

「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

ミトコンドリア呼吸系での水素イオン能動輸送機構をそれを担う膜タンパク質複合体の立体構造も含めた化学構造変化にもとづいて解明することを目指している。最も基本となる構造情報はX線構造である。そこで、チトクロム酸化酵素のX線回析の分解能を高めるために、凍結条件の検討をさらに続けるとともに、酸化型結晶から中間体を調整する方法と装置を開発した。その結果、P型とF型の吸収スペクトルを示す結晶を得て、それぞれ1.85 および2.0 分解能で回析強度データ収集に成功した。なお、この過程で、結晶の吸収スペクトルに異方性があることが認められた。これはヘムが結晶中で規則的に配列しているためで、この性質を利用してヘムaとヘムa₃のスペクトルの分割が可能であると予想される。このスペクトルの分割はチトクロム酸化酵素研究分野での60年来の懸案であった。ウシチトクロム酸化酵素遺伝子の発現研究はその後着々と進歩し、現在ミトコンドリア遺伝子にコードされたサブユニットの発現は確認できるまでに至っている。超高性能赤外分光装置は分光部分はほぼ完成し、フローセル部分の最終的調整段階となっている。また、振動分光学グループによってプロトンの漏れのほとんどないチトクロム酸化酵素再構成系が確立されたことも今年度の重要な成果の一つである。

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、振動分光学グループ)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の凍結前の処理方法と凍結方法を昨年度に引き続きさらに改良し、まだ再現性に問題点はあるものの1.65 分解能の構造を解析が可能なX線回析像が得られた。この分解能は水素原子の位置決定のための目標であった1.7 分解能を上回るもので、X線構造解析の新たな飛躍を期待させる。

中間体結晶の固定のために長焦点の結晶用分光器をさらに改良した。それによって酸化型チトクロム酸化酵素にH₂O₂を加えて、P型とF型を作り、液体窒素により凍結してそれぞれを固定することができた。それらのX線回析強度データを収集しそれぞれ1.85 および2.0 分解能の電子密度能を得た。しかし、酸化型、

P型およびF型の活性中心に存在する分子種を同定するための | Fo-Fc | 電子密度図の計算の過程で、CuBとFea3の温度因子の異方性が検出された。そのため、異方性を含めた構造解析のためのプログラムの整備に意外に手間取った。またこのことは金属タンパク質でここまでの精度の解析がほとんど行われていなかったことを示している。 | Fo-Fc | 電子密度図はP型が酸化型の過酸化物架橋に近い構造であった。

P型とF型を調整する際に、酸化型と H_2O_2 との反応が、結晶中と溶液中とで大きく異なることが認められた。 H_2O_2 は自由に結晶格子中に浸透できるのでこの結果はP型やF型の生成に伴う大きな立体構造変化を示唆している。さらに、結晶の吸収スペクトルに異方性が認められた。これは結晶中ではヘムが規則的に配置されているためであるが、そのため溶液中のスペクトルと形が異なるので、溶液中で決定された分子吸光係数が利用できないため、P型やF型の定量に支障を来す。現在偏光によって吸収スペクトルの方位依存性を詳細に解析することを計算している。またこの方位依存性を利用してヘムaとヘムa3の吸収スペクトルを分割することを計算している。これによってチトクロム酸化酸素の研究における60年来の懸案の解決が期待できる。

2) 細菌およびウシ酸素の遺伝子発現実験 (分子生物学グループ)

細菌の遺伝子の無細胞発現系の確立のための努力が昨年度に引き続いてさらに組織的に行われた。発現量も相当に改善された。吸収スペクトルの測定も不可能ではなくなっている。ウシ酸素のミトコンドリア由来のサブユニットのペプチドの発現は個々に確認できるようになったが、まだ補欠分子族が導入されるには到っていない。しかし、細菌では成功しているので遠からず発現系を確立できると考えている。

3) チトクロム酸化酸素の活性中心の分光学的研究 (振動分光学グループ、生化学グループ)

超高性能赤外分光高度計の分光側光部はほぼ制作を完了した。現在、 CaF_2 のフローセルを含む高タンパク質濃度での試料循環装置 (フローセル中で O_2 存在下でCO解離させたから O_2 と反応させ、1回転してフローセルにもどるまでにCO結合型完全還元型酸素を再生し、フローセル直前で O_2 で飽和させるための装置) をほぼ完成している。

4) チトクロム酸化酸素の膜小胞再構成系の開発 (振動分光学グループ)

水素イオン能動輸送機能の精密な測定のために、プロトンの漏れほとんどない再構成系を確立した。1小胞にほとんど1個のチトクロム酸化酸素を組み込ませることにより、逆方向に組み込まれた酵素をもつ小胞を効率よくカラムクロマトグラフィーにより除去することができた。

その結果、ほとんど100%正方向に組み込まれた小胞を調整することができた。またリン脂質は均一で不純物の含量が非常に低い標品を用いることによって漏れをほとんど除去することができた。そのことは還元型チトクロムCを多量に加えるとプロトンの放出が認められなくなることによって示された。

5) 複合体 の精製と結晶化 (生化学グループ)

複合体 の精製法の改良を進めて、ほとんどヘムタンパク質の吸収スペクトルの認められない標品が得られるようになった。また粉末X線回析を示す微結晶が得られた。しかし標品の安定性をさらに高めるため精製法の改良を続行している。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

M. J. Fei, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, H. Yamaguchi, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima and S. Yoshikawa, "X-ray structure of azide-bound fully oxidized cytochrome c oxidase from bovine heart 2.9 Å resolution," *Acta Cryst.* (2000) D56, 529-535.

S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara, "X-ray structure and the reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase," *J. Inorg. Biochem.* (2000) 82, 1-7.

M. Aki, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa, "A new measurement system for UV resonance Raman spectra of large proteins and its application to cytochrome c oxidase," *J. Phys. Chem. B* (2000) 104, 10765-10774.

Y. Kim, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa, "Presence of the heme-oxo intermediate in oxygenation of carbon monoxide by cytochrome c oxidase revealed by resonance Raman spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 123, 757-758.

吉川信也「チトクロム」酸化酵素のはたらき」生体とエネルギーの物理 - 生命力のみなもと - 、日本物理学会編、裳華房 第8章172 - 1197

吉川信也「光合成と呼吸に共通する反応の仕組み - 電子伝達とプロトン輸送 - 」シリーズ光が拓く生命科学、第3巻 生命を支える光、日本光生物学協会編、共立出版、第3章115 - 131

吉川信也「チトクロム」酸化酵素における電子とプロトン移動の共役」シリーズ、ニューバイオフィジックス - 1電子と生命新しいバイオエナジェティックスの展開、日本生物物理学会編、共立出版、第3章125 - 142、