2H1615

高純度のミトコンドリア NADH:ユビキノン還元酵素標品の組成と性質

盛山 純子¹、寺田 浩人¹、渡辺 憲治¹、中島 由美子^{1,2}、成相 有紀子¹、○伊藤-新澤 恭子^{1,2}、吉川 信也^{1,2} (¹ 姫路工大院、²CREST)

NADH:ユビキノン還元酵素(以下複合体I)は、ミトコンドリア呼吸鎖の最上流部に位置し、NADHを酸化しユビキノン(Q₁₀)を還元するとともにプロトンを膜の内側から外側へと能動輸送する。本酵素は発見されて40年余になるが、他の呼吸酵素複合体に比べはるかに研究が遅れている。これは、ウシ酵素の場合、少なくとも40種以上の異なったサブユニットからなるように、非常に複雑な膜タンパク複合体であることによる。

本酵素の活性はミトコンドリア膜中においてロテノンやピエリサイジンAによって阻害を受けることから、これらの阻害剤に対する感受性を保持しているか否かを精製標品の健全さの目安として精製が試みられてきた。しかし、種々の解析に耐えうるような活性、阻害剤感受性及び純度に問題のない標品は得られていなかった。そこで、我々はウシ心筋のミトコンドリア内膜をデオキシコール酸で可溶化後にPoros20HQクロマトグラフィー等を行う全行程を二日で終了する新しい精製法を確立した。得られた標品の活性はNADHとユビキノン(Q₁、Q₂又はデシルユビキノン)を基質とし20℃で測定すると、1.5-2.0 μ mol/min/ μ molであった。これらはロテノンなどの阻害剤により90%以上阻害を受けた。また、この標品には夾雑するヘムタンパク質やATPaseが存在しないため、酵素の吸収スペクトルがはじめで得られるようになった。本酵素には一分子のFMNが含まれ、このFMN量を精度よく定量することが可能となったため酵素濃度をより正確に求めることができるようになった。よって酵素あたりに結合するFe、S、Q₁₀等の量が正確に求められた。このように高純度の標品が得られたことから、今後種々の解析が本酵素についても行われることが期待される。

J. SEIYAMA, H. TERADA, K. WATANABE, Y. NAKASHIMA, Y. NARIAI, K. ITOH-SHINZAWA and S. YOSHIKAWA : Characterization of highly purified bovine mitochondrial NADH-ubiquinone reductase.

2H1645

膜貫通ヘリックスの膜挿入－解離過程

○矢野 義明、松崎 勝巳(京都大・院・生命科学)

膜タンパク質のフォールディングを解明するための重要な問題の一つに、膜貫通ヘリックスの膜挿入－解離過程がある。我々は、モデル膜貫通ヘリックスNBD-(LALAAAA)₃-NH₂を用いて、水相を介したヘリックスの脂質小胞間移動を測定し、膜貫通ヘリックスの解離の速度論と、ヘリックスの膜挿入－解離のトポロジーを研究した。このペプチドは安定なトポロジーをもつ膜貫通ヘリックスを形成し、膜中で単量体－逆平行二量体間平衡にある(Yano, Y., Takemoto, T., Kobayashi, S., Yasui, H., Sakurai, H., Ohashi, W., Niwa, M., Futaki, S., