20 部分の歪が除かれていた (Figure 2-14) ことなどにより  $\Delta H$  は正の値を示したと推測される。これらの結果より、同じタンパク質ファミリーに属する分子でもドメインスワッピングの特性がことなることが分かった。

cyt *c*<sub>552</sub> 二量体の結晶構造 (Figure 2-4) より、ヘム鉄-Met 結合の開裂はドメインスワッピング構造の形成に必須であると考えられる。エタノール添加により、二量体の解離における  $\Delta G^\ddagger$  は減少した (Figure 2-10)。 $\Delta G^\ddagger$  の減少は、エタノール存在下で温度を上昇させるとヘム鉄-Met 結合の開裂が観測された (Figure 2-12) ように、エタノールによって疎水性相互作用が弱くなり cyt *c*<sub>552</sub> が変性し易くなったことに起因すると考えられる。



## 2-5. 結論

cyt *c*<sub>552</sub> はエタノール処理によりドメインスワップ二量体を形成した。しかし、ウマ cyt *c* 二量体では C 末端領域が交換されていたのに対して、cyt *c*<sub>552</sub> 二量体ではヘムを含む N 末端領域が交換されていた。ウマ cyt *c* と cyt *c*<sub>552</sub> の比較よりスワップ領域はタンパク質の部分的な安定性に関連することが示唆された。cyt *c*<sub>552</sub> 二量体は単量体同様の密なアミノ酸側鎖パッキングを維持し高い熱安定性を示した（解離温度：92 °C）。エタノールは cyt *c*<sub>552</sub> の構造変化を誘起し、活性化エネルギーを減少させることで cyt *c* の多量体形成を促進することが示唆された。

## 参考文献

1. Bennett, M. J., Sawaya, M. R., and Eisenberg, D. (2006) Deposition diseases and 3D domain swapping, *Structure* 14, 811-824.
2. Newcomer, M. E. (2002) Protein folding and three-dimensional domain swapping: a strained relationship?, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 48-53.
3. Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., and Itzhaki, L. S. (2003) The unfolding story of three-dimensional domain swapping, *Structure* 11, 243-251.
4. Gronenborn, A. M. (2009) Protein acrobatics in pairs - dimerization via domain swapping, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 39-49.
5. Nurizzo, D., Silvestrini, M. C., Mathieu, M., Cutruzzola, F., Bourgeois, D., Fulop, V., Hajdu, J., Brunori, M., Tegoni, M., and Cambillau, C. (1997) N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Structure* 5, 1157-1171.
6. Crane, B. R., Rosenfeld, R. J., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Ghosh, S., Tainer, J. A., Stuehr, D. J., and Getzoff, E. D. (1999) N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization, *EMBO J.* 18, 6271-6281.
7. Czjzek, M., Letoffe, S., Wandersman, C., Delepierre, M., Lecroisey, A., and Izadi-Pruneyre, N. (2007) The crystal structure of the secreted dimeric form of the hemophore HasA reveals a domain swapping with an exchanged heme ligand, *J. Mol. Biol.* 365, 1176-1186.
8. Nagao, S., Osuka, H., Yamada, T., Uni, T., Shomura, Y., Imai, K., Higuchi, Y., and Hirota, S. (2012) Structural and oxygen binding properties of dimeric horse myoglobin, *Dalton Trans.* 41, 11378-11385.
9. Yamasaki, M., Li, W., Johnson, D. J. D., and Huntington, J. A. (2008) Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization, *Nature* 455, 1255-1258.
10. Yamasaki, M., Sendall, T. J., Pearce, M. C., Whisstock, J. C., and Huntington, J. A. (2011) Molecular basis of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer, *EMBO Rep.* 12, 1011-1017.
11. Sambashivan, S., Liu, Y. S., Sawaya, M. R., Gingery, M., and Eisenberg, D. (2005) Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure, *Nature* 437, 266-269.
12. Das, P., King, J. A., and Zhou, R. (2011) Aggregation of  $\gamma$ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal  $\beta$ -strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10514-10519.

13. Hirota, S., Hattori, Y., Nagao, S., Taketa, M., Komori, H., Kamikubo, H., Wang, Z. H., Takahashi, I., Negi, S., Sugiura, Y., Kataoka, M., and Higuchi, Y. (2010) Cytochrome *c* polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 12854-12859.
14. Wang, Z., Matsuo, T., Nagao, S., and Hirota, S. (2011) Peroxidase activity enhancement of horse cytochrome *c* by dimerization, *Org. Biomol. Chem.* *9*, 4766-4769.
15. Oikawa, K., Nakamura, S., Sonoyama, T., Ohshima, A., Kobayashi, Y., Takayama, S. J., Yamamoto, Y., Uchiyama, S., Hasegawa, J., and Sambongi, Y. (2005) Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>: reciprocal mutation analysis, *J. Biol. Chem.* *280*, 5527-5532.
16. Hasegawa, J., Uchiyama, S., Tanimoto, Y., Mizutani, M., Kobayashi, Y., Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (2000) Selected mutations in a mesophilic cytochrome *c* confer the stability of a thermophilic counterpart, *J. Biol. Chem.* *275*, 37824-37828.
17. Hasegawa, J., Shimahara, H., Mizutani, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Ferguson, S. J., Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (1999) Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>, *J. Biol. Chem.* *274*, 37533-37537.
18. Uchiyama, S., Hasegawa, J., Tanimoto, Y., Moriguchi, H., Mizutani, M., Igarashi, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2002) Thermodynamic characterization of variants of mesophilic cytochrome *c* and its thermophilic counterpart, *Protein Eng.* *15*, 455-461.
19. Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra, *Anal. Biochem.* *161*, 1-15.
20. Battistuzzi, G., Borsari, M., Sola, M., and Francia, F. (1997) Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochromes *c*, *Biochemistry* *36*, 16247-16258.
21. Wen, X., and Bren, K. L. (2005) Suppression of axial methionine fluxion in *Hydrogenobacter thermophilus* Gln64Asn cytochrome *c*<sub>552</sub>, *Biochemistry* *44*, 5225-5233.
22. Karan, E. F., Russell, B. S., and Bren, K. L. (2002) Characterization of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochromes *c*<sub>552</sub> expressed in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*, *J. Biol. Inorg. Chem.* *7*, 260-272.

23. Tezcan, F. A., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (1998) Effects of ligation and folding on reduction potentials of heme proteins, *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 13383-13388.
24. Moore, G. R., Pettigrew, G. W., and Rogers, N. K. (1986) Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 4998-4999.
25. Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., 3rd de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2003) Structure validation by  $C\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and  $C\beta$  deviation, *Proteins* *50*, 437-450.
26. Singh, S. M., Cabello-Villegas, J., Hutchings, R. L., and Mallela, K. M. G. (2010) Role of partial protein unfolding in alcohol-induced protein aggregation, *Proteins* *78*, 2625-2637.
27. Singh, S. M., Hutchings, R. L., and Mallela, K. M. G. (2011) Mechanisms of *m*-cresol-induced protein aggregation studied using a model protein cytochrome *c*, *J. Pharm. Sci.* *100*, 1679-1689.
28. Smith, L. J., Davies, R. J., and van Gunsteren, W. F. (2006) Molecular dynamics simulations of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>: comparisons of the wild-type protein, a *b*-type variant, and the apo state, *Proteins* *65*, 702-711.
29. Bai, Y. W., Sosnick, T. R., Mayne, L., and Englander, S. W. (1995) Protein-folding intermediates: native-state hydrogen-exchange, *Science* *269*, 192-197.
30. Maity, H., Maity, M., and Englander, S. W. (2004) How cytochrome *c* folds, and why: Submolecular foldon units and their stepwise sequential stabilization, *J. Mol. Biol.* *343*, 223-233.
31. Michel, L. V., and Bren, K. L. (2008) Submolecular unfolding units of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*-551, *J. Biol. Inorg. Chem.* *13*, 837-845.
32. Jerala, R., and Zerovnik, E. (1999) Accessing the global minimum conformation of stefin A dimer by annealing under partially denaturing conditions, *J. Mol. Biol.* *291*, 1079-1089.
33. Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., Wilkinson, H. R., and Itzhaki, L. S. (2001) Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 5596-5601.
34. Liu, L., Byeon, I.-J. L., Bahar, I., and Gronenborn, A. M. (2012) Domain swapping proceeds via complete unfolding: a <sup>19</sup>F- and <sup>1</sup>H-NMR Study of the Cyanovirin-N protein, *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 4229-4235.

35. Lopez-Alonso, J. P., Bruix, M., Font, J., Ribo, M., Vilanova, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C., and Laurents, D. V. (2010) NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: Implications for oligomer formation by 3D domain swapping, *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 1621-1630.
36. Gotte, G., Vottariello, F., and Libonati, M. (2003) Thermal aggregation of ribonuclease A. A contribution to the understanding of the role of 3D domain swapping in protein aggregation, *J. Biol. Chem.* *278*, 10763-10769.
37. Uchiyama, S., Ohshima, A., Nakamura, S., Hasegawa, J., Terui, N., Takayama, S. I. J., Yamamoto, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2004) Complete thermal-unfolding profiles of oxidized and reduced cytochromes *c*, *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 14684-14685.

## 第3章 大腸菌発現系におけるシトクロム *c*<sub>552</sub> の多量体形成

### 3-1. 序論

ウマシトクロム *c* (cyt *c*) はエタノール処理によりC末端 $\alpha$ ヘリックスのドメインスワッピングにより多量体を形成すると報告されている<sup>1</sup>。また、ウマcyt *c* はGdnHClによる変性状態から巻き戻すとC末端領域のドメインスワッピングにより二量体を形成し、cyt *c*の折れたたみ初期過程で起こるN末端 $\alpha$ ヘリックスとC末端 $\alpha$ ヘリックス間の疎水性相互作用が二量体形成に重要であることが明らかにされている<sup>2</sup>。さらに、X線小角散乱測定により、モルテングロビュール状態のウマcyt *c*の一部は多量体を形成しており、モルテングロビュール状態から巻き戻り反応を行うと、GdnHClによる変性状態から巻き戻り反応によって得られる二量体と同様、C末端領域がドメインスワップした二量体が形成する<sup>3</sup>。一方、高い熱安定性を示す好熱性水素細菌由来cyt *c*<sub>552</sub> (cyt *c*<sub>552</sub>) はウマcyt *c*とは異なり、N末端 $\alpha$ ヘリックスおよびヘムを含んだ領域をスワップすることで二量体を形成した(2-3-2節)。cyt *c*<sub>552</sub>と緑膿菌由来cyt *c*<sub>551</sub>との比較研究により、cyt *c*<sub>552</sub>の高い熱安定性は疎水性アミノ酸側鎖の密な充填による疎水性相互作用によると説明されており<sup>4-8</sup>、cyt *c*<sub>552</sub>二量体は単量体同様のアミノ酸側鎖の密な構造が維持されているため高い熱安定性を示した(2-3-2節、2-4-2節)。

病気の原因となるタンパク質多量体を形成するセルピンは、変異体を用いた実験により細胞内でドメインスワッピングにより多量体を形成すると報告されている<sup>9-11</sup>。また、重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウィルスメインプロテアーゼのC末端ドメイン(M<sup>Pro</sup>-C)はドメインスワッピングにより二量体を形成するが<sup>12</sup>、M<sup>Pro</sup>-Cを大腸菌内で発現させると、単量体に加え二量体も形成する<sup>13</sup>。さらに、*in vitro*では37°CにおいてM<sup>Pro</sup>-Cの単量体と二量体は平衡状態にある(単量体:二量体=9:1)が、大腸菌発現系から精製されたM<sup>Pro</sup>-C単量体と二量体の比は3:2で*in vitro*の結果と異なっていたため、細胞内には多量体形成を促進する要因が存在することが示唆されている<sup>14</sup>。Arankoらは大腸菌内で発現させたインテンがドメインスワッピングすることで二通りのスプライシングが起こることを報告している<sup>15</sup>。このように*in vivo*でのドメインスワッピングによる多量体形成について知見が増しているが、ドメインスワッピングを左右する要因など、不明な点も多く残されている。生体内でのタンパク質多量体形成を調べるとき、生体組織からタンパク質を抽出する操作によってタンパク質が変性し巻き戻る際に単量体から多量体が生成したり、多量体が解離する可能性がある。そこで、高い安定性を有するcyt *c*<sub>552</sub>用いれば単量体や多量体への変化を抑えることができると考えた。

多くのグラム陰性菌のcyt *c*の生合成では、サイトプラズムで合成されたタンパ

ク質部分（アポcyt *c*）が分泌タンパク質によってペリプラズムへ運ばれる<sup>16, 17</sup>。その後、9つ（または8つ）のタンパク質からなる cyt *c*成熟化タンパク質群（Ccm）（CcmABCDEFGHIまたはABCDEFGH）により、アポcyt *c*にヘムが挿入されホロ型タンパク質が形成される<sup>18</sup>。成熟化の最終段階であるアポcyt *c*へのヘム挿入時には、CcmF、CcmH、CcmIが複合体を形成することが報告されている<sup>19</sup>。本研究では、生体系のモデルとして発現系を用い、大腸菌内でcyt *c*<sub>552</sub>がドメインスワッピングにより多量体を形成することを見出した。大腸菌内での多量体形成にはヘム挿入速度やタンパク質発現量が関係する可能性があるが、本研究では発現量と多量体形成の関係について注目して実験したところ、cyt *c*<sub>552</sub>発現量の増加にともなって多量体量が増加した。また野生型cyt *c*<sub>552</sub>と変異型cyt *c*<sub>552</sub>の比較よりタンパク質の安定性が多量体量に影響することが分かった。さらに、ペリプラズム空間においてホロ体とアポ体が共存し、ホローアポ複合体の存在が示唆された。

## 3-2. 実験方法

### 発現系の構築

野生型および5残基置換（A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V）cyt *c*<sub>552</sub>発現系は広島大学の三本木至宏教授にご提供いただいた<sup>20</sup>。野生型cyt *c*<sub>552</sub>遺伝子をコードしたプラスミドDNA（pKO2）をテンプレートとし、フォワードプライマー（GGCTCGGGCCATCATCATCATCATTAAGTCGACCTGCAGCCAAGCTT）およびリバースプライマー（CTTTATGGAGAGTATCCACTGGGC）を用い、KOD plus Mutagenesis Kit（TOYOBO）を使用してC末端にGSGHHHHHHH配列を導入した。プラスミドDNAの増幅にはDH5 $\alpha$ を用いた。C末端にHis-tag配列を導入した野生型cyt *c*<sub>552</sub>遺伝子をコードしたプラスミドDNAを、CcmABCDEFGHをコードしたプラスミドDNA（pEC86）と共にJCB387にトランスフォーメーションした。

### 好熱性水素細菌（*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6）の取得

好熱性水素細菌は凍ったペレットの状態にて東京大学の石井正治教授に提供して頂いた。

### 大腸菌の培養とcyt *c*<sub>552</sub>の精製

cyt *c*<sub>552</sub>発現系を有する大腸菌の培養には、100  $\mu$ g/mL アンピシリンと30  $\mu$ g/mL クロラムフェニコールを含むLB培地（25 g/L、ナカライテスク）を用いた[培

養温度：37°C、振盪速度：130 rpm]。cyt *c*<sub>552</sub> 発現量と多量体形成量の時間変化を比較するため、2L スケールで培養を行い、培養開始後 5–8、10、12、18、24 時間後の培養液の 600 nm における吸光度を測定し、集菌のため培養液 100 mL を回収した。

集菌は遠心分離[8,000 g、5 分、4°C]により行った。菌体を 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁させ、遠心分離[13,700 g、10 分、4°C]を行った。沈殿をスクロース・EDTA・トリス (SET) 緩衝液 (100 mM トリスメー塩酸緩衝液 (pH 8.0), 10 mM EDTA, 20% w/v スクロース) に懸濁させ、氷上で 1 時間インキュベートした後、遠心分離[13,700 g、10 分、4°C]を行った。沈殿を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁させ、凍結融解を 1 回行った後、遠心分離[13,700 g、10 分、4°C]を行った。凍結融解後の上清は Native-PAGE と SDS-PAGE および二量体結晶化を行った。酢酸緩衝液および SET 緩衝液に懸濁させ遠心分離した後の上清は発現量と多量体形成量の関係を調べた。

得られた上清に 1% w/v となるようにストレプトマイシンを添加した。氷上で 30 分間インキュベートし、遠心分離[13,700 g、10 分、4°C]により沈殿物を除去した。上清を 1 mM ストレプトマイシンを含んだ 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)で透析した。透析後、沈殿物を遠心分離により除去した。試料液量の 1/1000 量の 50 mM フェリシアン化カリウム水溶液を加え、ヘムを酸化型にした後、cyt *c*<sub>552</sub> を CM セルロース (Wako) カラムクロマトグラフィーにより精製した。

CD スペクトルを測定するため、酢酸緩衝液および SET 緩衝液に懸濁させ遠心分離した後の上清を 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で透析した後、CM セルロースカラム (Wako) クロマトグラフィーと FPLC システム (ÄKTA prime plus、GE Healthcare) を用いた Hitrap SP カラムクロマトグラフィーおよび Hiload 26/60 Superdex 75 pg を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製をおこなった。

野生型 His-tag cyt *c*<sub>552</sub> を発現した菌体を 100 mM Tris HCl (pH 8.0) に懸濁させ、凍結融解を 1 回行った。その後菌体を超音波により破碎した。菌体破碎液を遠心分離 (30,000 g、20 分、4°C) し、フェリシアン化カリウム等の酸化剤は加えず、上清を FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10、Bio-rad) を用いた HisTrap HP (GE Healthcare) カラムクロマトグラフィーにより精製した[流速 2.0 mL/min、検出波長 280 nm、溶媒 A 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)/0.5 M NaCl、溶媒 B 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)/0.5 M NaCl/0.5 M Imidazole、温度 4 °C]。野生型 His-tag cyt *c*<sub>552</sub> 二量体、三量体は、エタノール処理により調製した多量体<sup>21</sup>を Hiload 26/60 Superdex 75 pg を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分け、さらに同じカラムを用いて精製した。

好熱性水素細菌菌体 1 g を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 20 mL に懸濁させ、菌体を氷上で超音波により破碎した。菌体破碎液を遠心分離 (30,000 g、20 分、



4°C) し、上清を FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10、 Bio-rad) を用いた CM Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) カラムクロマトグラフィーにより精製した。CM カラム後の cyt *c*<sub>552</sub> をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した。

FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10、 Bio-rad) と Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) または Hiloal 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィー[流速 0.5 mL/min、検出波長 410 nm、溶媒 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、温度 4 °C]により cyt *c*<sub>552</sub> の多量体形成を調べた。溶出曲線のピーク面積を Igor Pro 6.0 (WaveMetrics, Portland)を用いて求めることにより、多量体形成量を見積もった。

MALDI-TOF 質量分析では、Autoflex II mass spectrometer (Bruker Daltonics) を使用し、マトリクスにはシナピン酸を用いた。

cyt *c*<sub>552</sub> 抽出時の凍結融解の影響を調べるため、pKO2 と pEC86 を持たない大腸菌を LB 培地で培養し、集菌後、浸透圧法により菌体を破壊した。破壊後の菌体を 0.5 g/mL となるように超純水に懸濁させた。懸濁液 100 μL に 0.5 mM となるよう精製した cyt *c*<sub>552</sub> を加えた。凍結融解を 1 回行い、遠心分離[13700 g, 10 min, 4°C]により上清を取り除いた。沈殿を 100 mM KPB (pH7.0) 200 μL に懸濁させ、さらに 200 mM となるよう NaCl を加えた。遠心分離[13700 g, 10 min, 4°C]により沈殿と上清を分けた。上清にストレプトマイシンを加え、氷上で 30 分インキュベートした後、遠心により沈殿物を取り除いた。この溶液を 10 mM KPB (pH 7.0) で 10 倍希釈し、CM カラムクロマトグラフィーにより精製した。CM カラム後の cyt *c*<sub>552</sub> をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した。

### アポ cyt *c*<sub>552</sub> 調製

アポ cyt *c*<sub>552</sub> の調製は Fisher らの方法を参考にした<sup>22</sup>。ジチオトレイトールにより Ag<sup>+</sup>を取り除いた後、アポ cyt *c*<sub>552</sub> を 25 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で透析した。透析後、アポ cyt *c*<sub>552</sub> を FPLC システム (AKTA prime plus, GE Healthcare) を用いた HisTrap HP (GE Healthcare) または HiTrap SP (GE Healthcare) カラムクロマトグラフィーにより精製した。Ellman 試薬<sup>23</sup>により、アポ cyt *c*<sub>552</sub> の Cys 残基のジスルフィド結合形成の有無を確認した。

### CD スペクトル測定

野生型と A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt *c*<sub>552</sub> の CD スペクトル測定には円偏光二色性分散計 J-725 (日本分光)を用いた。光路長 1 mm の石英セルを用い、25°C で測定した。A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ cyt *c*<sub>552</sub> のモル吸光係数はピリジンヘモクロム法により求めた<sup>24</sup>。野生型および A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ cyt *c*<sub>552</sub> の濃度は、それぞれ 410 nm のモル吸光係数 109,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-121</sup> と 112,000

$M^{-1} cm^{-1}$  を用いて決定した。野生型および A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V アポ cyt  $c_{552}$  の濃度は、それぞれ 280 nm のモル吸光係数 (理論値)  $15,600 M^{-1} cm^{-1}$  と  $12,600 M^{-1} cm^{-1}$  を用いて決定した。αヘリックス含有率は以下に示す式を用いて求めた<sup>25</sup>。

$$\alpha \text{ヘリックス含有率 (\%)} = \frac{-[\theta]_{222-2340}}{30300} \times 100$$

### 発現系から得られた cyt $c_{552}$ 二量体の X 線結晶構造解析

凍結融解により菌体から抽出し、CM カラムクロマトグラフィーにより精製した cyt  $c_{552}$  溶液を 76°C で 10 分間加熱した。加熱後、遠心分離により沈殿物を取り除いた。cyt  $c_{552}$  二量体は Hiload 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製した二量体溶液のバッファを 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に置換し、二量体濃度を 3 mM (ヘム濃度) に調製した。タンパク質溶液 2  $\mu$ L と沈殿剤を 2  $\mu$ L を混合し、シッティングドロップ法により結晶化を行った。1.6 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を沈殿剤に用いた条件で結晶が得られたため、SPring-8 (ビームライン: BL38B1) にて X 線回折実験を行った。エタノール処理によって作製した cyt  $c_{552}$  二量体の原子座標 (PDB code: 3VYM) を用い、分子置換法 (MOLREP) により cyt  $c_{552}$  二量体の初期構造を得た。構造精密化には REFMAC を用いた。COOT を用いて分子モデルの細かな修正や水分子の配置を行った。回折データと精密化の統計値を Table 3-1 に示す。

### 巻き戻り反応による多量体調製

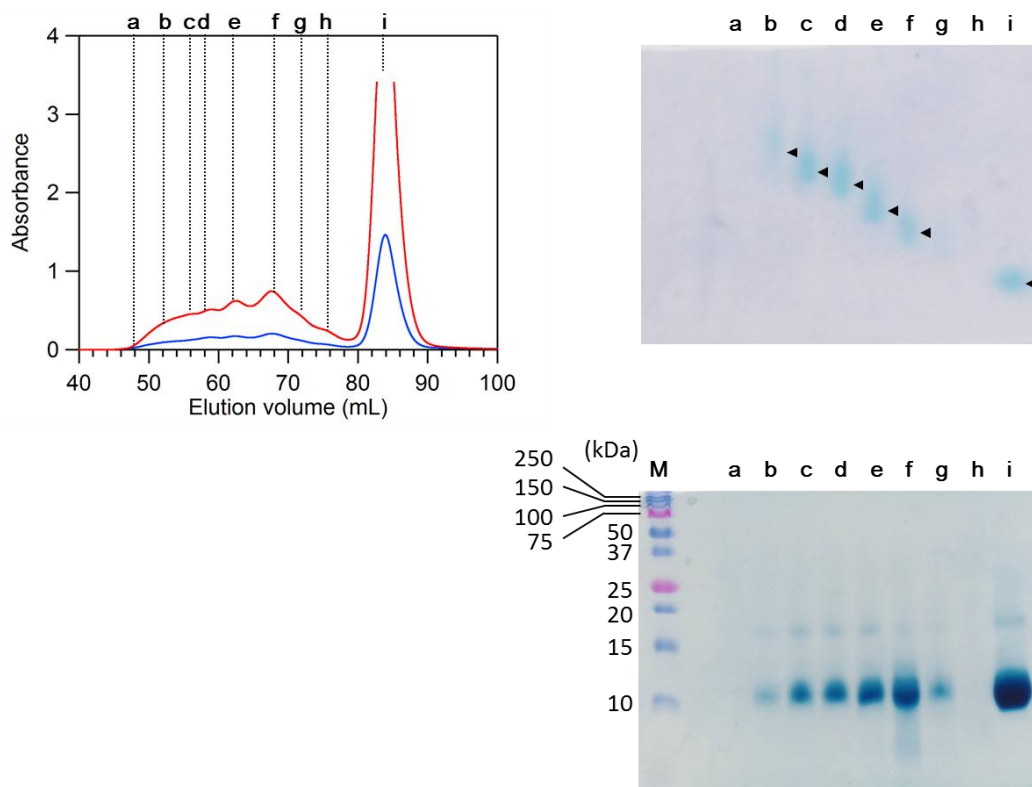
フェリシアン化カリウム (終濃度約 2 mM、Wako、日本) を添加し、DEAE カラムで精製することにより酸化型の野生型および A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt  $c_{552}$  を得た。GdnHCl (終濃度 5.3 M、Nacalai Tesqu、日本) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて、変性状態の野生型および A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ cyt  $c_{552}$  (終濃度 0.2 mM) またはホロ cyt  $c_{552}$  (終濃度 0.2 mM)、アポ cyt  $c_{552}$  (終濃度 0.35 mM) の混合溶液を調製した。この cyt  $c_{552}$  混合溶液を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化させた脱塩カラム (PD SpinTrap G-25, GE Healthcare) にのせ、遠心分離 (800 g、2 分、4°C) により cyt  $c_{552}$  を溶出させ GdnHCl を取り除いた。すばやく脱塩後の溶液に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100  $\mu$ L を加えよく攪拌した。さらに 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200  $\mu$ L を加えてから、37°C で 1 時間インキュベートした。

### 3-3. 実験結果

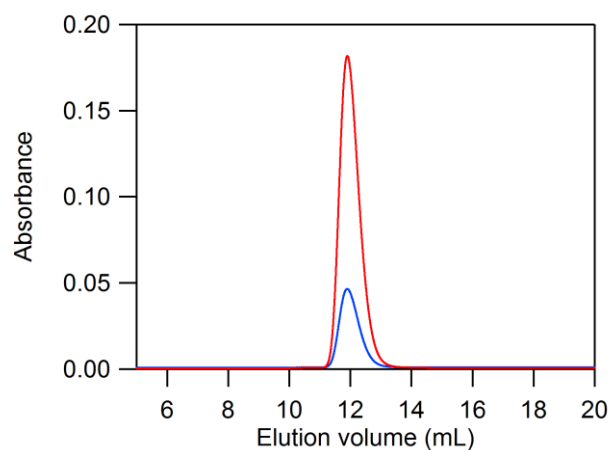
#### 3-3-1. 大腸菌内での *cyt c<sub>552</sub>* の多量体形成

野生型 *cyt c<sub>552</sub>* の発現系を有する大腸菌を培養し、浸透圧法により *cyt c<sub>552</sub>* を抽出した後、凍結融解によって菌体に残った野生型 *cyt c<sub>552</sub>* を取り出した。取り出した直後の *cyt c<sub>552</sub>* は還元型であったが、精製の途中で酸化型にした。試料のゲルろ過クロマトグラフィーでは、溶出体積 85 mL の位置に野生型 *cyt c<sub>552</sub>* 単量体に由来するピークが観測された (Figure 3-1、A)。また、50–75 mL に野生型 *cyt c<sub>552</sub>* 多量体に由来すると考えられるピークが観測された。*cyt c<sub>552</sub>* の発現しない大腸菌と *cyt c<sub>552</sub>* を混合し凍結融解を行ったが、多量体は観測されなかった (Figure 3-2)。これらの結果より、大腸菌内でも *cyt c<sub>552</sub>* が多量体を形成することが示唆された。多量体が観測されたため、以後、His-tag を用いた実験以外は全て精製時に *cyt c<sub>552</sub>* を酸化型にした。

凍結融解で抽出した *cyt c<sub>552</sub>* をゲルろ過カラムで精製し、クロマトグラフィー溶出液を Native-PAGE 後にヘム染色で分析すると、階段状のバンドが観測された (Figure 3-1、B の黒い三角形で示したバンド)。また、SDS-PAGE 後のヘム染色では、溶出体積 50–75 mL のフラクションから *cyt c<sub>552</sub>* 単量体の分子量 (9.2 kDa) に対応する位置にバンドが観測された (Figure 3-1、C の黒い三角形で示した位置)。これらの結果より、発現系において *cyt c<sub>552</sub>* の単量体が非共有結合的に相互作用し、多量体を形成することが分かった。



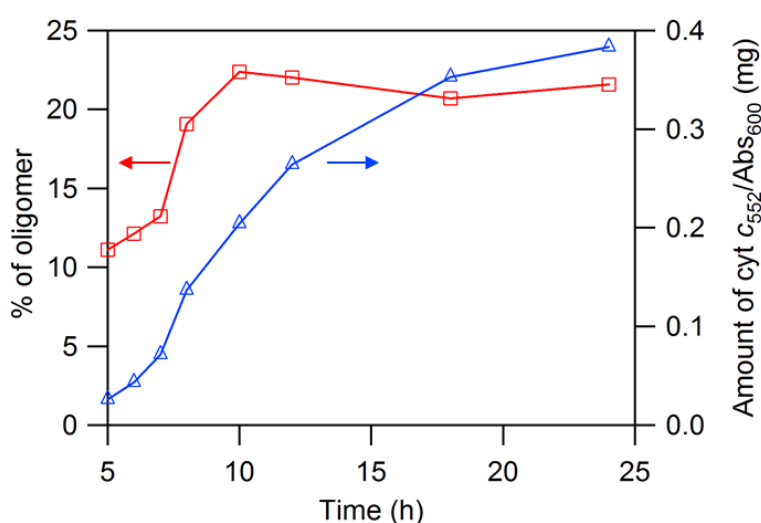
**Figure 3-1.** 大腸菌から凍結融解法により抽出し精製した *cyt c<sub>552</sub>* のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線と溶出液の Native-PAGE および SDS-PAGE。(A) ゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線[カラム : Hiload 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare)、緩衝液 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速 : 0.5 mL/min、温度 : 4 °C、検出波長 : 280 nm、410 nm]、(B) Native-PAGE 後のヘム染色と (C) SDS-PAGE 後のヘム染色。Native-PAGE は 10% ゲル、SDS-PAGE は 18% ゲルを用いて行った。泳動後のゲルはヘム染色<sup>26</sup>により分析した。レーン a : 47–49 mL、レーン b : 51–53 mL、レーン c : 55–57 mL、レーン d : 57–59 mL、レーン e : 61–63 mL、レーン f : 67–69 mL、レーン g : 71–73 mL、レーン h : 75–77 mL、レーン i : 83–85 mL の溶出液。レーン M : 分子量マーカー。



