

# ヘム近傍の静電的環境の変化がシトクロム *c* の機能と構造に与える影響

筑波大院数物

○三上真一、入江清史、太虎林、長友重紀、山本泰彦

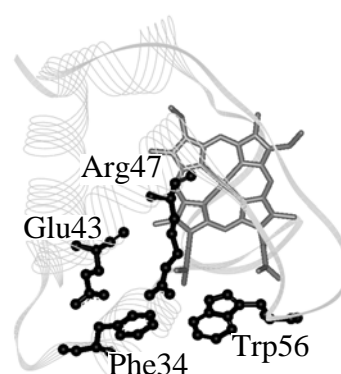
## Regulation of Redox Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c* through Alteration of Electrostatic Environment around Heme 17-propionic Acid

○Shin-ichi Mikami, Kiyofumi Irie, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

*Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> (PA) is a small redox protein that consists of 82 amino acid residues and a heme. In order to elucidate the relationship between the redox potential ( $E_m$ ) and p*K*<sub>a</sub> value of heme 17-propionic acid, we prepared four mutants of PA, i.e. F34Y, E43Y, R47L and W56F. All the residues mutated were located near heme 17-propionic acid, and hence the mutations were expected to alter the electrostatic environment around the heme side chain. The values of < 4.5, 5.0, 6.7, and 7.9 were determined as the p*K*<sub>a</sub> values of heme 17-propionic acids, differ from 6.1 for PA. And  $E_m$  of the protein changes by ~60 mV near the p*K*<sub>a</sub> value of heme 17-propionic acid. Thus both the p*K*<sub>a</sub> value of heme 17-propionic acid and pH profile of  $E_m$  in the protein can be regulated through protein engineering.

**序論** 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) シトクロム *c*<sub>551</sub> (PA, Fig. 1)は、アミノ酸 82 残基と補欠分子族のヘムからなる分子量約 9000 のタンパク質であり、ヘム鉄の酸化と還元を利用して生体内での電子伝達を行っている。通常、シトクロム *c* の機能は標準酸化還元電位 ( $E_m$ )により評価される。従来の研究より、PA の  $E_m$  はヘム側鎖 17-プロピオン酸基の電離状態に依存することが明らかとなっている。本研究では、ヘム 17-プロピオン酸基近傍のアミノ酸残基を置換した変異体 F34Y、E43Y、R47L、W56F を調製し、アミノ酸置換により誘起されたヘムの構造化学的環境の変化が、PA の  $E_m$  や電子伝達の熱力学に与える影響について解析を行った。

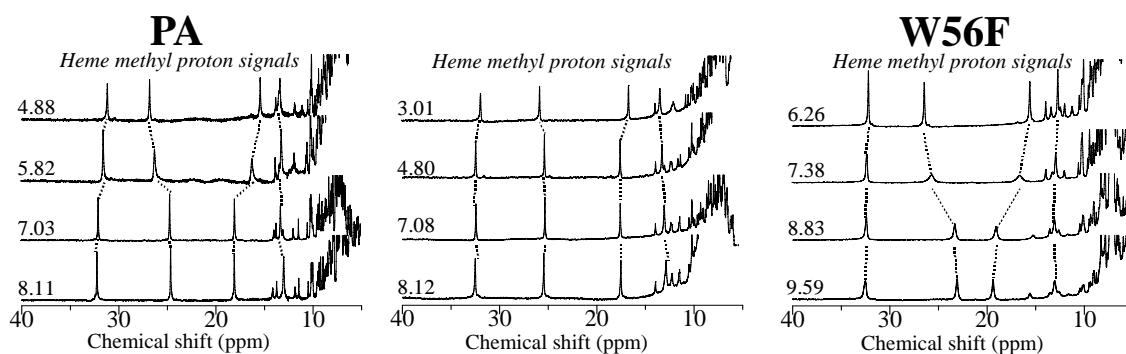


**Fig. 1** Structure of PA (PDB:351C). Residues substituted in the study are highlighted.

**結果・考察** 酸化型のシトクロム *c* ではヘム鉄の未対電子の影響を受け、ヘムメチルプロトンのシグナルは大きく低磁場シフトして観測される。ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の p*K*<sub>a</sub> は、これらのシグナルの化学シフトの pH 依存性の解析より、PA (p*K*<sub>a</sub> = 6.1)、F34Y (<4.5)、E43Y (5.0)、R47L (6.7)、W56F (7.9) と求められた (Fig. 2)。F34Y と E43Y では、アミノ酸置換により、17-プロピオン酸基に対する水素結合ドナーが新たに導入されたため p*K*<sub>a</sub> が低下し、一方、R47L、W56F では、水素結合ドナーが除去されたため、p*K*<sub>a</sub> が上昇したと考えられる。

