

「生命活動のプログラム」

平成9年度採択研究代表者

吉川 信也

(姫路工業大学理学部 教授)

## 「水素イオン能動輸送機構の構造生物学的解析」

### 1. 研究実施の概要

ウシ心筋チトクロム酸化酵素のX線回析実験を液体窒素温度で行うことに成功し、2.0Å分解能の構造を決定することに成功した。この構造に常温では検出できない水分子（したがって常温では固定されていない水分子）がいくつか見出された。その一部は第2の水素イオン能動輸送経路と予想される構造を示していた。放射光施設（Spring-8）でのビームライン建設が本年度中にほとんど完了し、平成11年度秋期より本格的に稼働する運びとなった。アフリカツメガエル卵母細胞でのウシ心筋チトクロム酸化酵素のサブユニット I, II, III の発現にほぼ成功した。平成11年度よりウシ酵素の遺伝子工学的研究が可能になることが期待される。超高精度赤外分光装置の試作も順調に進んでおり、平成11年度には試運転が可能になると思われる。

### 2. 研究実施内容

#### 1) ウシ心筋チトクロム酸化酵素のX線結晶解析（蛋白質結晶学グループ、生化学グループ）。

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶の凍結に成功し、1.74Å分解能までの反射を示すX線回析像を得ることに成功した。このためには30%程度のグリセロールと平衡化する必要があった。しかし、凍結によって同型性が失われるため、分子置換法によって構造解析を行わざるを得なかった。したがって結晶凍結条件はまだ確立したとは言えない。平成11年度Spring-8のビームラインで十分な検討を行う必要がある。

X線回析の分解能を高める方法の一つとして、現在用いられているデシルマルトシドより優れた界面活性剤の合成を試みた。今年度はデシルマルトシドを出発点とし、親水部と疎水部の大きさと構造を変化させ、結晶化条件への影響を検討した。その結果、親水部の長さや幅が重要であることが明らかになった。現在、4種類の新しい結晶が得られている。その内の一つは本酵素の至適pH付近で析出した。これらの新しい結晶は結晶化条件の最適化によりデシルマルトシド存在下で得られて

いるより良質の結晶になる可能性がある。

2.3Å分解能のX線構造をさらに詳細に検討することにより、2.8Å分解能では $\alpha$ -helixとされていた主鎖の立体構造のいくつかの部分に $3_{10}$ helixが発見された。その内の一つは $O_2$ 還元中心近傍にあるGly239を含む一回転であり、Gly239の主鎖のC=Oはペプチド鎖のN-Hと水素結合を形成していない。一方Glu242はMet71と水素結合しているが、側鎖の立体構造変化があればGly239の主鎖のC=Oと水素結合を形成することが可能である。さらにこの主鎖のC=Oは $Cu_B$ の近傍にあって、もし $Cu_B$ に $H_2O$ か $OH^-$ が配位しておれば、それと水素結合の形成が可能である。一方Glu242に水素結合しているMet71はタンパク質中の大きな水のプールを背後にもっており、もしMet71の側鎖がGlu242との水素結合を切るぐらい立体構造の変化を起こせば、Glu242はその水のプールから水素イオンを取り込むことが可能である。さらにその水のプールは水素結合のネットワークでマトリックス側分子表面と連結されている。このような構造はGlu242とMet71の立体構造変化に制御されて、 $Cu_B$ に配位した $H_2O$ あるいは $OH^-$ を経由して $Fea_3$ に結合した酸素原子( $Fea_3^{4+}=O$ )への水素イオン輸送経路が存在することを強く示唆している。

液体窒素温度でのX線構造には $O_2$ 還元中心近傍にあるTyr244に、常温では認められない水分子が水素結合していることが認められた。常温でのこの水分子の可動範囲を検討したところ、 $Fea_3$ と $Cu_B$ との間の空間には近づくことができないことが明らかになった。すでに明らかにされているように、Tyr244は水素結合のネットワークでマトリックス側の分子表面につながっているし、 $Fea_3$ に結合した $O_2$ と水素結合を形成することができる位置にある。したがってこのTyr244は $O_2$ への効率の良い水素イオン供与体であると考えられてきた。この新しく見出された低温でだけ固定されている水分子は水素イオンのプールとして機能する可能性が高い。しかしこのプールにある水素イオンはTyr244を経由してのみ $O_2$ 還元中心に輸送されると考えられる。Tyr244はHis240のイミダゾール基の窒素原子との間にフェノール基のオルト位の炭素によって共有結合を形成している。したがってこのTyr244のOH基は相当に酸性化されていると予想される。結局このTyr244と低温のときそれに水素結合している水分子とは2当量の水素イオンを保持していると考えられる。このように2当量の水素イオンがあることはFe-OOHを形成してからO-O結合の切断を促進し水分子を形成することを容易にすると考えられる。このようにして生じた $H_2O$ は $Cu_B$ に結合し、Glu242を含む水素イオン輸送系を機能させるであろう。したがって $O_2$ を2分子の水にまで還元するときの最初の2当量の水素イオンはTyr244を経由して輸送され、残りの2当量はGlu242を含む系によって $Cu_B$ に配位している水分子から伝達されると考えられる。前述の通り、

