

令和 元年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07692

研究課題名(和文)耐熱性シトクロムc'のNO結合能向上に関する蛋白質工学研究

研究課題名(英文)Protein engineering studies on stable cytochrome c' aiming at enhancing NO binding

研究代表者

三本木 至宏 (Sambongi, Yoshihiro)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10222027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、酸性条件でも機能していると考えられる好酸性ユスリカヘモグロビンを手本に、耐熱性シトクロムc'であるPHCPのNO結合能を向上することを目的とした。本研究によって、PHCPのNO結合に伴う吸収スペクトル変化を追うことでNO親和性を見積もること、PHCPに変異を導入してそのNO結合能を向上することに成功した。得られたPHCP変異体は今後NOセンサー蛋白質として用途研究に供することが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、代表者が専門とする蛋白質科学分野にユスリカの形態分類学を導入した点で、異分野を融合する学術的に独創的な試みであった。本研究の成果として得られた耐熱性を保持しNO結合能が向上した蛋白質(PHCP変異体)は、血管弛緩などの生理作用を示すNOを感度よく測定できるNOセンサー蛋白質として利用できる可能性があり、ひいてはNOをマーカーとして身体ストレスを簡便に検出できる意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study was aiming at enhancing NO binding ability of thermally stable cytochrome c', PHCP, using acidophilic midge haemoglobin as a model. Through this study, we succeeded in estimating NO binding affinity by measuring absorption spectral changes upon NO binding with PHCP, and in enhancing NO binding ability of PHCP by introducing mutations into PHCP. The resulting PHCP variants will be promising materials to be used as NO sensor proteins.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：NOセンサー NO結合 蛋白質 シトクロムc'

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ストレス社会と言われる現代、そのストレスの身体影響のモニタリングに血中 NO 濃度がよく測定されている。しかし、血中 NO 濃度を簡便に測定する技術は、NO センサー蛋白質の不安定性によって実現していない。この問題を解決すれば、ストレスをより簡便に検出し、ストレスをコントロールすることができるようになると期待される。蛋白質による NO 結合については、シトクロム c' を対象として学術的な見地から研究が行われている。中でも、25°C に生育する常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来のシトクロム c' (AVCP) を用いたものが先行している。AVCP を始めシトクロム c' は一般的にホモ 2 量体として存在し、ヘムを介して NO を結合すると単量体になる。NO 結合に伴うこのサブユニットの解離現象を可視化できれば、シトクロム c' を NO センサー蛋白質として利用できる可能性がある。しかし、AVCP は常温菌由来であるため、安定性が低いことが問題である。シトクロム c' を NO センサー蛋白質として利用する上では、耐熱性が高いことが望ましい。さらにシトクロム c' は一般的 NO に対する結合能が低いことも問題であり、蛋白質工学により結合能を高めなければならない。そのための手本となる蛋白質が必要であり、本研究では好酸性ユスリカのヘム蛋白質、ヘモグロビンを手本とする。

代表者・三本木は、52°C に生育する好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* からシトクロム c' (PHCP) を精製し、AVCP よりも耐熱化されていることを実証した。続けて、PHCP、AVCP を含む 4 種のシトクロム c' の変性温度が、由来する細菌の生育温度に正に相関していることを見出し、PHCP がもっとも安定であることを確認した。一方、ユスリカの形態分類学者である分担者・河合は、これまでに 50 種以上の新種のユスリカを発見している。さらに分担者は、好酸性ユスリカ、*Chironomus sulfurosus* の継代飼育に成功し、その幼虫が酸性条件 (pH3) でも良好に生育することを見出している。

### 2. 研究の目的

本研究では 酸性条件でも機能していると考えられる好酸性ユスリカヘモグロビンを手本に、耐熱性 PHCP の NO 結合能を向上することを目的とした。本研究の具体的な課題は以下の通りである。

- 1) 耐熱性 PHCP の NO 結合能の分光測定
- 2) 好酸性ユスリカヘモグロビンの探索
- 3) 好酸性ユスリカヘモグロビンの性質
- 4) 耐熱性 PHCP の NO 結合能向上

