



Expression, purification and biochemical analysis of Zea mays cytochrome b561 and its site-directed mutants

Md. Motiur Rahman

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2008-09-25

(Date of Publication)

2009-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4440

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004440>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 Md. Motiur Rahman
博士の専攻分野の名称 博士（理学）
学 位 記 番 号 博い第 390 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 20 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Expression, purification and biochemical analysis of Zea mays cytochrome b561 and its site-directed mutants (トウモロコシ cytochrome b561 とその部位特異的変異体の発現、精製と生化学的解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 鏑木 基成
 教 授 富永 圭介
 教 授 三村 徹郎

(氏名 : Md. Motiur Rahman NO. 1)

During the past twenty-five years, evidence has accumulated on the presence of a specific high-potential ascorbate-reducible *b*-type cytochrome in the plasma membranes of higher plants. This cytochrome is named cytochrome *b*₅₆₁ according to the wavelength maximum of its α -band in the reduced form. More recent evidence suggested that this protein is homologous to a *b*-type cytochrome present in chromaffin granules of neuroendocrine cells of higher animals. These cytochromes *b*₅₆₁ probably constitute a novel class of transmembrane electron transport proteins present in large variety of eukaryotic cells. Of particular interest is the recent discovery of a number of plant genes that show striking homologies to the genes encoding for the mammalian neuroendocrine cytochrome *b*₅₆₁. A number of highly relevant structural features, including six hydrophobic transmembrane α -helices, heme ligation sites, and possible ascorbate (AsA) and monodehydroascorbate (MDA) radical-binding sites are almost perfectly conserved in all these proteins. It is our most requisite to understand the physiological roles of plant cytochrome *b*₅₆₁ and its molecular mechanism operative for the transmembrane electron transfer in the biomembranes.

My work during the last three years focused on the study of a family of transmembrane proteins, cytochrome *b*₅₆₁. Because of the high abundance of native chromaffin granule (CG) cytochrome *b*₅₆₁ and the availability of its expression and purification techniques, the nature of CG cytochrome *b*₅₆₁ has been characterized to some extent. The situation for the studies on plant cytochrome *b*₅₆₁ was very different from that of CG cytochrome *b*₅₆₁. It was almost impossible to purify plant cytochrome *b*₅₆₁ directly from plant tissues due to its lower expression level. To study their

(氏名 : Md. Motiur Rahman NO. 2)

biochemical properties in details, heterologous expression of the recombinant cytochrome *b*₅₆₁ might be essential. Therefore, we decided to exploit a heterologous expression system different from that using *Escherichia coli* cells to study the plant cytochrome *b*₅₆₁. The use of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a cellular host for the expression of recombinant proteins has become increasingly popular in recent days. *Pichia pastoris* is much easier to genetically manipulate and to culture than mammalian cells and can be grown to high cell densities under the control of alcohol oxidase (AOX1) promoter. Previously, our group had succeeded in molecular cloning of cytochrome *b*₅₆₁ cDNA from corn *Zea mays*, its functional heterologous expression in *Pichia pastoris* cells, and its purification. The aims of my Ph.D. study were belonged in two different categories. The first one was to extend the heterologous expression system for a better yield in the expression level and a better purification method. The second one was, using such purified sample, to elucidate the molecular mechanism underlying the possible AsA-specific transmembrane electron transfer catalyzed by *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁ using various molecular biological and biochemical techniques. The major findings in my Ph.D. study are summarized below.

In Chapter 1, I described about the history of cytochrome *b*₅₆₁ study and the aims of my Ph.D. study. Cytochromes *b*₅₆₁ constitute a novel class of transmembrane electron transport proteins present in large variety of eukaryotic cells, with a number of highly relevant common structural features including six hydrophobic transmembrane α -helices and two heme ligation sites. Of particular interest is the presence of a number of plant homologues that encode proteins having possible ascorbate (AsA)- and monodehydroascorbate (MDA) radical-binding sites proposed previously for

(氏名 : Md. Motiur Rahman NO. 3)

mammalian cytochrome *b*₅₆₁. Previously, our group succeeded in molecular cloning of cytochrome *b*₅₆₁ cDNA from corn *Zea mays*, its functional heterologous expression in yeast *Pichia pastoris* cells, and its purification. Therefore, the aim of my Ph.D. study is the elucidation of the molecular mechanism underlying the possible AsA-specific transmembrane electron transfer catalyzed by *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁ using various molecular biological and biochemical techniques.

