2P077

還元型ウシ心筋チトクロム酸化酵素のX線結晶構造解析によるヘムa側鎖の構造変化

○村本 和優¹、青波 里実¹、青山 浩²、伊藤-新沢 恭子¹、小倉 尚志³、平田 邦生⁴、山下 栄樹⁴、秋津 貴城⁴、月原 富武⁴、吉川 信也¹ (¹ 姫工大・理、² 理研・生体物理化学、³ 東大院・総合文化、⁴ 阪大・蛋白研)

高等動物のチトクロム酸化酵素には酸化還元により電子伝達を担う4カ所の金属サイト(Fe_a, Fe_{a3}, Cu_A, Cu_B)が含まれ、Fe_{a3}-Cu_Bサイトにおいて酸素分子の還元反応が行われる。この反応に伴いプロトンが能動輸送され、膜内外に電気化学的勾配が形成される。これまでに、ウシ心筋酵素のX線結晶構造解析から、酸化還元に伴うサブユニットIのAsp51付近の立体構造変化が見いだされ、Asp51のプロトンポンプ機能への関与が示唆されている。今回の研究では、より高分解能での還元型酵素のX線結晶構造解析を行い、新たに酸化還元に伴うヘムa側鎖の立体構造変化が見いだされたので報告する。

還元型酵素の結晶は、酸化型結晶を嫌気的条件下で還元剤(ジチオナイト)溶液に浸すことにより作成した。この時、結晶の吸収スペクトルを顕微分光装置を用いて測定し、還元状態の確認を行った。得られた還元型結晶を100Kに急速凍結し、液体窒素中で保存することにより還元状態を保ちX線回折実験に用いた。Spring8 BL44XUビームラインにおいてX線回折実験を行った結果、1.9 Å分解能までの回折強度データが収集された。得られたデータから電子密度図を作成し、これまでに決定されている酸化型構造との比較を行った。その結果、Asp51付近の構造に加えて、ヘムaのヒドロキシルフェルネシルエチル基の水酸基付近の構造が酸化型と還元型とで異なることが見いだされた。酸化型では水酸基はSer382の側鎖と水素結合しているが、還元型ではその水素結合はなくなり水酸基は反対側にあるSer34と水素結合をしていた。また、この構造変化に伴いSer382を含む主鎖構造も変化していることが見いだされた。

K. Muramoto, S. Aonami, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, T. Ogura, K. Hirata, E. Yamashita, T. Akitsu, T. Tsukihara and S. Yoshikawa : Structural change of heme a side chain revealed by x-ray crystallography of bovine heart cytochrome c oxidase in the reduced state.

2P079

Zn²⁺、Cd²⁺によるウシ心筋チトクロム酸化酵素の活性阻害

○横尾 信次、村本 和優、伊藤-新沢 恭子、吉川 信也 (姫工大・理)

ミトコンドリア内膜にあるチトクロム酸化酵素は、酵素活性中心に結合した酸素分子とチトクロムcから受け取った電子、及びマトリックス溶液中から取り込んだプロトンとの反応を触媒して水分子を生成する。またこの反応に共役して膜内から膜外へプロトンを能動輸送する。これらのプロトンは12本のαヘリックスから成るサブユニットIの膜貫通領域中を移動する。移動経路として結晶構造を基にHチャンネル、Kチャンネル、Dチャンネルと呼ばれる各々独立した3つの経路が提唱されている。

一方で最近の研究から、光合成細菌ロドバクターの反応中心において酵素中でのプロトン移動がZn²⁺やCd²⁺の金属イオンにより阻害されることが報告された。X線結晶構造解析からは、これらの金属はプロトン移動経路の入り口付近に結合することが見いだされた。また最近になって、ロドバクターのチトクロム酸化酵素の酸素による酸化がZn²⁺により阻害されることが報告された。

本研究において我々は、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の活性に対する金属イオンの影響を調べた。活性測定の方法として、還元剤(ジチオナイト)により還元したチトクロムcの酸化速度を吸収スペクトル変化から求めた。その結果、ZnSO₄及びCdSO₄の存在下では酸化速度が低下することが見いだされた。Zn²⁺とCd²⁺とは同様の阻害効果を示し、濃度の増加に伴い阻害効果の増大が見られた。一方、MgSO₄の存在下では活性には影響が見られなかった。これらの結果は、Zn²⁺、及びCd²⁺の結合が酵素の活性を阻害することを示唆している。

S. Yokoo, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa : Inhibition of catalytic activity of bovine heart cytochrome c oxidase by Zn²⁺ or Cd²⁺.