**Figure 3-2.** 大腸菌と混合し、凍結融解を行った後の *cyt c<sub>552</sub>* ゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線[カラム: Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速: 0.5 mL/min、温度: 4 °C、検出波長: 280 nm、410 nm]。

### 3-3-2. タンパク質発現量と安定性が大腸菌内での多量体形成に及ぼす影響

cyt *c*<sub>552</sub> は大腸菌内で多量体を形成することが分かった。そこで、大腸菌内において cyt *c*<sub>552</sub> がどのような条件で多量化するのかを調べた。まず、発現量と多量体形成量の関係について調べた。各培養時間における cyt *c*<sub>552</sub> 発現量をその時の培養液の 600 nm の吸光度 (Abs<sub>600</sub>) で割った値は培養 5 時間から 12 時間の間に急速に増え、その後緩やかになった (Figure 3-3、青線)。培養 5–12 時間にかけて cyt *c*<sub>552</sub> 発現量が増加するとともに、多量体量も増加した (Figure 3-3、赤線)。この結果より、大腸菌内の cyt *c*<sub>552</sub> 濃度が高いほど多量体形成量が増すことが分かった。

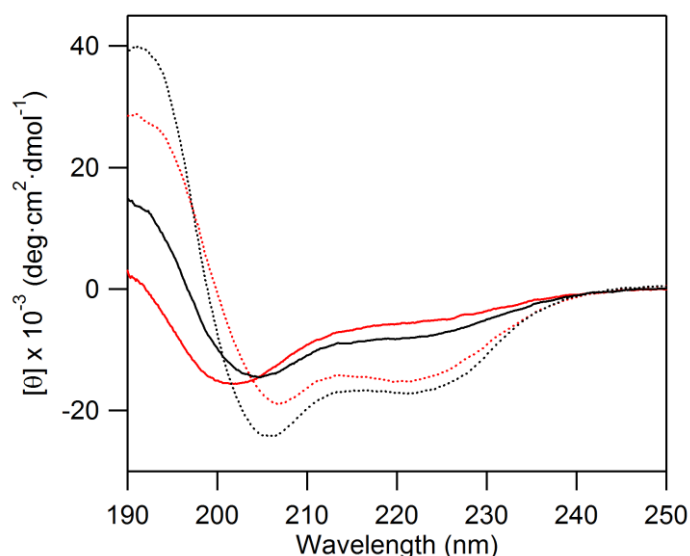


**Figure 3-3.** 各培養時間に cyt *c*<sub>552</sub> 発現量を培養液の Abs<sub>600</sub> で割った値 (青線) および多量体形成量 (多量体も含めた cyt *c*<sub>552</sub> の量に対する多量体の割合、赤線)。

次に、cyt *c*<sub>552</sub> の安定性と多量体形成の関係を調べるため、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt *c*<sub>552</sub> (Figure 1-13 参照) を用いた。A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt *c*<sub>552</sub> の変性温度は野生型 cyt *c*<sub>552</sub> より 26°C 低く (A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V、95.2°C ; wild-type、121°C)、GdnHCl の変性中点濃度も 2.8 M 低い (A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V、1.67 M ; 野生型、4.46 M)<sup>20</sup> と報告されている。

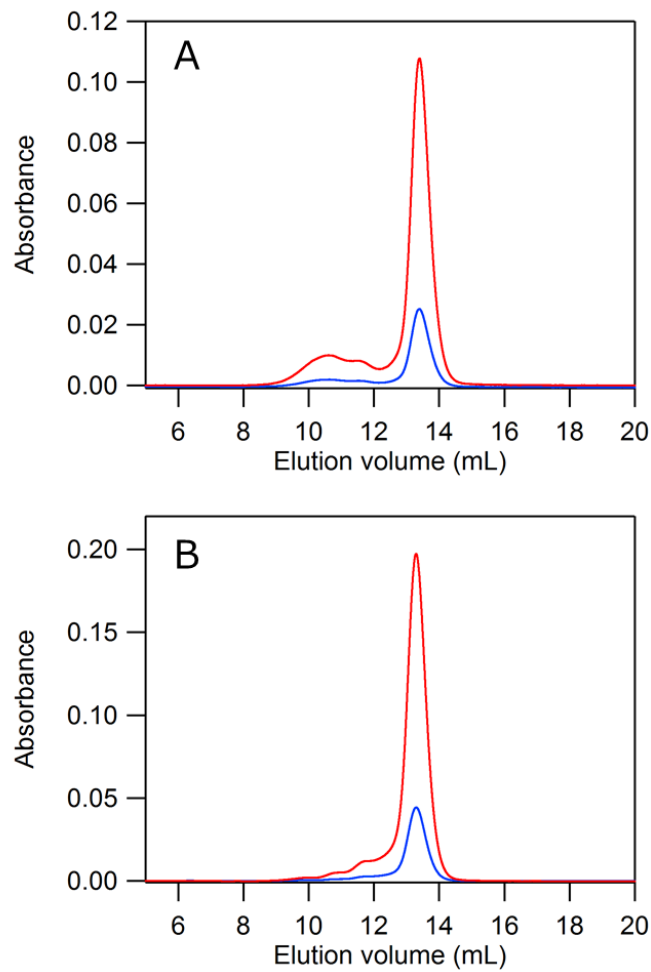
タンパク質の構造情報を得るため、野生型と A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt *c*<sub>552</sub> それぞれのホロ体とアポ体の CD スペクトルを測定したところ、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V アポ cyt *c*<sub>552</sub> と野生型アポ cyt *c*<sub>552</sub> の  $\alpha$ ヘリックス含有率はそれぞれ 11% と 19% であった (Figure 3-4、黒赤実線)。また、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ cyt *c*<sub>552</sub> と野生型ホロ cyt *c*<sub>552</sub> の  $\alpha$ ヘリックス

含有率はそれぞれ 42%と 49%で (Figure 3-4、黒赤破線) であった。これらの結果より A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* は野生型 *cyt c<sub>552</sub>* 比べホロ体アポ体共に二次構造が少なく、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* は野生型 *cyt c<sub>552</sub>* に比べ、ホロ体とアポ体の両方で構造が崩れていることが示唆された。



**Figure 3-4.** ホロおよびアポ *cyt c<sub>552</sub>* の CD スペクトル。野生型ホロ体を黒破線、アポ体を黒実線、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ体を赤破線、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V アポ体を赤実線で示す。タンパク質濃度 9.5–10.5  $\mu\text{M}$ 、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、25°C。

タンパク質の安定性が多量体形成に与える影響を調べるため、大腸菌内における多量体形成量を比較した。菌体 1 g あたりの *cyt c<sub>552</sub>* 発現量は、野生型 *cyt c<sub>552</sub>* で  $1.1 \pm 0.2$  mg、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* で  $1.7 \pm 0.2$  mg と変異型 *cyt c<sub>552</sub>* の方が発現量は多かったにもかかわらず、野生型 *cyt c<sub>552</sub>* の方が A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* より精製液から多くの多量体が検出された (野生型 *cyt c<sub>552</sub>*,  $21 \pm 5\%$ 、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>*,  $8.7 \pm 0.6\%$ ) (Figure 3-5)。特に、溶出曲線の 10–11 ml 付近で 410 nm の吸光度の強度が増大し、野生型 *cyt c<sub>552</sub>* で高次多量体が多く形成した (Figure 3-5, A)。これらの結果より、タンパク質の安定性が大腸菌内での *cyt c<sub>552</sub>* 多量体形成量に影響することが示唆された。



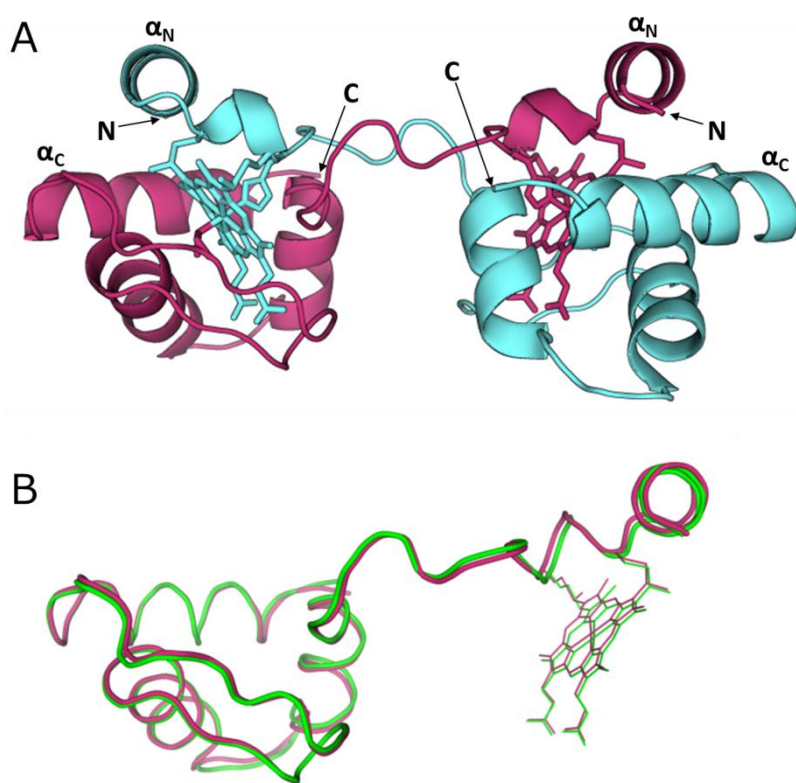
**Figure 3-5.** 大腸菌から抽出、CM カラムクロマトグラフィーによる精製後の (A) 野生型 *cyt c<sub>552</sub>*、(B) A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* 溶液のゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線[カラム : Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速 : 0.5 mL/min、温度 : 4 °C、検出波長 : 280 nm、410 nm]。



### 3-3-3. 発現系から得た *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の X 線結晶構造

発現系から得られた *cyt c*<sub>552</sub> 多量体の詳細構造を調べるため X 線結晶構造解析を行った。分解能 1.8 Å の立体構造より、発現系より精製して得られた *cyt c*<sub>552</sub> 二量体では、エタノール処理<sup>21</sup>によって得られた二量体と同じく、Ala18-Lys20 の位置が単量体での位置と大きくずれ、N 末端  $\alpha$  ヘリックスとヘム含む領域を分子間で交換し形成していることが分かった (Figure 3-6、A)。

