

耐熱性の酸化還元タンパク質の熱電変換素子としての機能

三本木 至宏

(広島大学大学院生物圏科学研究科 生物資源開発学専攻)

研究の目的

本研究の目的は、生物のエネルギー生産の分子機構を明らかにして、それを有効利用することである。具体的には、耐熱性の酸化還元タンパク質、シトクロム *c* を熱電エネルギー変換素子として利用する用途技術を確認することである。我々がこれまで蓄積してきたシトクロム *c* の操作に関する要素技術を踏まえ¹⁾、シトクロム *c* の作用機構を新たに多面的に理解し、新規エネルギー利用技術を確認する。

方法

本研究は、以下3つのサブプロジェクトからなる。

(1) シトクロム *c* の構造, 安定性, 電子伝達反応: 5種類のグラム陰性菌, (I) *Shewanella violacea* (生育温度: 8 °C), (II) *Pseudomonas aeruginosa* (同 37 °C), (III) *Hydrogenophilus thermoluteolus* (同 52 °C), (IV) *Hydrogenobacter thermophilus* (同 72 °C), および(V) *Aquifex aeolicus* (同 85 °C) を研究対象とした。これらのシトクロム *c* の熱や蛋白質変性剤に対する安定性を円二色性分散計 (CD) で、電子伝達反応に起因する酸化還元電位をサイクリックボルタンメトリー (CV) で調べた。

(2) シトクロム *c* の発現: (1) で用いたシトクロム *c* 遺伝子が大腸菌で効率的に発現させる方法を検討した。具体的な課題は、発現させる遺伝子の構成を適正化すること、および宿主である大腸菌を選択すること、である。

(3) 酸化還元電位の熱変化: (1) で用いたシトクロム *c* に対して CV により酸化還元電位の温度依存性を計測した。さらに、変異導入実験によって熱変化に対応する起電力が大きいシトクロム *c* を探索した。

結果

(1) シトクロム *c* の構造, 安定性, 電子伝達反応: (II) から (V) 由来のシトクロム *c* は、由来する細菌の生育温度の順番通りの安定性を持つことがわかった²⁾。(I) は (II) と同様の安定性を示した。この理由は、(I) のみが分子内にSS結合を持っていて、それが安定性に寄与しているためである。さらに、(V) については、pH 5.0 において 130 °C の熱や 7 M の塩酸グアニジンに対しても変性しないなど極めて安定であった。

一方、25 °C における酸化還元電位を測定し、(II) と (IV) 両者の酸化還元に伴う自由エネルギー変化と蛋白質変性の自由エネルギー変化を統一的に捉えることに成功した³⁾。

(2) シトクロム *c* の発現: (II) 由来のシトクロム *c* は、大腸菌での発現に成功し、その収量は、培養液 1 L あたり 30 mg であった。それ以外のものについては、元来の遺伝子を大

腸菌に導入するだけでは発現しなかった。そこで、(II)由来のシグナル配列を融合したところ、すべて発現に成功した²⁾。

さらに、シトクロム *c* を発現させる際に、ヘム結合を触媒するタンパク質性因子 (Dsb) の寄与を検討したところ、Dsbの必要性が確認できた。しかし、例外的に(V)由来のシトクロム *c* の発現には、Dsbがいないのみならず、Dsb非存在下で発現量が向上した⁴⁾。

(3) 酸化還元電位の熱変化：本研究で用いているシトクロム *c* すべてについて、高温より低温側で酸化還元電位が低いことを明らかにした⁵⁾。この結果は、温度を変化させることで起電力を生じさせることを意味する。また、(III)由来のシトクロム *c* に1残基変異を導入することで、安定性が上昇するとともに温度に対する電位の変化率が大きくなることを確認した。

結論

本研究の成果は、(i) シトクロム *c* の安定性と酸化還元電位の関係を明らかにしたこと、(ii) シトクロム *c* の発現を最適化したこと、(iii) 熱変化によってシトクロム *c* が起電力を生む可能性があることを示したこと、である。これらの成果は、熱に対するシトクロム *c* の安定性と電子伝達反応特性を活かした熱電変換素子の開発基盤となる。

文献

- 1) Sambongi, Y. et al., Cytochrome *c* from a thermophilic bacterium has provided insights into the mechanism of protein maturation, folding, and stability. *Eur. J. Biochem.*, 269, 3355-3361 (2002).
- 2) Oikawa, K. et al., Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂: RECIPROCAL MUTATION ANALYSIS. *J. Biol. Chem.*, 280 5527-5532 (2005).
- 3) Uchiyama, S. et al., Complete thermal-unfolding profiles of oxidized and reduced cytochromes *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14684-14685 (2004).
- 4) Kojima, N. et al., Unexpected and elevated production of *Aquifex aeolicus* cytochrome *c*₅₅₅ in *Escherichia coli* cells lacking disulfide oxidoreductases. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 69, 1418-1421 (2005).
- 5) Takayama, S. J. et al., Control of the redox potential of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*₅₅₁ through the Fe-Met coordination bond strength and pKa of a buried heme propionic acid side chain. *Biochemistry*, 44, 5488-5494 (2005).