

## 論文内容の要旨

博士論文題目      Construction of protein oligomers with heme-coordinating methionine depleted *c*-type cytochrome mutant and resonance Raman studies on oxygenated *c*-type cytochromes  
(ヘム配位メチオニン欠損 *c*型シトクロム変異体を用いたタンパク質多量体の作製と酸素化型 *c*型シトクロムの共鳴ラマン研究)

氏 名                Zhang, Mohan

(論文内容の要旨)

近年、タンパク質の構造機能に関する知識が蓄積され、タンパク質デザインが注目されている。ドメインスワッピング (3D ドメインスワッピング) は、1994年に Eisenberg らによりジフテリア毒素タンパク質で初めて報告され、ウマシトクロム *c* (cyt *c*)、好熱性水素細菌シトクロム *c*<sub>552</sub> (HT cyt *c*<sub>552</sub>)、緑膿菌シトクロム *c*<sub>551</sub> (PA cyt *c*<sub>551</sub>) などの *c*型シトクロムでも報告されている。*c*型シトクロムでは、ヘム鉄にメチオニン (Met) とヒスチジン (His) が配位しているため、外部配位子は結合できない。本論文では、*c*型シトクロムのヘム鉄に外部配位子が結合できるようにヘム鉄に配位している Met を Ala に置換した変異体を利用し、異なる活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質をドメインスワッピングに基づいて作製するとともに、酸素化型 *c*型シトクロムのヘム鉄に結合している酸素分子の性質を共鳴ラマン分光法により調べることを目的としている。

第 1 章では、ドメインスワッピングおよび *c*型シトクロムについて説明し、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、野生型 HT cyt *c*<sub>552</sub> と Met59 をアラニン (Ala) に置換した変異型 M59A HT cyt *c*<sub>552</sub> 間のドメインスワッピングを利用し、Met/His 配位と His/H<sub>2</sub>O 配位の異なる活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質の作製を示した。さらに、HT cyt *c*<sub>552</sub> と PA cyt *c*<sub>551</sub> 間で N 末端領域のアミノ酸配列を交換した 2 種類のキメラタンパク質 (PAc-HTc と HTc-PATc) のドメインスワッピングを利用し、Met/His 配位と His/H<sub>2</sub>O 配位の活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質の作製も示した。これらの結果より、ドメインスワッピングが異なる活性部位を有する多ヘムタンパク質の構築に有用であることが示された。

第 3 章では、ウマ cyt *c* のヘム鉄に配位している Met を Ala に置換した M80A 変異体の酸素化型の共鳴ラマンスペクトルにおいて、Fe-O<sub>2</sub> 伸縮振動 ( $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ ) と O-O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{O-O}}$ ) に由来する振動バンドがそれぞれ 576 cm<sup>-1</sup> と 1148 cm<sup>-1</sup>

に観測されることを示した。 $^{18}\text{O}_2$  結合型 M80A cyt *c* では、 $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  と  $\nu_{\text{O-O}}$  振動数はそれぞれ  $544\text{ cm}^{-1}$  と  $1077\text{ cm}^{-1}$  に低波数シフトした。さらに、HT M59A cyt *c*<sub>552</sub> の酸素化型の  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  共鳴ラマンバンドは  $580\text{ cm}^{-1}$  に観測された。これらの  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数はこれまでに His を軸配位子として有するヘムタンパク質の酸素化型で報告されている  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数よりも高く、高い  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数を示す性質が *c* 型シトクロムに特有であることが明らかになった。

第4章では、本論文の総括が示されている。

以上のように、本論文では、野生型と変異型 M59A HT cyt *c*<sub>552</sub>、HT cyt *c*<sub>552</sub> と PA cyt *c*<sub>551</sub> の2種類のキメラタンパク質をそれぞれ用いて、異なる活性部位を有するヘテロ2量体タンパク質の構築が示された。さらに、酸素化型 *c* 型シトクロムの Fe-O 結合が、His を軸配位子として有する他のヘムタンパク質の酸素化型の Fe-O 結合より強いことが明らかになった。

氏名	Zhang, Mohan
----	--------------

(論文審査結果の要旨)

近年、タンパク質の構造機能に関する知識が蓄積され、タンパク質デザインが注目されている。ドメインスワッピング (3D ドメインスワッピング) は、1994年に Eisenberg らによりジフテリア毒素タンパク質で初めて報告され、ウマシトクロム *c* (cyt *c*)、好熱性水素細菌シトクロム *c*<sub>552</sub> (HT cyt *c*<sub>552</sub>)、緑膿菌シトクロム *c*<sub>551</sub> (PA cyt *c*<sub>551</sub>) などの *c* 型シトクロムでも報告されている。*c* 型シトクロムでは、ヘム鉄にメチオニン (Met) とヒスチジン (His) が配位しているため、外部配位子は結合できない。本論文では、異なる活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質をドメインスワッピングに基づいて作製するとともに、酸素化型 *c* 型シトクロムのヘム鉄に結合している酸素分子の性質を共鳴ラマン分光法により調べることを目的としている。

1. 野生型 HT cyt *c*<sub>552</sub> と Met59 をアラニン (Ala) に置換した変異型 M59A HT cyt *c*<sub>552</sub> 間のドメインスワッピングを利用し、Met/His 配位と His/H<sub>2</sub>O 配位の異なる活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質の作製を示した。さらに、HT cyt *c*<sub>552</sub> と PA cyt *c*<sub>551</sub> 間で N 末端領域のアミノ酸配列を交換した 2 種類のキメラタンパク質 (PAC-HTc と HTc-PATc) のドメインスワッピングを利用し、Met/His 配位と His/H<sub>2</sub>O 配位の活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質の作製も示した。これらの結果より、ドメインスワッピングが異なる活性部位を有する多ヘムタンパク質の構築に有用であることが示された。

2. ウマ cyt *c* のヘム鉄に配位している Met を Ala に置換した M80A 変異体の酸素化型の共鳴ラマンスペクトルにおいて、Fe-O<sub>2</sub> 伸縮振動 ( $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ ) と O-O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{O-O}}$ ) に由来する振動バンドがそれぞれ 576 cm<sup>-1</sup> と 1148 cm<sup>-1</sup> に観測されることを示した。<sup>18</sup>O<sub>2</sub> 結合型 M80A cyt *c* では、 $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  と  $\nu_{\text{O-O}}$  振動数はそれぞれ 544 cm<sup>-1</sup> と 1077 cm<sup>-1</sup> に低波数シフトした。さらに、HT M59A cyt *c*<sub>552</sub> の酸素化型の  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  共鳴ラマンバンドは 580 cm<sup>-1</sup> に観測された。これらの  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数はこれまでに His を軸配位子として有するヘムタンパク質の酸素化型で報告されている  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数よりも高く、高い  $\nu_{\text{Fe-O}_2}$  振動数を示す性質が *c* 型シトクロムに特有であることが明らかになった。

以上のように、本論文では、野生型と変異型 M59A HT cyt *c*<sub>552</sub>、HT cyt *c*<sub>552</sub> と PA cyt *c*<sub>551</sub> の 2 種類のキメラタンパク質をそれぞれ用いて、異なる活性部位を有するヘテロ 2 量体タンパク質の構築が示された。さらに、酸素化型 *c* 型シトクロムの Fe-O 結合が、His を軸配位子として有する他のヘムタンパク質の酸素化型の Fe-O 結合より強いことが明らかになった。これらの結果は、タンパク質多量体のデザインに新しい知見を与えるものであり、本論文で得られた結果はタンパク質科学分野、生体分子科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。