### 3. 研究の方法

1) 耐熱性 PHCP の NO 結合能の分光測定: 代表者がこれまでに取り扱ってきている 4 種のシトクロム c' のうちもっとも耐熱化された PHCP の NO 結合能を分光測定する。具体的には、PHCP 遺伝子を大腸菌を宿主に異種発現させて得られる精製 PHCP の溶液に NO を添加することで、その吸収スペクトル変化を測定する。並行して、その他のシトクロム c' についても PHCP と同様の実験を行う。

2) 好酸性ユスリカヘモグロビンの探索: 酸性条件下で飼育した好酸性ユスリカ *C. sulfurosus* 幼虫で特異的に発現しているヘモグロビンを、mRNA の網羅的解析により突き止め、中性条件下で発現するヘモグロビンと比較する。具体的には、*C. sulfurosus* 幼虫を pH7 および pH2 で飼育し、それぞれから mRNA を抽出する。蛋白質レベルではすでに確認しているヘモグロビンアイソフォームを網羅的に収集する。

3) 好酸性ユスリカヘモグロビンの性質: 酸性条件下で発現する 2) のヘモグロビンを異種発現し、NO 結合能を 1) と同様に測定する。さらに、結晶構造解析により NO 結合に関わる構造的特徴を明らかにする。

4) 耐熱性 PHCP の NO 結合能向上: ユスリカヘモグロビンの NO 結合に関わる構造的特徴(上記 3)で特定済み)を、擬似的に耐熱性 PHCP に導入してその NO 結合能が向上するかどうか確かめる。リスクヘッジのために取り扱っていた PHCP 以外のシトクロム c' についても PHCP と同様の実験を行うとともに、NO 結合能向上のモデルとなり得るかどうか調べる。

### 4. 研究成果

#### 1) 耐熱性 PHCP の NO 結合能の分光測定

大腸菌を宿主にコドン最適化を図った PHCP 遺伝子を異種発現させることに成功した。さらに NO 濃度を変えて PHCP のガス結合に伴うスペクトルの変化を追い追うことでその結合能を評価したところ、常温菌由来の相同蛋白質である AVCP よりも PHCP の方がガス親和性が低いことを明らかにした。また、好冷菌からも相同蛋白質 SVCP の熱安定性は PHCP 及び AVCP よりも低くなるものの、ガスに対する親和性が三種の中で最も高くなることを見出した。以上の結果から、シトクロム c' 蛋白質の安定性とガス親和性には逆相関があると推定できた。

#### 2) 好酸性ユスリカヘモグロビンの探索

好酸性ユスリカ *C. sulfurosus* 幼虫を pH7 及び pH2 で飼育し、それぞれ 10g 程度の幼虫を得た。それぞれから mRNA を抽出し、ヘモグロビン遺伝子の発現を網羅的に解析したところ、本ユスリカは 20 種のヘモグロビン遺伝子を発現し、そのうち pH2 で高発現するものがあることが明らかになった。さらに、ヘモグロビン以外にも pH2 で発現を上昇させる遺伝子があることが分

かり、酸性環境適応のメカニズムを知るための研究の端緒となる可能性を見出した。また、研究分担者の河合は、国内各地から好酸性ユスリカを新たに採取しその継代飼育に成功した。

### 3) 好酸性ユスリカヘモグロビンの性質

本研究で見出した好酸性ユスリカ *C. sulfurosus* の幼虫のヘモグロビンを対象とした。pH7 よりも pH2 で高発現するヘモグロビン遺伝子を合成し、それを大腸菌を宿主に発現を試みたが、ヘムを包含するホロ蛋白質としてではなく、ヘムが結合しなアポ型蛋白質に成功した。大腸菌で発現したアポ型ヘモグロビンを調製し、試験管内でヘムを付加することでホロ型化を図ったが、成功しなかった。糖鎖修飾の制約の可能性があり、ユスリカヘモグロビンを NO 結合高結合能のモデル蛋白質とする方針を見直した。

そこで、本研究のバックアップとして実施していた研究計画に注力した。具体的には、PHCP 以外のシトクロム *c'* を数種類調製し、それらの NO 結合能を系統的に調べることにした。PHCP を含めて熱安定性が異なる 5 種類のシトクロム *c'* の NO 結合能を調べたところ、安定性が低くなればなるほど NO 結合能 が向上することを見出した。5 種類の立体構造から、ヘム周辺の非共有結合（疎水結合や水素結合）が見られないものほど NO 結合能が高いと推測できるまでに至った。

