

好熱性水素細菌由来シトクロム c_{552} の機能調節に関わるダイナミクスの解析

筑波大院数物¹, 農研機構 食総研², 立命館大薬³, 東大院理⁴, 近大生物理工⁵
○入江清史¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光², 北原亮³, 横山茂之⁴, 赤坂一之⁵

Characterization of Internal Dynamics of Thermophile *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552}

○Kiyofumi Irie¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, Hikaru Hemmi², Ryo Kitahara³, Shigeyuki Yokoyama⁴, and Kazuyuki Akasaka⁵
Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹, Natl. Food Res. Inst.², Dept. of Pharm., Ritsumeikan Univ.³, Dept. of Biophys. and Biochem., Univ. of Tokyo⁴, and Dept. of Biotech. Sci., Kinki Univ.⁵

In order to elucidate molecular mechanisms responsible for an apparent biphasic behavior of the temperature dependence of the redox potential of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c_{552} , its heme active site structure has been characterized through variable-temperature and -pressure NMR techniques. The study revealed a temperature-dependent conformational transition between two different protein structures, which slightly differ in the conformation of the loop bearing the Fe-bound axial Met residue. The heme environment in the protein structure which emerges at lower temperature was found to be more polar, as a result of the altered orientation of the loop with respect to the heme due to its conformational change, than that in the protein structure at higher temperature. The present study demonstrated the importance of the structural and dynamic properties of the polypeptide chain in close proximity to the heme for the redox regulation of the protein.

序 論

好熱性水素細菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)由来のシトクロム c_{552} (HT, **Fig. 1**)と緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来のシトクロム c_{551} (PA)は、一次構造の相同性が56%であり、お互いに立体構造は類似しているが、機能の指標である酸化還元電位(E_m)の温度依存性は両者で著しく異なる。 E_m の温度に対するプロットは、PAではNernstの式から予想される通り直線になるのに対して、HTでは曲率を示す。また、ヘムの電子状態の変化を敏感に反映するヘム側鎖メチルプロトンに由来するNMRシグナルは、HTの場合、低温で異常なブロードニングを示すが、PAではそのような現象は観測されない。本研究では、HTとPAのこれらの差は、両者のタンパク質のダイナミクスの差に起因するという作業仮説に基づき、高圧NMR、 ^{13}C NMRなどにより解析を行った。

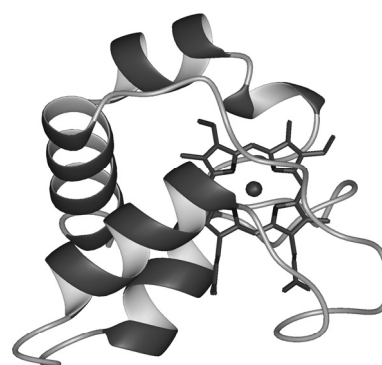


Fig. 1 Tertiary structure of HT.(PDB:1YNR)

Keywords: 常磁性 NMR、シトクロム c 、酸化還元電位、タンパク質のダイナミクス、ヘム

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、へんみ ひかる、
きたはら りょう、よこやま しげゆき、あかさか かずゆき

結果・考察

酸化型 HT のスペクトルで、常磁性シフトして観測されるヘム側鎖プロトンに由来するシグナルは、低温で異常なブロードニングを示した(**Fig. 2**)。また、HT のシグナルは、室温でも高圧にするとブロードニングした。さらに、高圧下では、温度の低下に伴い、シグナルの連続的な低磁場シフトと共に、0 °C で最大にブロードニングしたシグナルは -20 °C で先鋭化した。一方、酸化型 PA のシグナルでは、温度や圧力の変化に伴うこのような異常なブロードニングは観測されなかった。HT のシグナルは、温度変化に伴って線幅は著しく変化するものの、スピン-格子緩和時間にはあまり大きな変化は観測されないことから、このブロードニングは、HT のヘム近傍のポリペプチド鎖の内部運動の存在を反映していることが考えられる。また、HT のシグナルのブロードニングは、反磁性である還元型でも観測されることから、鉄の磁氣的性質はこのブロードニングには関連しないことが確認されている。

