

報道関係各位

2021年1月12日  
茨城大学

【プレスリリース】

## タンパク質のほどけた中間状態の構造を中性子によって決定 タンパク質が折りたたまれる機構の解明や創薬への展開に期待

茨城大学大学院理工学研究科の高妻孝光教授、山口峻英助教と、ユーリッヒ中性子研究センターの Henrich Frielinghaus 博士、Alexandros Koutsioubas 博士らの共同研究グループは、中性子小角散乱法 (SANS 法) を用いて、脱窒菌に見出されるシトクロム *c'* のアンフォールド中間状態 (構造がほどけた状態) の構造決定に成功しました。

バクテリアに見出されるシトクロム *c'* は、天然状態で  $\alpha$ ヘリックスが束になったヘリックスバンドル構造をもち、その内側に生理的機能の中心的役割を担うヘムを持っています。そのヘム鉄の性質はシトクロム *c'* 周辺の pH によって変化することが知られていましたが、今回研究グループは、中性子小角散乱 (SANS) という手法を用いてシトクロム *c'* の溶液中の構造変化を調べ、pH 13 付近ではアンフォールド中間状態をとることを明らかにしました。

このような基礎研究により、タンパク質のフォールディング・アンフォールディングの理解が進むことで、タンパク質をキャリアとするドラッグデリバリーシステムの設計等に貢献することが期待されます。

この成果は、国際学術雑誌である *Biomolecules* に掲載されました。

### ■背景

シトクロム *c'* は、脱窒菌や紅色光合成細菌などに見出されるタンパク質で、4本の  $\alpha$ ヘリックス<sup>\*1</sup>が束になったヘリックスバンドル型構造の内側にヘム<sup>\*2</sup>を含んでいます (図 1)。シトクロム *c'* はヘムの中心にある鉄原子を利用して、脱窒菌が行う一連の代謝反応の中で生じる一酸化窒素 (NO) との結合などに関与すると考えられています。また、シトクロム *c'* の周辺の pH が変化することで、ヘム鉄の分光学的性質<sup>\*3</sup>が変化することが知られていました。これまでに高妻孝光教授の研究グループは、超高分解能の X 線結晶構造解析によって、シトクロム *c'* を pH 10 付近のアルカリ条件にすると  $\alpha$ ヘリックス間の水素結合が変化してヘリックスバンドル型構造に緩みが生じ、ヘム鉄の構造と分光学的性質が変化するメカニズムを明らかにし、報告してきました。一方、pH 13 以上の高アルカリ性条件下では、シトクロム *c'* のヘム鉄の分光学的性質がさらに変化しますが、その構造は明らかになっていませんでした。今回、研究グループは、中性子小角散乱法を用いてシトクロム *c'* の溶液内構造を決定し、このメカニズムを明らかにしました。

### ■研究手法・成果

シトクロム *c'* の pH 構造転移を解明するために、研究グループはドイツの Research Neutron Source Heinz Maier-Leibnitz (FRM-II) にある中性子小角散乱装置である KWS-1 を用いて、中性子小角散乱データを収集しました。pH 6.4 と pH 9.6 で得られた中性子小角散乱曲線は、ヘリックスバンドル型の結晶構造から計算される散乱曲線とよく一致していました。またこの条件でシトクロム *c'* は二量体として存在していることもわかりました。pH 1.7 で測定した中性子小角散乱データの特徴は、シトクロム *c'* が本来持っていた  $\alpha$ ヘリックスなどの折りたたみ構造が完全に失われ、ランダムな構造に変性したことを示していました。一方、pH 13 では、4本の  $\alpha$ ヘリックス構造が保持されたままリンカーペプチドで繋がったアンフォールディング中間状態

であることがわかりました。このアンフォールディング中間状態の構造を詳しく調べるために、*ab initio* モデリング<sup>\*4</sup>で実験データに基づきシトクロム *c* の分子形状をダミー原子（ビーズ）の集合体として再現したところ（図2）、pH 13 では $\alpha$ ヘリックスが大きく開いた「オープンバンドル型」構造をとっていることが判明しました。ここから、シトクロム *c* をアルカリ性にしていくとヘリックスバンドル構造が緩み、さらに強いアルカリ性ではバンドル構造が開くことで、ヘム鉄の分光学的性質が変化するものと考えられます（図3）。また、pH 13 のオープンバンドル構造は、pH を中性に戻すとまた元の構造に戻る（リフォールド）することから、今回の発見はタンパク質が機能をもつ構造へと折りたたまれていく機構を解明する上でも有用であり、タンパク質を用いるバイオ医薬品開発にもつながるものといえます。

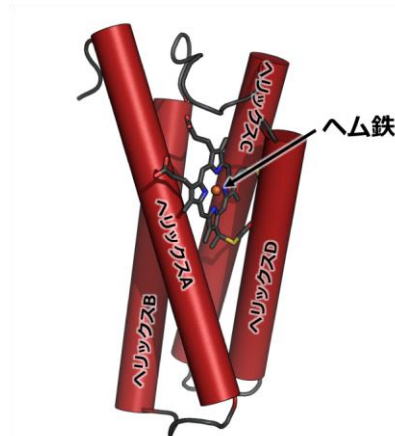


図1. 脱窒菌由来のシトクロム *c* の構造。ヘリックスA、B、C、D からなるヘリックスバンドル型構造の内側にヘムが位置している (PDB ID: 4WGY)。