発現系から得られた二量体の結晶の非対称単位中には 1 つのプロトマーが存在した。発現系から得られた 2 量体とエタノール処理により作製した 2 量体のプロトマーの主鎖構造を重ね合わせると (Figure 3-6、B)、C $\alpha$  炭素の平均二乗偏差 (rmsd) の値は 0.427 となり、2 つの二量体のプロトマー構造はよく一致していることが分かった。



**Figure 3-6.** (A) 発現系から得られた *cyt c*<sub>552</sub> 二量体の構造。二量体中のプロトマーをそれぞれ紫と水色で示す。N : N 末端、C : C 末端、 $\alpha_N$  : N 末端  $\alpha$  ヘリックス、 $\alpha_C$  : C 末端  $\alpha$  ヘリックス。(B) 発現系から得られた 2 量体とエタノール処理により作製した 2 量体のプロトマーの主鎖構造を重ね合わせ。エタノール処理により形成した二量体 (PDB code: 3VYM)、発現系から得た二量体のプロトマーをそれぞれ緑と紫で示す。

**Table S1.** データ収集と構造精密化に用いた統計値

Data collection	
X-ray source	SPring-8 (BL38B1)
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	$P3_121$
Unit cell parameters	
$a, b, c$ (Å)	45.8, 45.8, 78.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 120
Resolution (Å)	50.00-1.80 (1.86-1.80)
Number of unique reflections	9242 (847)
$R_{\text{merge}}^a$	0.070 (0.649)
Completeness (%)	99.2 (93.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	37.522 (2.248)
Redundancy	9.7(7.1)
Refinement	
Resolution (Å)	39.67-1.80 (1.85-1.80)
Number of reflections	8724 (615)
$R_{\text{work}}^b$ (%)	0.135 (0.236)
$R_{\text{free}}^b$ (%)	0.208 (0.298)
Completeness (%)	98.7 (91.7)
Number of atoms in an asymmetric unit	
Protein	601
Water	32
Heme	43
Average $B$ factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	39.7
Water	45.1
Heme	26.9
Ramachandran plot (%)	
Favored	100
Allowed	0
Outlier	0

Statistics for the highest-resolution shell are given in parentheses.

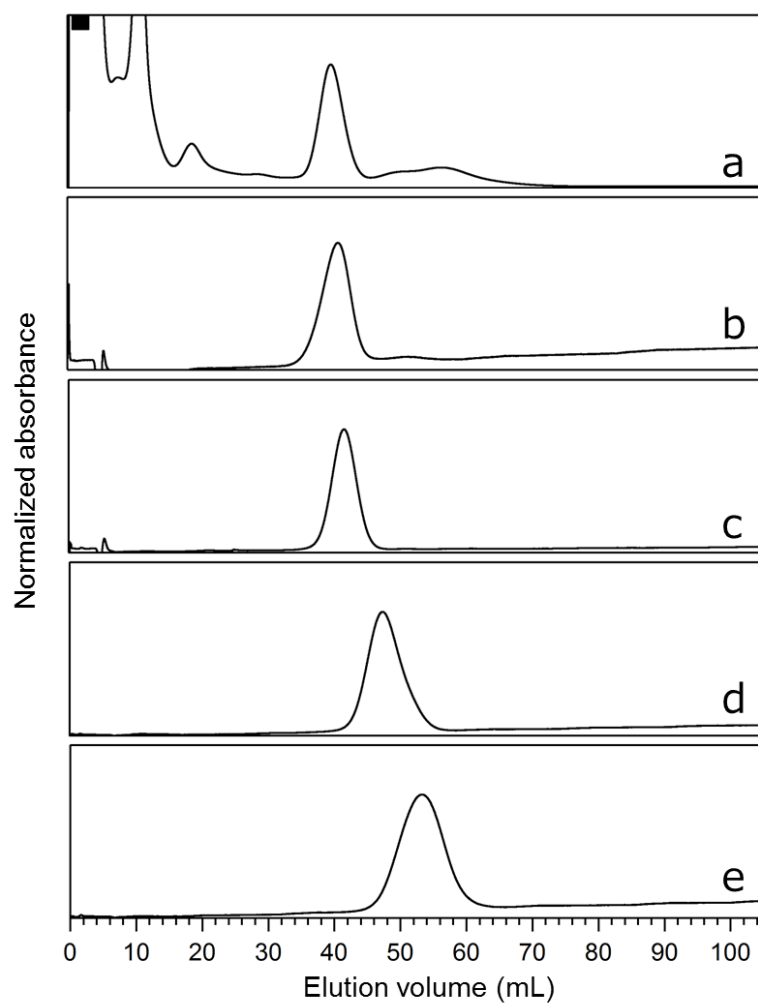
<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} |I - \langle I \rangle| / (\sum_{\text{hkl}} |I|)^{-1}$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|| / (\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|)^{-1}$ ,  $k$ : scaling factor.  $R_{\text{free}}$  was computed identically, except where all reflections belong to a test set of 5 % of randomly selected data.

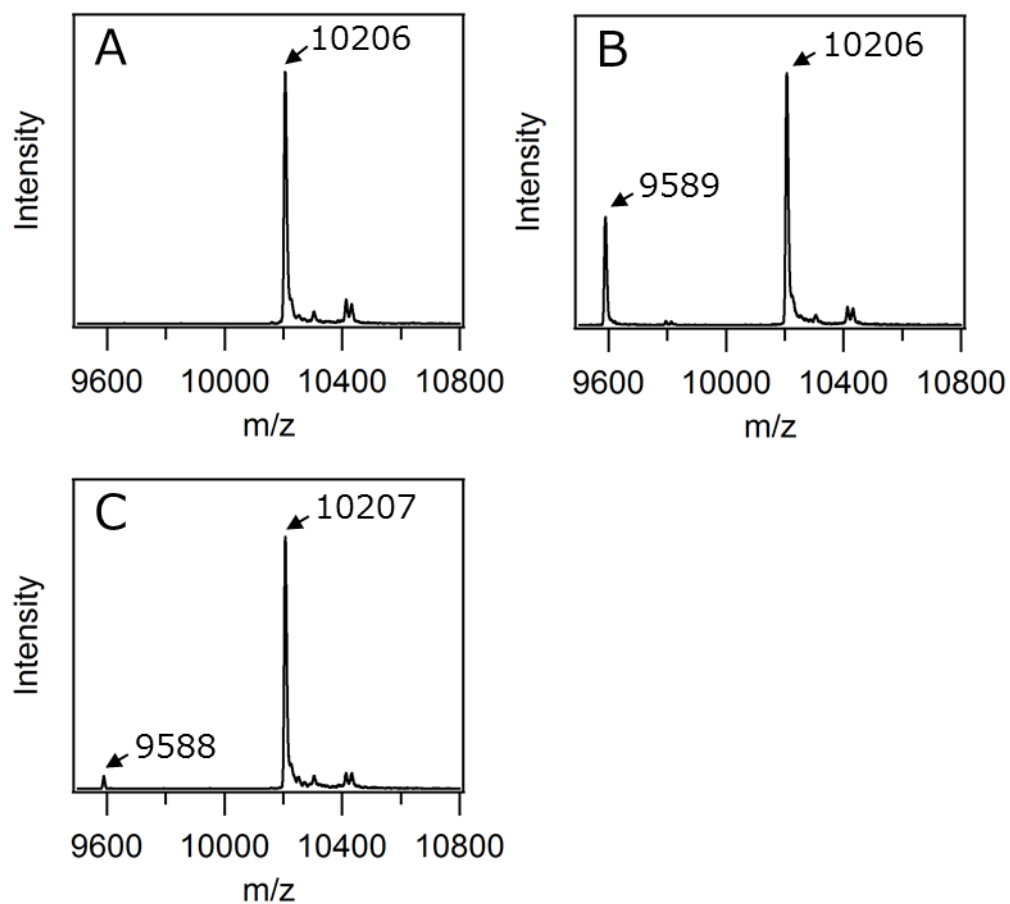
### 3-3-4. 多量体に含まれるアポ cyt c<sub>552</sub>の検出

チオエーテル結合形成反応の速度定数は *in vitro* (pH 7.0) で  $0.3 \text{ h}^{-1}$  と報告されており<sup>27</sup>、細胞内でホロ cyt c が折れたたまる際、アポ cyt c が共存する可能性がある。

C 末端に His-tag を付加した野生型 cyt c<sub>552</sub> を発現させた大腸菌を超音波破碎し、破碎後の可溶画分に含まれる cyt c<sub>552</sub> を HisTrap カラムで精製すると、溶出体積 40–70 mL にかけて赤色の溶出液を得た (Figure 3-7、溶出曲線 a)。溶出位置 42–44 mL の溶出液の MALDI-TOF 質量分析を行うと、ホロ cyt c<sub>552</sub> の分子量 ( $M_v = 10205$ ) に対応するピーク ( $m/z = 10206$ ) が観測された (Figure 3-8、A)。一方、溶出位置 50–52 mL、および 58–60 mL の溶出液からはホロ cyt c<sub>552</sub> に加え、 $m/z = 9589$  (Figure 3-8、B)、 $m/z = 9588$  (Figure 3-8、C) に、アポ cyt c<sub>552</sub> の分子量 ( $M_v = 9589$ ) に対応するピークも観測された。また、いずれのマススペクトルにおいてもシグナル配列が付加したアポ cyt c<sub>552</sub> の分子量ピークは観測されなかった。これらの結果より大腸菌のペリプラズム空間にホロ体とアポ体の両方が存在していることが分かった。大腸菌から抽出した試料では、41 mL 付近の溶出液のマススペクトルからはアポ体の分子量は観測されなかった (Figure 3-7、A)。精製した His-tag 付アポ cyt c<sub>552</sub> およびホロ cyt c<sub>552</sub> 単量体、二量体、三量体を同様に HisTrap カラムで分析するとそれぞれ溶出体積 41 mL、42 mL、47 mL、53 mL にピークが観測された (Figure 3-6、溶出曲線 b–e)。以上より、大腸菌内でアポ体を含んだ多量体が形成されていることが示唆された。