In the first part of my study (as described in Chapter 2), I have succeeded in the construction of heterologous expression system of recombinant *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁, in which the 6×His-tag moiety was introduced at the COOH-terminus of the full-length *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁. I have also succeeded in its purification to a highly homogenous state. The recombinant *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁ (WTZMb₅₆₁-His₆) showed characteristics visible absorption spectra very similar to those of bovine cytochrome *b*₅₆₁ and WTZMb₅₆₁. SDS-PAGE and Western blotting analyses of purified WTZMb₅₆₁-His₆ showed a single band at 26.2 kDa. Stopped-flow analyses suggested that wild-type *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁ utilizes AsA as a physiological electron donor. Pre-treatment of the purified WTZMb₅₆₁-His₆ with diethylpyrocarbonate (DEPC) in the oxidized form caused a drastic inhibition of the electron transfer from AsA and such inhibition was protected by the presence of AsA during the treatment. These results suggested that plant cytochrome *b*₅₆₁ might perform an AsA-related transmembrane electron transfer reaction by utilizing a similar molecular mechanism with that of bovine cytochrome *b*₅₆₁. Thus, our *Pichia pastoris* expression system offers an improvement in the yield and the quality and other advantages over the existing insect and yeast expression systems for producing

(氏名 : Md. Motiur Rahman NO. 4)

membraneous cytochromes *b*₅₆₁ for the detailed studies concerning their structures and functions.

In the second part of my study (as described in Chapter 3), I focused on the investigation using the site-directed mutagenesis techniques to clarify the roles of the highly conserved amino acid residues in a conserved motif of *Zea mays* cytochrome *b*₅₆₁. The conserved motif, located near the electron accepting (low potential) heme center, was suggested to play a role in the AsA-binding. Indeed, covalent modifications with DEPC and the site-directed mutations on the conserved Lys (K83) residue near this motif resulted in a significant decrease of the electron accepting ability from AsA. Thus, we hypothesized that well-conserved residues (Y71 and R72) locating in this motif could play an important role in the AsA-binding and the electron transfer. Therefore, I generated several site-directed mutants (Y71A, Y71F, R72A, R72D, and R72E) at these sites. The visible absorption spectra of all these mutants were very similar to those of WTZMb₅₆₁-His₆, although the final reduction levels with AsA as a reductant were somewhat different each other. The effects of changing pH on the reduction processes with AsA of oxidized WTZMb₅₆₁-His₆ and of these mutants were examined by stopped-flow techniques. We found that the time course of the reduction of WTZMb₅₆₁-His₆ was very dependent on the medium pH. In a higher pH, the reduction process was very fast; whereas in a lower pH, the reduction process became very slow, as previously observed for bovine cytochrome *b*₅₆₁. This pH-dependent time-lag was almost completely lost for the R72A, R72E, and Y71A mutants. Further, for the Y71F mutant, there was a clear acceleration of the electron transfer from AsA. These results suggested that both Y71 and R72 residues have some important roles, but very different

(氏名: Md. Motiur Rahman NO. 5)

from that of K83 residue, upon the electron transfer event from AsA.

In Chapter 4, I represented a short summary of my research efforts and several suggestions for the future works in the field of cytochrome *b*₅₆₁ study.