**Keywords** : 常磁性 NMR、シトクロム *c*、酸化還元電位、熱安定性、ヘム

みかみ しんいち、いりえ きよふみ、たい こりん、ながとも しげのり、  
やまもと やすひこ



**Fig. 2** Downfield-shifted portions of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of PA and its mutants at the indicated pH.  $\text{pK}_a$  values of heme 17-propionic acids in the proteins are reflected in the pH-dependent shifts of heme methyl proton signals.

サイクリックボルタンメトリーにより  $E_m$  の pH 依存性を測定した結果、ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の  $\text{pK}_a$  に対応する pH 領域で、 $E_m$  が pH の上昇に伴い約 60 mV 低下した。この結果は、正味の電荷として +1 をもっている酸化型ヘムが、pH 上昇に伴う 17-プロピオン酸基の電離により生じた負電荷により部分的に中和され安定化されることを反映している。このように、ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の  $\text{pK}_a$  の調節を通して、 $E_m$  を変えることが可能である。

次に、17-プロピオン酸基の  $\text{pK}_a$  が還元に伴う熱力学パラメータ、特にエントロピー変化 ( $\Delta S$ ) に与える影響について解析した。 $\Delta S$  は温度に対する  $E_m$  のプロットの傾きから求められ、酸化/還元に伴うペプチド鎖の運動性の変化や、溶媒の配向様式の変化により影響を受けると考えられている。PA と F34Y、W56F の pH 6 での  $\Delta S$  (Table 1) の比較から、 $\Delta S$  と 17-プロピオン酸基の電離平衡との間に次のような関係が見いだされた。まず、PA の酸化型と還元型の  $\text{pK}_a$  を考慮すると、pH 6 では酸化型 PA の 17-プロピオン酸基の約 50% が電離しているのに対して、還元型 PA の 17-プロピオン酸基はほとんど電離していないことになる。この酸化/還元に伴う 17-プロピオン酸基の電離状態の変化が  $\Delta S$  の絶対値を増大させる要因になっていると考えることができる。疎水性ヘムポケットに存在している 17-プロピオン酸基の電離により生じた負電荷はヘムポケット内の疎水性相互作用を弱める効果があると予想されるため、酸化型 PA では、還元型 PA に比べて、ヘムポケットのパッキングが弱いと考えられ、そのことが  $\Delta S$  の絶対値の大きさに反映されていると考えることができる。一方、pH 6 では、F34Y、W56F 共に、PA の場合のような酸化/還元に伴う 17-プロピオン酸基の電離状態の変化が生じないため、PA に比べて  $\Delta S$  の絶対値が小さいと考えられる。pH 5 で、PA では  $\Delta S$  の絶対値が減少したこと、F34Y では逆に増大したことも、本研究で明らかになった  $\Delta S$  と 17-プロピオン酸基の電離平衡との関係を支持している。

**Table 1**  $\text{pK}_a$  values of heme 17-propionic acids of the proteins ( $\text{pK}_{\text{ox}}$  and  $\text{pK}_{\text{red}}$  for the values of the oxidized and reduced forms, respectively) and  $\Delta S$  values for the reduction of the proteins.

Protein	$\text{pK}_{\text{ox}}$	$\text{pK}_{\text{red}}$	$\Delta S$ ( $\text{kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
F34Y	4.5 <	5.5 <	-42
PA	5.9	7.0	-69
W56F	7.9	8.4	-36

**結論** 17-プロピオン酸基の  $\text{pK}_a$  はアミノ酸置換により調節可能であり、その  $\text{pK}_a$  の変化は  $E_m$  の pH 依存性だけでなく、還元反応の  $\Delta S$  にも影響を与えていることが示された。