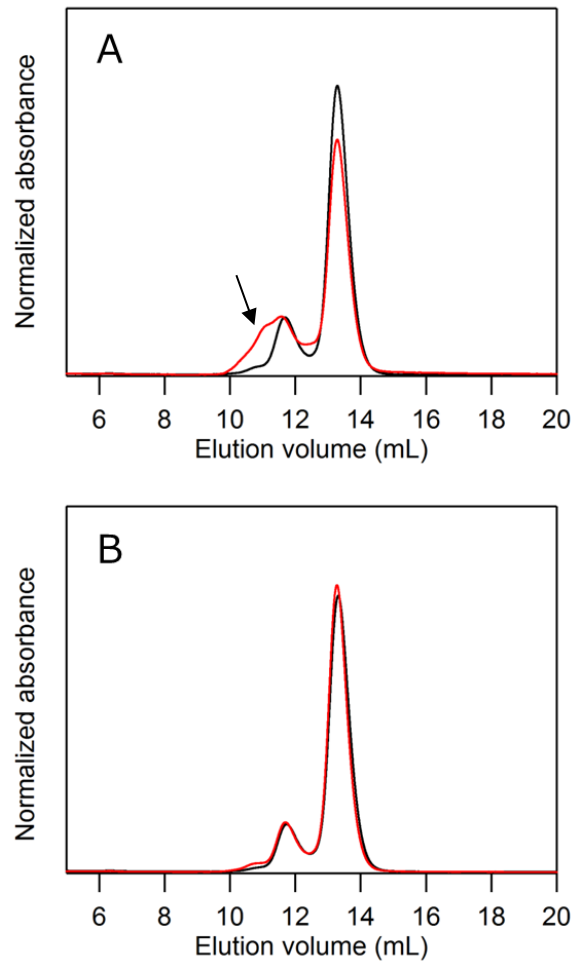
**Figure 3-7.** HisTrap カラムクロマトグラフィー溶出曲線。菌体から抽出した試料 (a)、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* から調製したアポ *cyt c<sub>552</sub>* 単量体 (b)、精製したホロ *cyt c<sub>552</sub>* 単量体 (c)、二量体 (d)、三量体 (e)。カラム : His Trap HP (GE Healthcare)、緩衝液 : 25 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) / 0.5 M NaCl、イミダゾール濃度勾配 : 0–0.5 M、流速 : 1.0 mL/min、検出波長 280 nm。



**Figure 3-8.** MALDI-TOF マススペクトル。Figure 3-7 溶出曲線 a における (A) 溶出位置 42–44 mL、(B) 50–52 mL、(C) 58–60 mL のカラム溶出液の MALDI-TOF マススペクトル。

### 3-3-5. 巻き戻り反応によるホロ体とアポ体の多量体形成

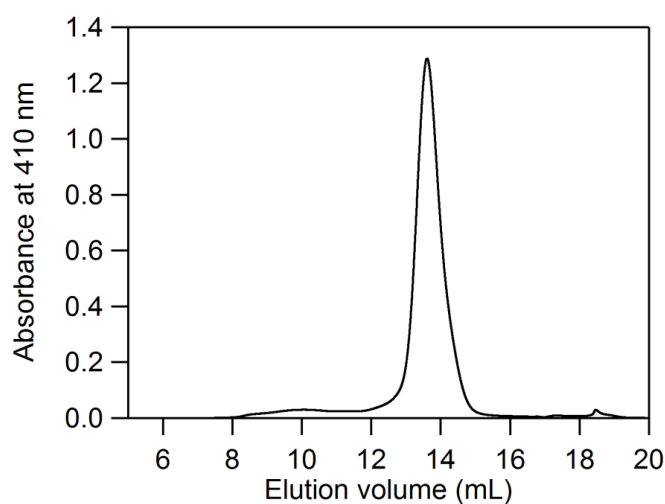
アポ体がホロ体の多量体形成に与える影響を調べるため、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* とアポ *cyt c<sub>552</sub>* を混合し巻き戻り反応を行った。野生型ホロ *cyt c<sub>552</sub>* (0.2 mM) のみで巻き戻り反応を行い、37°Cで1時間インキュベートすると、13.3 mLに単量体由来するピークに加え、11.7 mLと10.8 mLにそれぞれ二量体と三量体由来すると思われるピークが観測された (Figure 3-9、A、黒線)。一方、野生型ホロ *cyt c<sub>552</sub>* (0.2 mM) とアポ *cyt c<sub>552</sub>* (0.35 mM) 両方が存在する状態で巻き戻り反応を行い、37°Cで1時間インキュベートすると、11.7 mLに単量体、9.8–12 mLに複数のピークトップを持つブロードなバンドが観測された (Figure 3-9、A、赤線、黒い矢印参照)。また、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* では、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* のみでもホロ *cyt c<sub>552</sub>* とアポ *cyt c<sub>552</sub>* の混合系でも、巻き戻り反応を行った後、37°Cで1時間インキュベートすると、13.3 mL、11.7 mLと10.7 mLにそれぞれ単量体、二量体、三量体と考えられるピークが観測されたが、野生型のホロ *cyt c<sub>552</sub>* とアポ *cyt c<sub>552</sub>* の混合系で観測されたようなブロードなバンドは観測されなかった (Figure 3-9、B)。これらの結果より、野生型のホロ *cyt c<sub>552</sub>* が巻き戻る際にアポ *cyt c<sub>552</sub>* が存在すると、高次多量体が形成されやすいことが分かった。



**Figure 3-9.** 巻き戻り反応後の *cyt c<sub>552</sub>* ゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線。(A) 野生型 *cyt c<sub>552</sub>*、(B) A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>*。ホロ *cyt c<sub>552</sub>* (終濃度 0.2 mM) (黒)、またはホロ *cyt c<sub>552</sub>* (終濃度 0.2 mM) とアポ *cyt c<sub>552</sub>* (終濃度 0.35 mM) (赤) と GdnHCl (終濃度 5.3 M) を混合し、巻き戻り反応を行った。得られた溶液を 37°C で 1 時間インキュベートした後に分析した。[カラム : Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速 : 0.5 mL/min、温度 : 4 °C、検出波長 : 410 nm]。

### 3-3-6. 好熱性水素細菌内での *cyt c*<sub>552</sub> 多量体形成

好熱性水素細菌中で *cyt c*<sub>552</sub> が多量体を形成しているか調べた。菌体を超音波破碎し、イオン交換カラムで精製した後のゲルろ過クロマトグラフィーでは、13.8 mL に単量体に由来するピークが観測されたが、多量体と考えられるピークは観測されなかった (Figure 3-10)。この結果より、好熱性水素細菌中では *cyt c*<sub>552</sub> は多量化しないことが分かった。



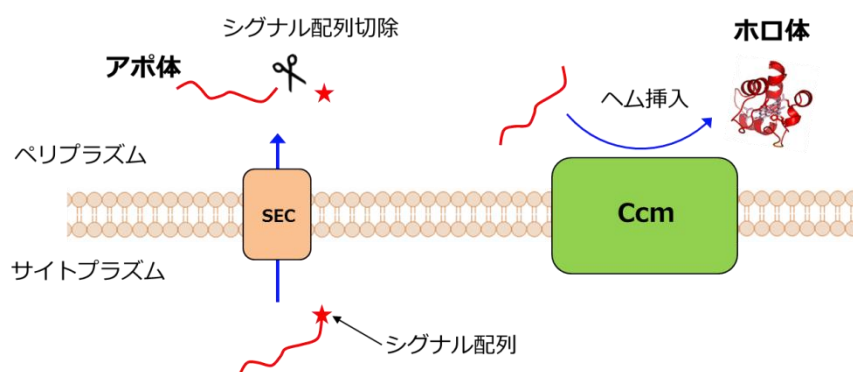
**Figure 3-10.** 好熱性水素細菌より抽出した *cyt c*<sub>552</sub> ゲルろ過クロマトグラフィー溶出曲線 [カラム : Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)、緩衝液 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、流速 : 0.5 mL/min、温度 : 4 °C、検出波長 : 410 nm]。8–12 mL の画分は夾雑タンパク質由来である。



### 3-4. 考察

cyt  $c_{552}$  の発現系を有する大腸菌から cyt  $c_{552}$  の多量体が得られた (Figure 3-1)。また、野生型 cyt  $c_{552}$  の発現量が増加すると多量体量が増加した (Figure 3-3)。A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V ホロ cyt  $c_{552}$  は野生型ホロ cyt  $c_{552}$  に比べ、変性温度が 26°C 低く、GdnHCl の変性中点濃度も 2.8 M 低い<sup>20</sup>。A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt  $c_{552}$  の大腸菌から抽出した際の単量体に対する多量体の割合は、野生型 cyt  $c_{552}$  より減少した。これらの結果よりタンパク質の安定性も大腸菌内での cyt  $c_{552}$  多量体形成量に影響を与えることが示唆された。

cyt  $c_{552}$  は熱安定性が非常に高いタンパク質であり<sup>20, 28</sup>、一度天然構造へ折りたたまれると、再び変性し、多量化する可能性は低い。よって、cyt  $c_{552}$  の多量化は天然構造へと折りたたまれる過程で起こると推測される。ウマ cyt  $c$  の巻き戻り反応による多量体形成では、折れたたみ初期過程の分子間相互作用がドメインスワッピングによる多量体形成に重要であると報告されている<sup>2</sup>。また、cyt  $c_{552}$  とアミノ酸配列相同性が 56% あり<sup>29</sup>、立体構造もよく一致する緑膿菌 cyt  $c_{551}$  は<sup>6-8</sup> わずか 10 ミリ秒程で天然構造へ折りたたまれる<sup>30</sup>。よって、変性剤を取り除くことで一斉に折れたたみが開始される *in vitro* での巻き戻り反応とは異なり、大腸菌内で折れたたみ初期過程のホロ状態の cyt  $c_{552}$  分子どうしが会合し、多量体を形成する確率は低いと考えられる。



**Figure 3-11.** cyt  $c_{552}$  成熟化機構。サイトプラズムで合成されたアポ体はペリプラズム空間へ輸送され、シグナル配列が切除される。その後 Ccm によってヘムが挿入されホロ体となる。SEC : 分泌タンパク質。Ccm : シトクロム  $c$  マチュレーション。

そこで、大腸菌内における cyt  $c_{552}$  の成熟化過程 (Figure 3-11) を考えたとき、ペリプラズム空間ではホロ体とアポ体が共存し、アポ体がホロ体の折れたたみ過程に影響しているのではないかと考えた。His-tag を付加した cyt  $c_{552}$  の発現系