高圧でのシグナルの線幅の増大は、内部運動のタイムスケールが高圧下で遅くなる、すなわち構造変化に伴う運動の活性化体積が正で大きいことを示している。また、0 °C より低温では、シグナルのシフト値と線幅が変化しており、内部運動のタイムスケールが変化すると同時に、低温でタンパク質が新たな構造に変化することが反映されている。低温におけるシフト変化から、相互変換のタイムスケールは~0.1 ms であると見積られた。HT の ^{15}N ラベル体で観測される HSQC シグナルの温度および圧力依存性の解析から、ヘム近傍のループ領域での内部運動の存在が検出された。また、HT の ^1H - ^{13}C HMQC ではヘムメチル基および軸配位子 Met61 の C_βH_3 基の ^1H - ^{13}C 相関ピークは、 ^1H 、 ^{13}C 軸共に 25 から 15 °C で大きくブロードニングした(**Fig. 3A**)。さらに、Met61 を含むループ領域に近い 7、12 位のヘムメチル基は、分子内部に埋もれている 2、18 位のヘムメチル基と比較してブロードニングの程度が大きいことが示された(**Fig. 3B**)。これらの結果より、HT の E_m の異常な温度依存性は、このループ領域のダイナミクスに起因することが明らかとなった。HT と PA は、ループの構造化学的因子に関しても類似しているが、PA のループのコンフォメーションはアミノ酸 4 残基によるユニークな水素結合ネットワークにより固定されているため、構造変化が起こらないと考えられる。HT のヘムの環境は近傍のループの内部運動により影響を受けることが考えられ、そのことが E_m の異常な温度依存性に反映されていると推測される。

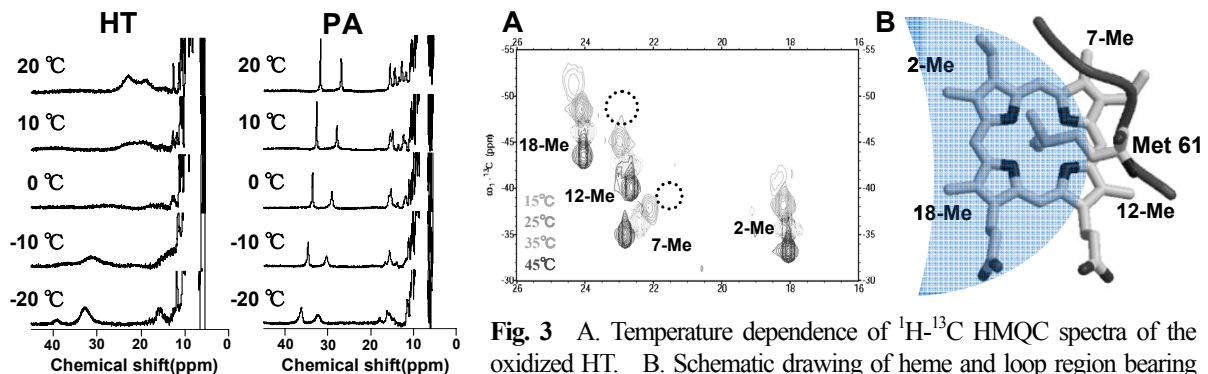


Fig. 3 A. Temperature dependence of ^1H - ^{13}C HMQC spectra of the oxidized HT. B. Schematic drawing of heme and loop region bearing axial Met 61. The region buried in protein interior and the loop region (residues 60-64) are illustrated as gray shadow and black line, respectively. (PDB:1YNR)

References

- [1] Y. Takahashi, H. Sasaki, S. J. Takayama, S. Mikami, S. Kawano, H. Mita, Y. Sambongi, and Y. Yamamoto, *Biochemistry*, **2006**, 45, 11005-11011.
- [2] S. J. Takayama, Y. Takahashi, S. Mikami, K. Irie, S. Kawano, Y. Yamamoto, H. Hemmi, R. Kitahara, S. Yokoyama, and K. Akasaka, *Biochemistry*, **2007**, 46, 9215-9224.