

「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。X 線照射の影響を正確に検証するために結晶用可視分光装置のビームをさらに細くするように改良し、X 線回折実験中に X 線が照射されているところだけの吸収スペクトルを測定したところ、1秒露光でも吸収スペクトルの変化が認められた。そこでそのような X 線の影響の無視できる構造を解明するため 400 個以上の結晶を使って短時間露光での回折強度データを収集した。一方通常の測定法によるデータから、酸化型の 1.8 Å 分解能、還元型 1.9 Å 分解能の構造が決定された。その結果ヘム a のヒドロキシファネシルエチル基が Fe_a の酸化状態によって大きな立体構造変化を示すことが明らかになった。この変化は Asp51 への水素イオン輸送に重要な役割を持っていると推定させる。チトクロム酸化酵素結晶の酸化型および還元型の a/c 面の偏光吸収スペクトルの解析の結果、溶液の吸収スペクトルには a/c 面の吸収スペクトルの寄与が大きく、b 軸方向の寄与をほとんど無視できることが明らかにされた。タンパク質領域の通常の差スペクトル法による赤外分光測定条件がほぼ確立され、Asp51 の解離はヘム a の酸化状態に制御されていることが明らかにされた。一方、超高性能赤外分光装置の最終調整の段階で種々の不具合が発見され、一部設計を変更してさらに調整を進めた。また分子生物学グループはウシチトクロム酸化酵素のサブユニット I 遺伝子を HeLa 細胞に発現させ、Asp51Asn 変異によってプロトンポンプ活性がほぼ完全に消失することを明らかにした。

2. 研究実施内容

(1) ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析(タンパク質結晶学グループ、生化学グループ、振動分グループ)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸化型 1.8 Å 分解能、還元型 1.9 Å 分解能の立体構造が決定された。その結果、還元に伴って、ヒドロキシファネシル基の OH 基と Ser382 の水素結合とが切断され、OH 基は約 110° ファネシルエチル基軸に対して回転し、Ser382 の OH 基も反転しファネシルエチル基から離された位置に移動した。その結果、水を捕捉することの出来る大きさの空洞が新しく生じた。さらに Asp51 の水素結合構造も大きく変化することが認められた。酸化型では2つの

Serine の OH 基と2つのペプチドのアミド基とが水素結合を形成しているが還元型では Ser441 との水素結合だけが残って分子表面に移動し、3つの水分子と水素結合を形成するようになる。したがって Asp51 のカルボキシル基は酸化型のときは還元型のときよりはるかに疎水的な環境にあるため、還元に伴ってプロトンが遊離すると考えられる。

SPring-8 の強い X 線の影響を検出するため、結晶用分光装置を改良し、X 線回折実験中に X 線が照射されている部位だけの吸収スペクトルを測定した。その結果、完全酸化型結晶は照射時間に比例して(全く遅延時間なしに)吸収スペクトルの変化が認められた。凍結標品の場合その変化は不可逆的でヘム a₃ の還元を示唆している。しかし、約 15 秒の照射でスペクトル変化は飽和し、それ以上の変化は認められなかった。そこで、3秒露光によって X 線回折強度データを収集し、X 線照射による構造への影響を検討する試みを開始した。3秒露光でのデータ収集のために約 400 個の結晶が必要であった。またデータ解析のためのプログラムの修正も必要であった。なお、P 型と F 型および完全還元型は X 線照射の影響を受けなかった。

プロトン輸送機構を阻害する可能性のある Zn²⁺と Cd²⁺結合型の X 線構造が決定され、それぞれは D-チャンネルの入口附近に結合していることを明らかにした。さらにシアン化合物結合型、DCCD 結合型、NO 結合型の X 線回折強度データの収集も完了し、現在構造解析を進めている。

(2) ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶の吸収スペクトル(生化学グループ、振動分光学グループ)

単斜晶系のウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶の a/c 面の吸収スペクトルの偏光特性を精密に測定し、結晶の厚みを正確に測定した。a 軸に垂直な方向と平行な方向の偏光に対しては厚みに比例した吸収強度を示した。その方向での吸光係数を用いて、偏光特性を完全に再現することができた。さらにその吸光係数にもとづいて見積もった溶液のスペクトルは実測スペクトルとほぼ一致したので、b 軸方向の吸収は a 軸、c 軸方向の吸収に対して無視できることを示している。この結果は結晶の a-c 面の無偏光スペクトルから溶液中でのスペクトルを見積もることができることを示している。現在この結果にもとづいて P 型、F 型の占有率を見積もる方法を検討している。

(3) 赤外分光学的研究(生化学グループ、振動分光学グループ)