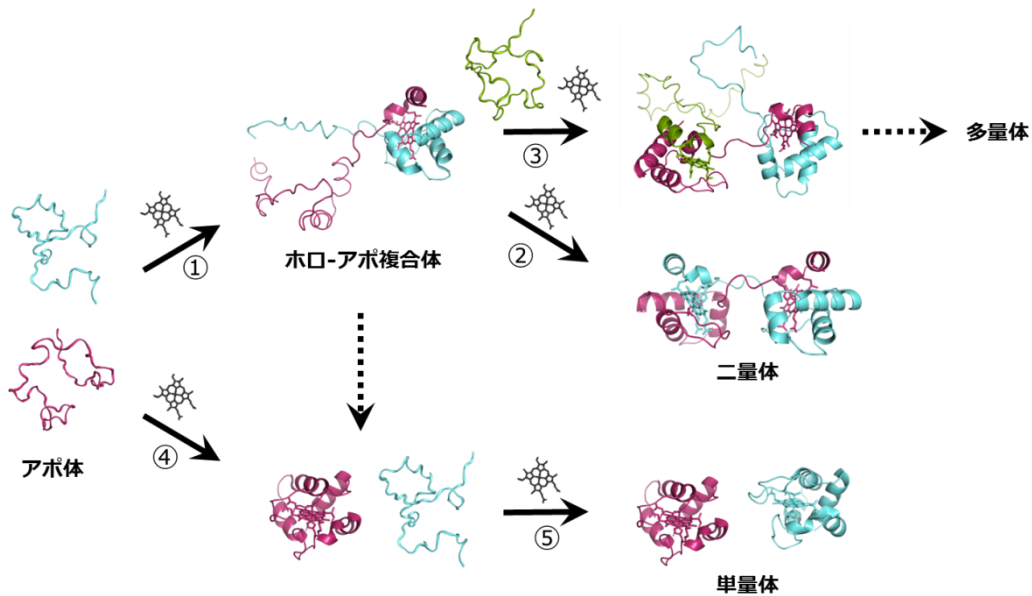
を有する大腸菌を培養すると、アポ体を含んだ多量体が検出された (Figure 3-6、3-7)。大腸菌のペリプラズムでは、アポ *cyt c* はプロテアーゼの DegP により分解されると報告されているため<sup>31</sup>、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* とアポ *cyt c<sub>552</sub>* がヘテロ多量体を形成しアポ *cyt c<sub>552</sub>* は分解を免れたと推測した。これらの結果より、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* の折れたたみ中に、ホロ *cyt c<sub>552</sub>* がアポ *cyt c<sub>552</sub>* と複合体を形成し、その後ホロ-アポ複合体のアポ *cyt c<sub>552</sub>* にヘムが挿入されることでホロ *cyt c<sub>552</sub>* の多量体が形成されるという多量化機構を考えた (Figure 3-12)。

野生型 *cyt c<sub>552</sub>* のホロ体とアポ体を混合し巻き戻り反応を行ったところ、ホロ体のみで巻き戻り反応を行ったときよりも多く高次多量体が形成されたが、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* の場合は、アポ体の存在に関わらず巻き戻り反応後の多量体量は同じであったため (Figure 3-8)、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* のホロ体とアポ体の相互作用は弱いと考えられる。また CD スペクトル測定より、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* は野生型に比べホロ体、アポ体共に二次構造が減少していた (Figure 3-4)。このため、A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* は大腸菌内でホロ-アポ複合体が解離してしまい、結果的にホロ型の多量体も減少したと考えられる (Figure 3-5)。好熱性水素細菌の抽出物から *cyt c<sub>552</sub>* 多量体が検出されなかったのは、好熱性水素細菌の生育温度が 70 °C<sup>32</sup> と高くホロ-アポ複合体が解離したためであると推測される。

大腸菌のペリプラズム空間は酸化条件であるが、抽出した直後の *cyt c<sub>552</sub>* は還元型であった。ヘム挿入反応時、3 価の状態に輸送されたヘムの鉄原子は CcmF 内の *b* 型ヘムから電子を受け取って 2 価に還元されると考えられている<sup>33</sup>。鉄-Met 結合は還元型の方が安定であり、還元型 *cyt c<sub>552</sub>* は酸化型 *cyt c<sub>552</sub>* より安定である<sup>28</sup>。ホロ-アポ複体内で鉄-Met 結合が形成されていれば、ヘム鉄の酸化還元状態が大腸菌内でのホロ-アポ複合体の安定性に影響する可能性がある。

これまでに *in vivo* で *cyt c* が多量体を形成するという報告はない。最近、ドメインスワッピングにより形成された *cyt c* 多量体に細胞毒性があると報告されている<sup>34</sup>。この結果より *cyt c* の多量化は生物にとって避けるべき事象であると考えられる。セルピン変異体は細胞内で多量化し病気を引き起こす<sup>35</sup>が、見方を変えればセルピンの多量化は致命的ではないため、研究者達は細胞内に蓄積したセルピン多量体を観測できたといえる。*cyt c* を欠損させたマウスは胚の段階で死亡すると報告されている<sup>36</sup>。よって多量体を形成し機能を失う変異型 *cyt c* を持つ細胞は生き延びることができないため、これまで *cyt c* 多量体が観測されなかったと考えられる。一方、*cyt c<sub>552</sub>* は大腸菌内で多量体を形成し、好熱性水素細菌内では多量化していなかった (Figure 3-10)。過剰に安定なタンパク質は、ドメインスワップ多量体のようなイレギュラーな構造も安定化してしまうため、タンパク質は生物の生育環境に適した安定性になるよう調節されていると考え

られる。



**Figure 3-12.** 大腸菌内における推定多量体形成メカニズム。①：1分子のアポ体にヘムが挿入され、ホロ体が形成される。そのホロ体とアポ体が相互作用しホロアポ複合体が形成される。②：ホロアポ複合体のアポ体の部分にヘムが挿入されドメインスワップ多量体が形成される。③：ホロアポ複合体にさらにヘムとアポ体が結合し、高次多量体が形成される。④と⑤：ホロアポ複合体が形成されなかった場合は、個々にヘムが挿入され単量体となる。

### 3-5. 結論

cyt *c*<sub>552</sub> の発現系を用いると、大腸菌内でドメインスワップした cyt *c*<sub>552</sub> の多量体が得られた。大腸菌内の cyt *c*<sub>552</sub> 濃度が増すと多量体量も増加した。また、大腸菌から得られた多量体量は A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V cyt *c*<sub>552</sub> で野生型 cyt *c*<sub>552</sub> より減少し、大腸菌内における cyt *c*<sub>552</sub> 多量化において、タンパク質の安定性が重要であることがわかった。発現系では、大腸菌のペリプラズム空間においてホロ体とアポ体が共存しており、ホロ体とアポ体のヘテロ多量体を形成する可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Hirota, S., Hattori, Y., Nagao, S., Taketa, M., Komori, H., Kamikubo, H., Wang, Z. H., Takahashi, I., Negi, S., Sugiura, Y., Kataoka, M., and Higuchi, Y. (2010) Cytochrome *c* polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 12854-12859.
2. Parui, P. P., Deshpande, M. S., Nagao, S., Kamikubo, H., Komori, H., Higuchi, Y., Kataoka, M., and Hirota, S. (2013) Formation of oligomeric cytochrome *c* during folding by intermolecular hydrophobic interaction between N- and C-terminal alpha-helices, *Biochemistry* *52*, 8732-8744.
3. Deshpande, M. S., Parui, P. P., Kamikubo, H., Yamanaka, M., Nagao, S., Komori, H., Kataoka, M., Higuchi, Y., and Hirota, S. (2014) Formation of domain-swapped oligomer of cytochrome *c* from its molten globule state oligomer, *Biochemistry* *53*, 4696-4703.
4. Tai, H. L., Irie, K., Mikami, S., and Yamamoto, Y. (2011) Enhancement of the thermostability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> through introduction of an extra methylene group into its hydrophobic protein interior, *Biochemistry* *50*, 3161-3169.
5. Takahashi, Y. T., Sasaki, H., Takayama, S. I. J., Mikami, S. I., Kawano, S., Mita, H., Sambongi, Y., and Yamamoto, Y. (2006) Further enhancement of the thermostability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>, *Biochemistry* *45*, 11005-11011.
6. Uchiyama, S., Hasegawa, J., Tanimoto, Y., Moriguchi, H., Mizutani, M., Igarashi, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2002) Thermodynamic characterization of variants of mesophilic cytochrome *c* and its thermophilic counterpart, *Protein Eng.* *15*, 455-461.
7. Hasegawa, J., Shimahara, H., Mizutani, M., Uchiyama, S., Arai, H., Ishii, M., Kobayashi, Y., Ferguson, S. J., Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (1999) Stabilization of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> by systematic amino acid substitutions based on the structure of thermophilic *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>, *J. Biol. Chem.* *274*, 37533-37537.
8. Hasegawa, J., Uchiyama, S., Tanimoto, Y., Mizutani, M., Kobayashi, Y., Sambongi, Y., and Igarashi, Y. (2000) Selected mutations in a mesophilic cytochrome *c* confer the stability of a thermophilic counterpart, *J. Biol. Chem.* *275*, 37824-37828.
9. Yamasaki, M., Sendall, T. J., Pearce, M. C., Whisstock, J. C., and Huntington, J.