2P078

ウシ心筋チトクロム酸化酵素のZn²⁺、Cd²⁺金属イオンの結合サイト

○平田 邦生¹、山下 栄樹¹、月原 富武¹、村本 和優²、青波 里実²、青山 浩³、伊藤-新沢 恭子²、吉川 信也² (¹ 阪大・蛋白研、² 姫工大・理、³ 理研・生体物理化学)

チトクロム酸化酵素はミトコンドリア内膜上に存在する呼吸鎖末端酵素の一つである。本酵素は、分子状酸素を水にまで還元し、それと共役してプロトンを膜の内側から外側へ能動輸送するという機能を持つ。これまでに、本酵素の様々な阻害剤結合同型、反応中間体などの結晶構造が解明され、プロトンの移動経路の分子構造が提唱されているが、その機構についての実験的な証明は必須の課題である。

最近、Zn²⁺やCd²⁺を添加すると、光合成細菌の反応中心でのプロトン移動が阻害されるという報告がなされた。また、阻害している金属原子がプロトン移動経路付近に結合していることも結晶構造解析により示された。

本酵素においても、Zn²⁺、Cd²⁺存在下では還元型チトクロムcの酸化速度の低下が観察され、これら金属イオンの結合が酵素の活性を阻害することが示唆された(横尾ら、本年年会発表データ)。そこで、ZnSO₄、CdSO₄をソーキングした本酵素の酸化型・還元型結晶の中分解能データ解析を行ったので報告する。

結晶構造からZn、Cdなどの金属イオンは、酸化型・還元型で共通してサブユニットのHis503の側鎖に結合していることがわかった。これはDチャンネルと呼ばれる水素結合ネットワークのマトリクス側の入り口にあたる部分であり、このサイトがプロトンの取り込みに関与していることが示唆された。

また、金属結合サイトをデータ間で比較すると、酸化型と還元型でHis503に対する金属の結合様式が異なることが分かった。さらに、酸化型結晶であれば、Zn及びCdの結合位置は同じで、還元型結晶でも同様であった。これにより、金属イオンによって本酵素の酸化状態が認識されているということが示唆された。

K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, K. Muramoto, S. Aonami, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa : The binding sites of Zn²⁺ and Cd²⁺ in bovine heart cytochrome c oxidase.

2P080

ウシ/ヒトハイブリッドチトクロム酸化酵素の発現系の構築

○下方 国稔¹、片山 幸江¹、島田 秀夫²、吉川 信也^{1,3} (¹CREST、²慶大・医、³姫工大・理)

【目的】ウシチトクロム酸化酵素はミトコンドリア内膜に存在し、酸素の還元反応に共役して、プロトンをマトリックスから膜間腔側へ能動輸送する。本酵素は13個のサブユニットからなる複合酵素で、サブユニット1から3はミトコンドリアの、4から13は核のDNAにそれぞれエンコードされる。これまで本酵素の酸化還元反応に応じた結晶構造変化に基づき、サブユニット1のAsp51がプロトンをたんばく内部から外部に輸送する機構が吉川らによって提唱されている。本研究では部位特異的のアミノ酸置換を用いて、このアミノ酸残基の役割を検討することを目指し、そのためウシサブユニット1をもつヒトチトクロム酸化酵素の発現系の構築を試みた。【方法】N末端にミトコンドリア輸送シグナルが付加された野生型および変異型ウシ酵素のサブユニット1遺伝子をそれぞれプラスミドpRc-CMVに挿入した。それをヒトHeLa細胞にトランスフェクトし安定導入株を得た。それぞれの株からミトコンドリアを調製し、ミトプラストにしてチトクロムc酸化活性を測定し、ミトプラストたんばく量当たりの活性を比較検討した。【結果】野生型のウシサブユニット1遺伝子およびプラスミドpRc-CMVのみが安定導入された株それぞれから調製されたミトプラストは、同程度のチトクロムc酸化活性を示した。一方、酸素還元部位近傍にあり機能に必須のTyr244をPheに置換したサブユニット1が導入された株では、チトクロムc酸化活性が1/2から1/5に低下していた。この結果は、培養細胞内でヒトのサブユニット1の代わりにウシのそれを持つハイブリッド酵素が形成されている可能性を示唆する。したがって本発現系によってウシサブユニット1のアミノ酸置換が及ぼす酵素機能への効果を検討できると期待される。

K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimada, and S. Yoshikawa : hybrid cytochrome c oxidase