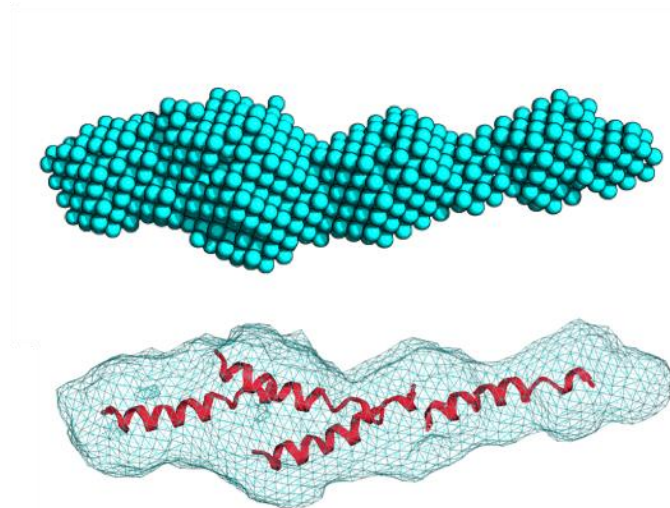


図2. 中性子小角散乱データを基に、ダミー原子（ビーズ）の集合体として、pH 13におけるシトクロム *c* の分子形状を表現したビーズモデル(上)と、ビーズモデルに4本の $\alpha$ ヘリックスを当てはめた構造(下)。

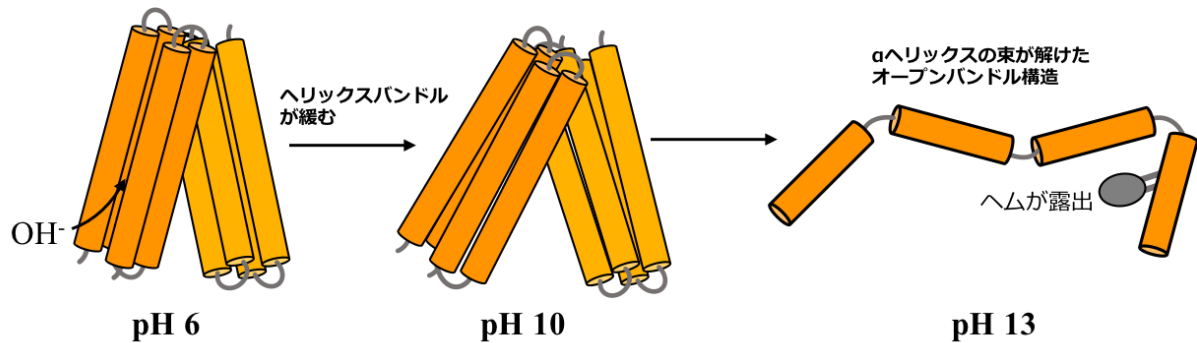


図3. シトクロム *c* の pH をアルカリ性に変えたときに起こる構造変化の模式図。pH 10 ではヘリックスバンドル構造が緩み、pH 13 ではバンドルがほどけてヘムが露出する。

### ■今後の展望

本研究によって、ヘム鉄の構造変化を伴うシトクロム *c* の構造転移の詳細が明らかになったことと同時に、アンフォールディング中間状態の構造が明らかになりました。これによって、今後、タンパク質のフォールディング・アンフォールディングの理解が進み、タンパク質をキャリアとするドラッグデリバリーシステム的设计等に繋がることが期待されます。

### ■語句の説明

- ※1 αヘリックス: タンパク質の代表的な二次構造のひとつ。タンパク質の骨格であるポリペプチド鎖が、水素結合によって折りたたまれ、アミノ酸 3.6 残基ごとに1回転する右巻きらせん状の構造。
- ※2 ヘム: ヘムとは、環状平面化合物であるポルフィリンの中心に鉄が結合した錯体のこと。
- ※3 分光学的性質: 原子・分子のエネルギー準位に応じて、物質が電磁波(光)を吸収または発光する性質。
- ※4 *ab initio* モデリング: "*ab initio*" はラテン語で「最初から」を意味する。中性子小角散乱データのみに基づいて、散乱体であるタンパク質分子の立体的な形状をダミー原子の集合体として表現する解析手法。

### ■論文情報

タイトル: Open-Bundle Structure as the Unfolding Intermediate of Cytochrome *c* Revealed by Small Angle Neutron Scattering

著者: Takahide Yamaguchi, Kouhei Akao, Alexandros Koutsioubas, Henrich Frielinghaus, and Takamitsu Kohzuma\*

雑誌: Biomolecules

公開日: 2022年1月7日