- A. (2011) Molecular basis of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer, *EMBO Rep.* 12, 1011-1017.
10. Yamasaki, M., Sendall, T. J., Harris, L. E., Lewis, G. M. W., and Huntington, J. A. (2010) Loop-sheet mechanism of serpin polymerization tested by reactive center loop mutations, *J. Biol. Chem.* 285, 30752-30758.
  11. Yamasaki, M., Li, W., Johnson, D. J. D., and Huntington, J. A. (2008) Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization, *Nature* 455, 1255-1258.
  12. Zhong, N., Zhang, S. N., Xue, F., Kang, X., Zou, P., Chen, J. X., Liang, C., Rao, Z. H., Jin, C. W., Lou, Z. Y., and Xia, B. (2009) C-terminal domain of SARS-CoV main protease can form a 3D domain-swapped dimer, *Protein Sci.* 18, 839-844.
  13. Zhong, N., Zhang, S. N., Zou, P., Chen, J. X., Kang, X., Li, Z., Liang, C., Jin, C. W., and Xia, B. (2008) Without its N-finger, the main protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus can form a novel dimer through its C-terminal domain, *J. Virol.* 82, 4227-4234.
  14. Kang, X., Zhong, N., Zou, P., Zhang, S. N., Jin, C. W., and Xia, B. (2012) Foldon unfolding mediates the interconversion between M<sup>pro</sup>-C monomer and 3D domain-swapped dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14900-14905.
  15. Aranko, A. S., Oeemig, J. S., Kajander, T., and Iwai, H. (2013) Intermolecular domain swapping induces intein-mediated protein alternative splicing, *Nat. Chem. Biol.* 9, 616-622.
  16. Facey, S. J., and Kuhn, A. (2010) Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2343-2362.
  17. Natale, P., Bruser, T., and Driessen, A. J. M. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - Distinct translocases and mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1735-1756.
  18. Stevens, J. M., Mavridou, D. A. I., Hamer, R., Kritsiligkou, P., Goddard, A. D., and Ferguson, S. J. (2011) Cytochrome *c* biogenesis System I, *FEBS J* 278, 4170-4178.
  19. Sanders, C., Turkarslan, S., Lee, D. W., Onder, O., Kranz, R. G., and Daldal, F. (2008) The cytochrome *c* maturation components CcmF, CcmH, and CcmI form a membrane-integral multisubunit heme ligation complex, *J. Biol. Chem* 283, 29715-29722.
  20. Oikawa, K., Nakamura, S., Sonoyama, T., Ohshima, A., Kobayashi, Y., Takayama, S. J., Yamamoto, Y., Uchiyama, S., Hasegawa, J., and Sambongi, Y.

- (2005) Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>: reciprocal mutation analysis, *J. Biol. Chem.* 280, 5527-5532.
21. Hayashi, Y., Nagao, S., Osuka, H., Komori, H., Higuchi, Y., and Hirota, S. (2012) Domain swapping of the heme and N-terminal  $\alpha$ -helix in *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> dimer, *Biochemistry* 51, 8608-8616.
  22. Fisher, W. R., Taniuchi, H., and Anfinsen, C. B. (1973) On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome *c*, *J. Biol. Chem.* 248, 3188-3195.
  23. Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1983) Reassessment of Ellman reagent, *Methods Enzymol.* 91, 49-60.
  24. Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra, *Anal. Biochem.* 161, 1-15.
  25. Chen, Y. H., Yang, J. T., and Martinez, H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion, *Biochemistry* 11, 4120-4131.
  26. Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W. (1976) Improved staining procedure for detection of peroxidase-activity of cytochrome P450 on sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 75, 168-176.
  27. Daltrop, O., Allen, J. W. A., Willis, A. C., and Ferguson, S. J. (2002) In vitro formation of a *c*-type cytochrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7872-7876.
  28. Uchiyama, S., Ohshima, A., Nakamura, S., Hasegawa, J., Terui, N., Takayama, S. I. J., Yamamoto, Y., Sambongi, Y., and Kobayashi, Y. (2004) Complete thermal-unfolding profiles of oxidized and reduced cytochromes *c*, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14684-14685.
  29. Sambongi, Y., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1989) Thermostability of cytochrome *c*-552 from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*, *Biochemistry* 28, 9574-9578.
  30. Gianni, S., Travaglini-Allocatelli, C., Cutruzzolla, F., Brunori, M., Shastry, M. C. R., and Roder, H. (2003) Parallel pathways in cytochrome *c*<sub>551</sub> folding, *J. Mol. Biol.* 330, 1145-1152.
  31. Gao, T., and O'Brian, M. R. (2007) Control of DegP-dependent degradation of *c*-type cytochromes by heme and the cytochrome *c* maturation system in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 189, 6253-6259.
  32. Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., and Minoda, Y. (1984) *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic,

- aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium, *Int. J. Syst. Bacteriol.* *34*, 5-10.
33. San Francisco, B., Bretsnyder, E. C., Rodgers, K. R., and Kranz, R. G. (2011) Heme ligand identification and redox properties of the cytochrome *c* synthetase, CcmF, *Biochemistry* *50*, 10974-10985.
  34. Junedi, S., Yasuhara, K., Nagao, S., Kikuchi, J., and Hirota, S. (2014) Morphological change of cell membrane by interaction with domain-swapped cytochrome *c* oligomers, *ChemBioChem* *15*, 517-521.
  35. Lomas, D. A., and Carrell, R. W. (2002) Serpinopathies and the conformational dementias, *Nat. Rev. Genet.* *3*, 759-768.
  36. Li, K., Li, Y. C., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X. D., and Williams, R. S. (2000) Cytochrome *c* deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis, *Cell* *101*, 389-399.



## 第4章 本論文の結論と今後の展望

### 4-1. 結論

本博士論文研究では、好熱性水素細菌由来 *cyt c<sub>552</sub>* のドメインスワッピングによる多量体形成について研究を行った。

エタノール処理により *cyt c<sub>552</sub>* はN末端  $\alpha$  ヘリックスおよびヘムを含む領域でのドメインスワッピングにより多量化することを明らかにした。ウマ *cyt c* 二量体とは異なる領域を交換していたことに対しては、*cyt c<sub>552</sub>* 単量体の Trp54–Thr65 のループ領域は  $\beta$  シート様の構造を形成し、C末端  $\alpha$  ヘリックスが解離しなかったため、C末端領域でドメインスワッピングが起こらなかったと解釈した。*cyt c<sub>552</sub>* 二量体は単量体同様の密なアミノ酸側鎖パッキングを維持し高い熱安定性（解離温度：92°C）を示した。ウマ *cyt c* 二量体との熱安定性の比較より、単量体とドメインスワップ多量体の熱安定性には相関があることが分かった。DSC 測定より、*cyt c<sub>552</sub>* 二量体が単量体へ解離する際の  $\Delta H$  は正の値であったため、二量体は単量体よりエンタルピー的に有利であることが分かった。一方、ウマ *cyt c* 二量体は単量体へ解離する際、負の  $\Delta H$  を示す。このように同じタンパク質ファミリーに属する分子でも交換領域や熱力学的特徴が異なる多量体を形成することが分かった。

*cyt c<sub>552</sub>* の発現系を有する大腸菌から *cyt c<sub>552</sub>* のドメインスワップ多量体が得られた。エタノール処理によって作製した二量体と同じく、大腸菌発現系より得られた *cyt c<sub>552</sub>* 二量体では、N末端  $\alpha$  ヘリックスおよびヘムを含む領域が交換されていた。大腸菌内の *cyt c<sub>552</sub>* 濃度が増すと多量体量も増加した。また、大腸菌から得られた多量体量は A5F/M11V/Y32F/Y41E/I76V *cyt c<sub>552</sub>* で野生型 *cyt c<sub>552</sub>* より減少し、大腸菌内における *cyt c<sub>552</sub>* 多量化において、タンパク質の安定性が重要であることがわかった。発現系では、大腸菌のペリプラズム空間において *cyt c<sub>552</sub>* ホロ体とアポ体が共存しており、アポ体を含む多量体が検出された。このホロアポ複合体からドメインスワップした多量体が形成されることが示唆された。

## 4-2. 今後の展望

本研究により、cyt *c*<sub>552</sub> は安定なドメインスワップ多量体を形成することが分かった。この特性を生かし、cyt *c*<sub>552</sub> をビルディングブロックとしたタンパク質高次構造体の創成が期待できる。例えば、キメラタンパク質を用いたヘテロ多量体の構築などである。cyt *c*<sub>552</sub> とウマ cyt *c* ではスワップ領域が異なった。これにはタンパク質分子内の部分的な構造安定性の違いが寄与している可能性がある。cyt *c*<sub>552</sub> とウマ cyt *c* 以外の cyt *c* のドメインスワップ多量体構造を明らかにし、さらに NMR を用いて分子内の部分的な構造安定性を評価すればスワップ領域を決定する要因が明らかになると期待される。ホロ cyt *c*<sub>552</sub> とアポ cyt *c*<sub>552</sub> が大腸菌内で相互作用することが示唆され、他の翻訳後修飾を受けるタンパク質においてアポ体がホロ体の折れたために影響を及ぼす可能性を考慮すると、タンパク質の成熟化や多量体形成について理解が深まると期待される。

## 目録

### 学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Domain swapping of the heme and N-terminal  $\alpha$ -Helix in *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> dimer, Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Hisao Osuka, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, 2012, *Biochemistry* **51**, 8608-8616.
2. Domain swapping of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> in an *Escherichia coli* expression system, Yugo Hayashi, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, *to be submitted*.

### 参考論文

1. Maintenance of the secondary structure of horse cytochrome *c* during the conversion process of monomers to oligomers by addition of ethanol, Shun Hirota, Mariko Ueda, Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, 2012, *The Journal of Biochemistry* **152**, 521-529.

## 謝辞

本研究の遂行にあたって懇切丁寧なご指導を賜りました物質創成科学研究科の廣田俊教授に深く感謝いたします。また、スーパーバイザーならびに論文審査委員としての的確な助言をいただきました河合壯教授、上久保裕生准教授、松尾貴史准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、実験方法などを丁寧にご指導くださいました長尾聡助教、山中優助教に感謝いたします。お二人には研究以外の面でも大変お世話になりました。検討会や週刊報告会での的確なアドバイスを頂きました太虎林特任助教に感謝いたします。

X 線結晶構造解析で大変お世話になりました兵庫県立大学の樋口芳樹教授、小森博文博士、大須賀久織博士に心より感謝申し上げます。cyt *c*<sub>552</sub> 発現系を提供して下さった広島大学の三本木至宏教授に深く感謝いたします。好熱性水素細菌菌体を提供して下さった東京大学の石井正治教授、佐藤由也博士に感謝いたします。

留学生として 2 か月間私を受け入れて下さったカリフォルニア大学デービス校の Segal David 准教授をはじめ、Segal 研究室の皆様には深く感謝いたします。

事務手続き、文献複写などで大変お世話になりました超分子集合体科学研究室秘書の手島薫さんに感謝申し上げます。研究のディスカッション（と日頃の雑談）でお世話になりました王中華博士、Ari Dwi Nugraheni 博士、Sendy Junedi 博士に深く感謝いたします。研究室生活で苦楽を共にした超分子集合体科学研究室の先輩方、同期（安藤君、宇仁君、富岡君、豊福君、吉田君、特に 5 年間一緒だった藤井君）の皆様、そして後輩のみんなに感謝します。皆様からの叱咤・激励によりなんとかここまで頑張ってきたものと思います。

本研究を行うにあたり、日本学術振興会および奈良先端科学技術大学院大学支援財団より資金面において多大なご支援を頂きました。深く感謝致します。

最後に、博士課程進学を理解し、支援して下さった両親に感謝いたします。

林 有吾