

## ヒンジループ改変によるヒトシトクロム *c* の 2 量体形成と細胞内影響

○太田 ことり・真島 剛史・藤原 綱大・小林 直也・金井 賢一・松井 貴輝・別所 康全・廣田 俊 (奈良先端大先端科技)

**Dimer formation and intracellular effects of human cytochrome *c* by hinge loop mutation** (Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology) OHTA, Kotori; MASHIMA, Tsuyoshi; FUJIWARA, Kodai; KOBAYASHI, Naoya; KANAI, Kenichi; MATSUI, Takaaki; BESSHO, Yasumasa; HIROTA, Shun

シトクロム *c* (cyt *c*) は、ミトコンドリア内膜で電子伝達を行うヘムタンパク質である。cyt *c* はアポトーシスの誘導因子としても注目されており、細胞質へ放出されると、Apaf-1 とアポトソームを形成する。当研究室では、エタノール添加、凍結乾燥、再溶解の操作を行うことで、ウマ cyt *c* が 3D ドメインスワッピングにより多量化することを明らかにしたり (Fig. 1)。ブドウ球菌スクレアーゼのドメインスワッピングにおいて、ヒンジループのアミノ酸残基を一部欠損させるとヒンジループの歪みを解消するためにタンパク質がドメインスワッピングし、2 量体が生成する<sup>2)</sup>。一方、ドメインスワッピングによるタンパク質の多量化は生体内でも起こる可能性があるが、その詳細は未解明である。本研究では、ヒト cyt *c* のヒンジループにおいて、異なる数のアミノ酸残基を欠損させた変異体を作製し、ドメインスワッピングの細胞への影響を調査することを目的とした。

ヒト cyt *c* において、ヒンジループのアミノ酸残基を 2~5 個欠損させた変異体 del8384、del82-84、del82-85、del81-85 (Fig. 2) を液体クロマトグラフィーにより精製した。各変異体の酸化型の極大吸収波長は 406 nm に観測され、野生型ヒト cyt *c* の極大吸収波長である 410 nm から若干短波長シフトし、Met80 がヘム鉄から解離していることが示唆された。各変異体の円偏光二色性スペクトル測定では野生型のスペクトルと比較して 208 nm の負のコットン効果が増大し、変異体でランダムコイル成分が若干増加した。また、222 nm の楕円率での熱変性曲線から、各変異体の熱安定性はヒンジループのアミノ酸残基の欠損数が多いほど低下することが分かった。一方、各変異体を 37°C で静置後、単量体に対する 2 量体の量をサイズ排除クロマトグラフィーにより調べたところ、del82-85 < del82-84 < del8384、del81-85 の順に 2 量体が多く形成した。以上の結果から、2 量体の形成量はヒンジループの欠損アミノ酸残基数やタンパク質の安定性に依存しなかった。今後、EGFP または HA タグを融合させた各変異体をヒト培養細胞内で発現させ、ドメインスワッピングした cyt *c* が細胞へ与える影響を評価する。

1) S. Hirota *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12854–12859 (2010).

2) M. G. Susan *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 746–751 (1995).

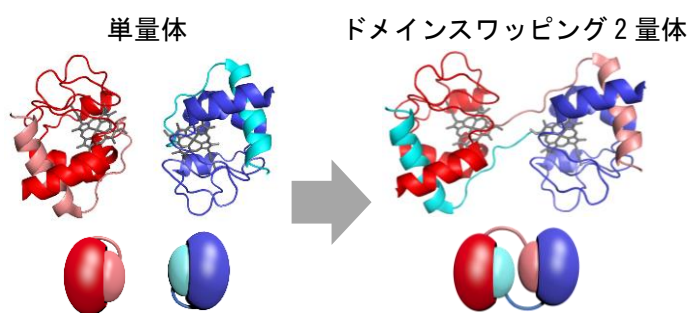


Figure 1. cyt *c* のドメインスワッピングの模式図。

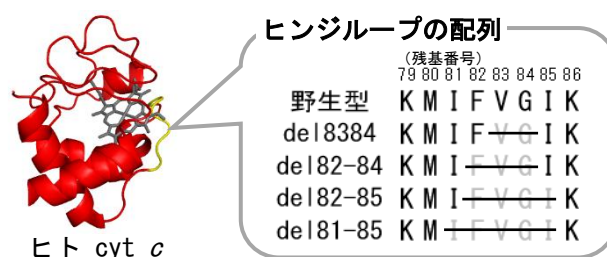


Figure 2. 本研究で用いた変異体のヒンジループのアミノ酸配列。