氏名	Md. Motiur Rahman		
論文 題目	Expression, purification and biochemical analysis of <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i> ₅₆₁ and its site-directed mutants (トウモロコシ cytochrome <i>b</i> ₅₆₁ とその部位特異的変異体の発現、精製と生化学的解析)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	鏑木 基成
	副 査	教授	富永 圭介
	副 査	教授	三村 徹郎
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
<p>概要</p> <p>第1章においては、これまでに行われた cytochrome <i>b</i>₅₆₁ に関する研究の流れと本研究に至る経緯について説明してある。Cytochrome <i>b</i>₅₆₁ in chromaffin granule membrane においては、もともと cytochrome <i>b</i>₅₆₁ がウシ副腎髄質クロマフィン小胞において見いだされ、ヘムを含有する膜タンパク質であることが明らかにされていたこと;当初の精製製品の純度やその安定性に問題があり、詳細な解析を行うに至らなかったこと;しかし Tsubaki 等によってウシ <i>b</i>₅₆₁ の新しい精製法が確立され、詳細な生化学・生物物理学的解析が可能となったこと、等が記されている。Biochemical properties of bovine chromaffin granule cytochrome <i>b</i>₅₆₁ においては、得られた精製製品の物理化学的・生化学的解析によって1分子中に2個のヘム <i>b</i> が存在し、それぞれが異なる環境に存在し、異なる酸化電位を持つこと;さらにはパルスラジオリシス法による解析の結果、還元型ウシ <i>b</i>₅₆₁ がモノデヒドロアスコルビン酸(MDA)ラジカルに素早く電子を伝達することが記されている。Stopped-flow analysis of bovine cytochrome <i>b</i>₅₆₁ においては、ストップフロー法によるアスコルビン酸(AsA)から精製ウシ <i>b</i>₅₆₁ への電子伝達反応の解析の結果、AsA からの電子受容に顕著な pH 依存性があり、酸性 pH では反応速度が極端に遅くなることがわかったことについて記されている。Inhibition of the electron transfer reaction from AsA by DEPC においては、His 残基特異的の化学修飾試薬である DEPC を使った実験において、生理的電子供与体である AsA からの電子伝達の阻害が引き起こされること;同時に細胞質側のヘムの酸化還元電位が低下すること;しかしヘムの配位子 His が DEPC による化学修飾を受けているにもかかわらずヘムはタンパク質部分から脱離していないこと;それゆえヘムに配位した His 残基のイミダゾール環の非配位性窒素原子の脱プロトン化が起きており、その窒素原子が DEPC と反応していると思われること、等の研究結果が記述されている。Cytochrome <i>b</i>₅₆₁ residing in plant plasma membranes では、植物においても動物 <i>b</i>₅₆₁ と似た性質を示すヘム含有膜タンパク質が見いだされており、同様に cytochrome <i>b</i>₅₆₁ と命名されていること;植物組織からの精製が試みられて来たが、十分な成果が得られていないことが記されている。Cytochrome <i>b</i>₅₆₁ family proteins においては、ゲノムプロジェクトの進行に伴い、ヒトを含む様々な生物種のゲノム配列が解読され、cytochrome <i>b</i>₅₆₁ が高等動物や下等動物だけでなく植物にも確かに存在していることが明らかとなったこと;系統樹解析の結果から植物 <i>b</i>₅₆₁ は独自のグループを形成していること;動物種においても神経内分泌組織に存在する <i>b</i>₅₆₁ とは別種のホモログ(Dcylt 等)が見出され、鉄イオンの吸収に関与していると思われること;等の状況が紹介されている。Aims of my Ph. D. study においては、上に記述した研究知見をもとに、本課題に関する研究を始めることとなった経緯と研究目的が記されている。Organization of my Ph.D. thesis においては、本論文の全体構成についての記述がなされている。</p> <p>第2章の前半ではこの研究において用いたトウモロコシ(<i>Zea mays</i>)由来の 6xHis-tag 野生型 cytochrome <i>b</i>₅₆₁ の異種発現系の構築方法、発現方法、調製方法、精製方法、が述べてあり、そして後半では、得られた標品の生化学的性質について検証した結果について記述してある。まず前半の Preparation of <i>Zea mays b</i>₅₆₁/pPICZB construct and expression of recombinant <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i>₅₆₁ in yeast <i>Pichia pastoris</i> cells では、アルコール発酵性酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いた異種発現系の構築と細胞培養の方法が述べられている。ついで、Preparation of <i>Pichia pastoris</i> microsomal fraction においてはミクロゾーム分画調製法が述べられている。Solubilization of microsomal membranes and purification of the recombinant <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i>₅₆₁ protein においては、6xHis-tag を付加させた野生型 <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i>₅₆₁ の精製法が記述され、Biochemical analyses of the purified recombinant <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i>₅₆₁ においては生化学的解析方法が記述されている。Stopped-flow spectroscopic measurements of the recombinant <i>Zea mays</i> cytochrome <i>b</i>₅₆₁ においては、ストップフロー法による解析方法が記述されている。</p>			