### 4) 耐熱性 PHCP の NO 結合能向上

当初の全体目的を達成することができた。すなわち、PHCP を改変して NO 結合能を向上することに成功した。ただし、当初計画では好酸性ユスリカヘモグロビンをモデルに NO 結合能を向上しようとしていたが、それを断念し、並行してバックアップ研究として行っていた研究計画に従って当初の全体目的を達成できた。具体的には、PHCP 以外のシトクロム *c'* を数種類調製し、それらの NO 結合能を系統的に調べることにした。PHCP を含めて熱安定性が異なる 5 種類のシトクロム *c'* の NO 結合能を調べたところ、安定性が低くなればなるほど NO 結合能が向上することを見出した。実際に PHCP に変異を導入し、NO 結合能の指標として NO 結合定数を上昇させることに成功した。得られた変異 PHCP の安定性は野生型に比べて低下するものの、50 までは十分に安定であり、安定でかつ NO 結合能が改善された蛋白質の構築に成功した。

今後の展開として、得られた PHCP 変異体を NO センサー蛋白質としての用途研究に供することを考えている。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Adams, H.R., Krewson, C., Vardanega, J. E., Fujii, S., Moreno-Chicano, T., **Sambongi, Y.**, Svistunenko, D., Paps, J., Andrew, C. R., Hough, M. A. One fold, two functions: cytochrome P460 and cytochrome *c'*- $\beta$  from the methanotroph *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Chem. Sci.* 10, 3031–3041 (2019). 査読あり
2. Yamanaka, M., Nakayama, R., Fujii, S., Wakai, S., **Sambongi, Y.**, Hirota, S. Conferment of CO-Controlled Dimer-Monomer Transition Property to Thermostable Cytochrome *c'* by Mutation in the Subunit-Subunit Interface. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 92, 702–709 (2019). 査読あり
3. Suka, A., Oki, H., Kato, Y., Kawahara, K., Ohkubo, T., Maruno, T., Kobayashi, Y., Fujii, S., Wakai, S., Lisdiana, L., **Sambongi, Y.** Stability of cytochromes *c'* from psychrophilic and piezophilic *Shewanella* species: Implications for complex multiple adaptation to low temperature and high hydrostatic pressure. *Extremophiles*, 23, 239-248 (2019). 査読あり
4. Fujii, S., Masanari-Fujii, M., Kobayashi, S., Kato, C., Nishiyama, M., Harada, Y., Wakai, S., **Sambongi, Y.** Commonly stabilized cytochromes *c* from deep-sea *Shewanella* and *Pseudomonas*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 82, 792-799 (2018). 査読あり
5. Yamane-Koshizawa, D., Fujii, S., Maruno, T., Kobayashi, Y., Yamanaka, M., Wakai, S., **Sambongi, Y.** Stabilization of mesophilic *Allochromatium vinosum* cytochrome *c'* through specific mutations modeled by a thermophilic homologue. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 82, 304-311 (2018). 査読あり
6. Kobayashi, S., Fujii, S., Koga, A., Wakai, S., Matubayasi, N., **Sambongi, Y.** *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> denaturation by five systematic urea derivatives that differ in the alkyl chain length. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 81, 1274-1278 (2017). 査読あり
7. Fujii, S., Oki, H., Kawahara, K., Yamane, D., Yamanaka, M., Maruno, T., Kobayashi, Y., Masanari, M., Wakai, S., Nishihara, H., Ohkubo, T., **Sambongi, Y.** Structural and functional insights into thermally stable cytochrome *c'* from a thermophile. *Protein Sci.*, 26, 737-748 (2017). 査読あり
8. Masanari, M., Fujii, S., Kawahara, K., Oki, H., Tsujino, H., Maruno, T., Kobayashi, Y., Ohkubo, T., Wakai, S., **Sambongi, Y.** Comparative study on stabilization mechanism of monomeric cytochrome *c*<sub>5</sub> from deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 80, 2365-2370 (2016). 査読あり