通常の MCT 検出器附置 FTIR 装置によってタンパク質領域の酸化還元差スペクトルの測定条件の検討を本研究課題発足時より行ってきたが、今年度ほぼ確立することができた。光路長 12 ミクロンであればアミド帯も含めて 1200cm⁻¹~1800cm⁻¹ 領域で濃度に比例した強度を示すスペクトルが得られた。また高濃度のディチオナイトによってシアン化物存在下で還元滴定も行うことができた。この結果酸化還元に伴うアミノ酸側鎖の赤外スペクトル変化はほとんど Cu_A かヘム a のどちらかに帰属できることが明らかになった。また重水中での酸化型—還元型差スペクトルの 1741 cm⁻¹ の正と 1580 cm⁻¹ の負のピークはカルボキシル基の還元による解離を示唆している。この変化は Asp51 の含まれていない酵素には認められないし、還元によるプロトンの解離に伴う立体構造変化と推定できるものは Asp51 にしか認められなかったので、Asp51 に帰属できることは明らかである。

超高性能赤外分光装置のフローセル部分、検知系に不具合が認められたので、一部設計を変更し、再調整を試みているが、本年度中には解決することに成功しなかった。

(4) 細菌およびウシ酵素の遺伝子発現実験(分子生物学グループ)

プロトンポンプ系の機能に不可欠なアミノ酸残基である Asp51 は動物酵素にしか保存されていないので、Asp51 を経由するプロトンポンプ機構はほとんどこの分野で認められていない。そこで Asp51 の関与を証明する 1 方法として、ウシのサブユニット I をヒトの細胞 (HeLa 細胞) に発現し、ヒトとウシのハイブリッド酵素を作ることを試みた。まずウシのサブユニット I の遺伝子をクローニングしミトコンドリア固有のコドンを核のコドンに変換した。そのアミノ末端側にサブユニット IV のミトコンドリアへのシグナルペプチドを結合させ、カルボキシル末端にヒスチジンタグを結合させベクターに取り込ませた。そのベクターに感染した HeLa 細胞からミトプラストを精製し、電子伝達活性とプロトンポンプ活性を測定した。その結果、Asp51Asn 突然変異体はプロトンポンプ活性はほとんど失っているが電子伝達活性は野生型よりバリノマイシン存在下では強くなることが認められた。このことは Asp51 がプロトンポンプ部位であることを直接証明する結果である。なおハイブリッドが形成されていることはウシとヒトのサブユニット I に特異的な抗体によって証明することができた。さらに、チトクロム酸化酵素固有の吸収スペクトルをミトプラスト標品に確認することができた。

(5) 複合体 I および ATP 合成酵素の精製と結晶化

複合体 I の精製法をさらに進めた結果、いくつかの条件で微結晶が得られるようになったが、純度の改善を伴うような微結晶化には再現性が乏しかった。しかし、ATP 合成酵素由来の不純物の混入が結晶化条件に影響をあたえていることが認められたのでそのような不純物が除去できる条件の探索に努力した。結晶化には本年度中には至っていないが、精製法に大きな進歩があったと言える。ATP 合成酵素の精製法の改良に努力した結果、全てのサブユニットを含む標品が大量に得られるようになり、再現性に問題はあるものの微結晶も得られるようになっている。

(6) 複合体 I の初期定常状態反応速度論的解析

複合体 I ので純度の高い標品が得られていなかったので組織的な反応速度論的解析は行われていなかった。しかし、我々の標品は組織的な速度論的解析に耐える安定性と純度を持っているので初期定常状態の解析を行った。基質としてユビキノン 1(Q₁)と NADH を用いて解析したところ、Q₁ が 50 μM 以下ではロテノンによって 80% 以上阻害をうけたが 300 μM 以上では 20% 程度しか阻害されなかった。しかし、どちらの Q₁ 濃度でも Q₁ と Q₁H₂ を最初に結合する基質と最後に遊離する反応生成物とする定序反応であることが明らかになった。この結果は分子内で遠くに離れていると推定されている Q₁ の結合部位と NADH の結合部位との間に堅密な相互作用があることを示している。

3. 研究実施体制

(1) 生化学グループ

吉川信也(姫路工業大学大学院理学研究科 教授)

研究項目:・ミトコンドリアエネルギー変換膜タンパク質の結晶化

- ・X線回析実験
- ・界面活性剤の設計合成

- ・酸化還元滴定
- ・放射光ビームライン建設

(2) タンパク質結晶学グループ

月原富武(大阪大学蛋白質研究所 教授)

研究項目:・X線結晶構造解析

- ・放射光ビームライン建設

(3) 分子生物学グループ

島田秀夫(慶応大学医学部 助教授)

研究項目:・無細胞系遺伝子発現系の確立

(4) 振動分光学グループ

小倉尚志(東京大学大学院総合文化研究科 助教授)

研究項目:・赤外分光装置の設計、試作

- ・共鳴ラマン分光測光

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Y. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, K. Watanabe, K. Naoki, N. Hano and S. Yoshikawa, "Steady-State Kinetics of NADH:coenzymeQ Oxidoreductase Isolated from Bovine heart Mitochondria," *J. Bioenerg. Biomembr.* (2002), 34, 11-19.
- S.Yoshikawa, "Mitochondrial cytochrome oxidase," in Handbook of Metalloproteins (A.Messerschmidt, R.Huber, and T.Poulos, eds.) John Wiley Sons, Ltd, (2001) vol. 1, pp. 348-362.

(2) 特許出願

なし