Glu242 が水のプールから水素イオンを取り込むためには、Met71 の側鎖が大きく動く必要がある。この Met71 は helix II と呼ばれる  $\alpha$ -helix 構造の中に含まれている。一方 helix II の膜間腔側の末端には水素イオン能動輸送部位である Asp51 が配置されている。したがって  $\text{Fea}_3^{4+}=\text{O}$  への水素イオン輸送に伴う Met71 の立体構造変化が、Asp51 の立体構造変化を誘起していると考えられる。水素イオン輸送経路が2つあるが、これらは決して同時に機能するのではなく、どちらか一方だけが  $\text{O}_2$  の還元程度に応じて機能すると考えられる。また Met71 と  $\alpha$ -helix によって Asp51 の立体構造変化が誘起されるのなら、水素イオン能動輸送は結合した  $\text{O}_2$  が過酸化水素レベルまで還元された後に起こると考えられる。この結論は Wikstrom らの主張を支持している。

低温の X 線構造には常温では認められない水分子が連鎖状に分子内部に配置していることが認められた。それらの水の常温での可動範囲を調べると、Z 字型の煙突状の空間であることが明らかとなった。この煙突の一方は酸化型のとき膜間腔に開口しているが他方は疎水性のアミノ酸 Phe67, Phe68 と Ala153 によって閉じられていた。しかしその閉じられた末端はマトリックス側に連結されている大きな水プールに接していた。したがってもしこの閉じられた末端が瞬間的にでも開けば、水素イオンの移動は容易に起こると考えられる。煙突の膜間腔への開口部は還元型では Ile53 によって閉じられていた。このような構造は、水素イオンを能動的に輸送することも可能であることを示している。還元型で煙突の両端が閉じられているとき、マトリックス側に近い末端が瞬間的に開くことによって水素イオンをマトリックス側から取り込むことができる。次に酸化型になったとき、膜間腔側の開口部から水素イオンを放出する。この Phe67 と Phe68 は helix II に配置されている。したがってこの立体構造変化も Met71 の働き、したがって Glu242 を経由する水素イオン輸送と共役していると考えられる。ともかくこのように結晶中の水分子の構造の温度依存性を検討することによって水の機能に関する情報が得られたことは X 線結晶構造解析法の新しい可能性を示すものである。

## 2) チトクロム酸化酵素の固有のリン脂質の構造決定 (蛋白質結晶学グループ、生化学グループ)

結晶標品に含まれるリン脂質の構造を質量分析法により脂肪酸の構造も含めて完全に決定した。またリン定量によって酵素 1 分子当りカルジオリピン 5 分子、フォスファチジルコリン 1 分子、フォスファチジルエタノールアミン 3 分子、フォスファチジルグリセロール 5 分子含まれていること、および、フォスファチジルコリンは 2 種の脂肪酸組成を示したが、その他のリン脂質は 1 種類の脂肪酸組成であった。これら全てのリン脂質は 2.3 Å 分解能の構造に認められた。また脂肪酸の立体構造はタンパク質中で極めて多様な立体構造を示していた。したがって脂肪酸の立体構

造の柔軟性によってチトクロム酸化酵素タンパク質部分の水素イオンに対する絶縁性を高めていると推定できる。

### 3) 土壌細菌およびウシ心筋酵素の発現実験 (分子生物学グループ)

土壌細菌のチトクロム酸化酵素の無細胞系遺伝子発現系を確立するための予備実験として、大腸菌での発現を試みた。その結果、本酵素の発現はタンパク質としては確認できたが、精製し酵素活性を確認するまでには至らなかった。ウシ心筋酵素のアフリカツメガエル卵母細胞での発現は酵素活性によって確認できる段階である。

### 4) 完全酸化型チトクロム酸化酵素の酸素還元中心の構造 (生化学グループ、振動分光学グループ)

完全酸化型チトクロム酸化酵素の調整法を確立し、共鳴ラマン分光法によって同位体シフトを手がかりにして酸素還元中心に結合している  $O_2$  誘導体の検出を試みた。その結果、 $670\text{cm}^{-1}$  に同位体シフトを示し、光感受性の非常に高い共鳴ラマン線を検出した。これは O-O 伸縮振動としては相当に低波数であるので O-O 結合は  $H_2O_2$  のそれより相当長いと考えられる。この結果は X線構造の結果と一致する。

### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. Peters Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara "Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase", *Science* (1998) 280:1723-1729

○T. Tsukihara and S. Yoshikawa, "Crystal Structural Studies of a Membrane Protein Complex, Cytochrome c Oxidase from Bovine Heart" *Acta Cryst.* (1998) A54:895-904.

○T. Tomizaki, E. Yamashita, H. Yamaguchi, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, "Structural Analysis of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å resolution" *Acta Cryst.* (1999) D55:31-45.

○T. Iwase, C. Varotsis, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa, "Infrared Evidence for CuB Ligation of Photodissociated CO of Cytochrome c Oxidase at Ambient Temperatures and Accompanied Deprotonation of a Carboxyl Side Chain of Protein" *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:1415-1416.