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 藤井創太郎, 河合幸一郎, 三本木至宏 酸耐性ユスリカ幼虫内の微生物叢の解析 日本農芸化学会中四国支部会第 53 回講演会 2019 年 1 月 26 日(高知)
2. 小林悟, 藤井創太郎, 三本木至宏 好熱菌 *Thermochromatium tepidum* 由来シトクロム *c'* の変異導入による熱安定性の変化 極限環境生物学会 2018 年度(第 19 回)年会 2018 年 12 月 8, 9 日(松江)
3. 染井希美子, 藤井創太郎, 加藤千明, 吉田尊雄, 三本木至宏 深海由来微生物の硫酸化酵素に関する機能と熱安定性の比較研究 極限環境生物学会 2018 年度(第 19 回)年会 2018 年 12 月 8, 9 日(松江)
4. 藤井創太郎, 須賀朝子, 小林悟, 三本木至宏 好熱菌および好冷菌由来のシトクロム *c'* の熱安定性と NO 親和性の関係 極限環境生物学会 2018 年度(第 19 回)年会 2018 年 12 月 8, 9 日(松江)
5. 須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* の多面的な安定化機構の解明 極限環境生物学会 2018 年度(第 19 回)年会 2018 年 12 月 8, 9 日(松江)
6. 須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* のアミノ酸レベルでの安定化機構の解明 日本農芸化学会中四国支部会第 52 回講演会 2018 年 9 月 21 日(松江)
7. 藤井創太郎, 越澤大典, 小林悟, 三本木至宏 好熱菌および好冷菌由来シトクロム *c'* の NO 親和性の解析 日本農芸化学会中四国支部会第 51 回講演会 2018 年 6 月 16 日(山口)
8. 染井希美子, 藤井創太郎, 加藤千明, 吉田尊雄, 三本木至宏 深海性二枚貝共生細菌由来の硫酸化酵素 SoxAX の機能と熱安定性の解析 日本農芸化学会中四国支部会第 51 回講演会 2018 年 6 月 16 日(山口)
9. 小林悟, 藤井創太郎, 越澤大典, 三本木至宏 好熱菌 *Thermochromatium tepidum* 由来シトクロム *c'* の熱安定性とガス結合能に関する研究 日本農芸化学会中四国支部会第 51 回講演会 2018 年 6 月 16 日(山口)
10. Sotaro Fujii, Yoshihiro Sambongi, Stability and function of a thermophilic cytochrome *c'* 3<sup>rd</sup> International Conference on Enzymology & Molecular Biology March 05-06, 2018 | London, UK
11. 須賀朝子, 藤井創太郎, 三本木至宏 深海性 *Shewanella benthica* DB6705 由来シトクロム *c'* の安定化機構の解明 極限環境生物学会 2017 年度(第 18 回)年会 2017 年 11 月 11 日~12 日(つくば)
12. 須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* の変異導入による安定性比較 特殊環境微生物セミナー2017 2017 年 10 月 6 日(広島)
13. 須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* の構造と熱安定性 農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会 2017 年 9 月 22 日(大阪)
14. 中山諒子, 山中優, 藤井創太郎, 越澤大典, 三本木至宏, 廣田俊 異なる CO 応答性を示す相同シトクロム *c'* の変異導入解析 農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会 2017 年 9 月 22 日(大阪)
15. 中山諒子, 山中優, 藤井創太郎, 越澤大典, 三本木至宏, 廣田俊 耐熱性シトクロム *c'* の 2 量体界面残基置換による CO 応答性 4 次構造変化の付与 第 17 回日本蛋白質科学会 2017 年 6 月 20~22 日(仙台)
16. 須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* の安定性の比較研究 日本農芸化学会 2017 年度京都大会 2017 年 3 月 18 日(京都)
17. 小林伸弥, 藤井創太郎, 政成美沙, 松林伸幸, 三本木至宏 変性剤の疎水基がシトクロム *c'* 変性に及ぼす影響 農芸化学中四国支部第 47 回講演会 2017 年 1 月 28 日(松江)
18. 藤井創太郎, 河合幸一郎, 三本木至宏 酸性ユスリカ *Chironomus sulfurosus* 幼虫の酸性条件下で誘導される発現遺伝子の網羅的解析 極限環境生物学会 2016 年度(第 17 回)年会 2016 年 11 月 25~26 日(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/gsbstop/interview/ja/sanbongi.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：河合 幸一郎

ローマ字氏名：Kawai Kouichiro

所属研究機関名：広島大学

部局名：生物圏科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30195028

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。