氏名	Md. Motiur Rahman
----	-------------------

この章の後半では、*Properties of the recombinant Zea mays cytochrome b₅₆₁* において、精製トウモロコシ *Zea mays b₅₆₁* 標品の生化学的解析結果が記述されている。可視吸収スペクトルにおいては動物由来の *b₅₆₁* と非常に似た吸収スペクトルが酸化型・還元型の何れでも得られた。SDS-PAGE と Western blotting による解析ではほぼ単一 (~26 kDa) にまで精製された標品が得られた。さらに MALDI-TOF-MS で解析したところ、26,226 (m/z) という値が得られた。この値は理論値と比較して少し小さな値であった。NH₂ 末端のアミノ酸配列を調べたところ、1 番目の Met 残基が翻訳後に除去されていることがわかった。Trypsin あるいは V8-protease によるペプチド断片を MALDI-TOF-MS 解析したところ、意図しない変異は導入されていないことが確認された。続いて、*Electron transfer activity of the recombinant Zea mays cytochrome b₅₆₁* において、精製した *Zea mays b₅₆₁* 標品を DEPC 処理することによって、AsA からの酸化型ヘムへの電子受容反応が特異的に阻害されるという現象が動物種 *b₅₆₁* の場合と同様に起こることが記述されている。DEPC 処理した *Zea mays b₅₆₁* のプロテアーゼ消化物の MALDI-TOF-MS 解析により、DEPC によって修飾される部位が細胞質側のヘムの軸配位子である His86, His159 や保存性 Lys83 であり、動物種 *b₅₆₁* の場合と同様であったことは注目される。ストップフロー法による AsA からの電子受容反応について解析したところ、ウシ *b₅₆₁* と同様に顕著な pH 依存性を示し、酸性 pH ではその電子伝達反応が低下した。以上の結果は植物 *b₅₆₁* でも動物 *b₅₆₁* と同様な電子伝達機構が存在し、「協奏的プロトン/電子伝達機構」が機能していることを示唆するものであった。

第3章では *Pichia pastoris* による *Zea mays b₅₆₁* 異種発現系を用いて、動植物間でよく保存されているアミノ酸残基についての部位特異的変異体について解析を行った結果が記述してある。特に細胞質側の親水性ループ上に存在する AsA-結合配列と提唱されている部位中に存在する Tyr71 と Arg72 に注目した部位特異的変異体を用いた研究成果が記述してある。まず *Purification and MALDI-TOF mass spectrometric analyses of the site-directed mutants* においては、発現・精製した野生型、及び Y71A, Y71F, R72A, R72D, R72E 変異体についての MALDI-TOF-MS 解析の結果が示されている。*Visible absorption spectra of purified Zea mays cytochrome b₅₆₁ and its site-specific mutants* においては精製標品の可視吸収スペクトルについての結果が示されている。*Inhibition of the electron accepting ability of purified Zea mays cytochrome b₅₆₁ and its site-specific mutants from AsA upon modification with DEPC* においては部位特異的変異体について DEPC 処理した結果が示されている。野生型、あるいはウシ *b₅₆₁* での DEPC 処理と同じように AsA からの電子伝達が顕著に阻害されることがわかった。この結果は Tyr71 と Arg72 は DEPC 処理による電子伝達阻害機構には全く関与していないことを示している。*The pH-dependent behavior of the final reduction level* とそれに続く、*Stopped-flow analyses of Zea mays cytochrome b₅₆₁ and its mutants on the electron acceptance activity from AsA* においては、ストップフロー法により AsA からの電子受容反応の初期過程について、詳細な解析が示されている。野生型あるいは K83 変異体では酸性 pH では AsA からの電子受容が顕著に遅くなることが報告されているが、Y71A, R72A, R72E 変異体ではそのような pH 依存性がほとんど消失してしまうことが明らかとなった。さらに、Y71F 変異体では、逆に AsA からの電子伝達速度が増加するという現象が見られた。この結果は、保存性 Lys83 残基についての部位特異的変異体で観られた現象とは全く異なるものであった。これらの実験結果をもとに、*Electrochemistry of AsA and its relation to the electron transfer to cytochrome b₅₆₁* においては AsA と *b₅₆₁* との間の電気化学反応が議論され、*Possible roles of the highly conserved residues on the cytosolic side*, *Possible roles of Arg⁷²*, *Possible roles of Tyr⁷¹* においては、Lys83 が主に AsA の基質認識機構に関与していると考えられるのに対し、Tyr71 と Arg72 はかなり異なった機能的・生理的役割を果たしていることが推定された。そのような可能性のひとつとして、膜貫通電子伝達の逆反応を防止するための機構であるとの提唱がなされている。

第4章では、本研究の結論が述べられている。本研究では、6xHis-tag 付き *Zea mays b₅₆₁* の酵母を使った異種発現系の構築とその精製法を確立した。精製標品を用いた解析によって、植物 *b₅₆₁* においても AsA の介する膜貫通電子伝達反応系が働いており、動物 *b₅₆₁* と同様な分子機構に基づいて機能していることが明らかとなった。さらに *b₅₆₁* の AsA 基質認識・結合部位の一部と考えられる Tyr71, Arg72 の役割を部位特異的変異体のストップフロー法解析により調べ、保存性 Lys83 とは全く異なる役割を持つことが明らかとなった。

本研究は cytochrome *b₅₆₁* のアスコルビン酸特異的膜貫通電子伝達反応機構について研究したものであり、その反応機構を解明するための重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の Md. Motiur Rahman は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。