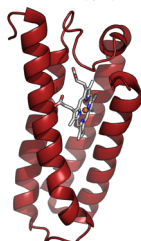


X 線結晶構造解析による Cytochrome *c'* のアルカリ構造転移の解明 X-ray Crystallographic Elucidation for the Alkaline High-spin State Transition of Iron(III) Cytochrome *c'* from *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015

高階明子,¹ 海野昌喜,^{1,2} 高妻孝光^{1,2*}¹ 茨城大学大学院理工学研究科 量子線科学専攻, 〒310-8512 水戸市文京 2-1-1¹ 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 東海村白方 2-1-1Akiko Takashina,¹ Masaki Unno,^{1,2} and Takamitsu Kohzuma^{1,2*}¹ Inst. Quantum Beam Sci., Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito, 310-8512, Japan² Frontier Appl. Atomic Sci. Res. Centre, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, 319-1106, Japan

1 はじめに

Cytochrome *c'* (Cyt *c'*) は脱窒菌や紅色光合成細菌などに見出される *c*-タイプヘムタンパク質である (図 1)。中性 pH 条件における Cyt *c'* のヘム鉄(III) の異常な電子状態は、中間スピン状態 ($S = 3/2$) と高スピン状態 ($S = 5/2$) の量子力学的混合状態と解釈されている [1]。脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* 由来の Cyt *c'* (AxCyt *c'*) では、pH が高くなるにつれて高スピン状態の寄与が高くなる一方で、pH 13 においては低スピン状態をとることが報告されている [2]。本研究では、高分解能 X 線結晶構造解析によって、酸性 (pH 6.0) とアルカリ性 (pH 10.3) 条件下における AxCyt *c'* の詳細な構造を明らかにし、pH に依存してスピン状態が変化する構造的要因を検討した。

図 1. Cyt *c'* の構造

2 実験

Alcaligenes xylosoxidans を用いて AxCyt *c'* を発現し、精製した試料から pH 6.0 と pH 10.3 の結晶をそれぞれバッチ法とハンギングドロップ蒸気拡散法により得た。回折データの測定は、PF-AR のビームライン NE3A および NW12A で行った。pH 6.0 と pH 10.3 において得られた結晶の空間群はともに $P6_322$ で、それぞれ分解能は 1.10 Å と 1.48 Å、最終的な R 因子は 14.1 % と 13.8 % であった。(PDB ID: 4WGZ, 4WGY)

3 結果および考察

AxCyt *c'* の pH 6.0、10.4 における X 線結晶構造解析の結果から、タンパク質部分のヘリックス C がスライドし、ヘリックス C のアミノ酸である Gln84 と Asp88 の水素結合環境が変化していることが見出さ

れた。また、ヘリックス C の Asn89 と、ヘリックス D のヘムが共有結合している Cys116 の隣のアミノ酸残基である Ser115 が、pH 6.0 では水素結合を形成する一方で、pH 10.4 において作製した結晶から得られた構造では水素結合が解離していることが判明した。pH がアルカリ性になる事によって引き起こされるヘリックス C の構造変化が、ヘリックス C とヘリックス D の間に形成されている Asn89 の窒素原子と Ser115 の酸素原子との間の水素結合にも影響が及び、さらに Ser115 の隣のアミノ酸である Cys116 はヘムが共有結合しているために、活性部位構造の変化にも影響が及んでいると考えられた。pH 6.0 においてはヘムが ruffle しており、Ser115 と Asn89 の水素結合が消失した pH 10.4 においてはヘムの構造が平面的になり、鉄と軸配位子の His120 の距離が長くなった [3]。タンパク質部分から脱プロトン化が起こり、水素結合ネットワークが変化したことがヘム鉄のスピン状態転移を誘起したものと考えられる (図 2)。

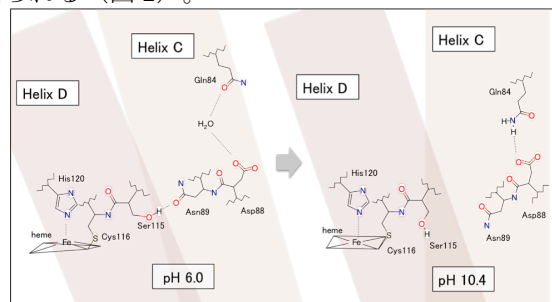


図 2. 提唱したアルカリ構造転移のメカニズム [2]。

参考文献

- [1] Weiss, R. *et al.*, *Chem. Rev.*, **106**, 2550-2579 (2006)
 [2] Takashina, A. *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **90**, 169-177 (2017)
 [3] Takashina, A. *et al.*, *Chem. Lett.*, **44**, 268-270 (2015)

成果

1. 本実験が関連する論文 (参考文献 2) は *Bull. Chem. Soc. Jpn* の Selected Paper に選出された。

* takamitsu.kohzuma.qbs@vc.ibaraki.ac.jp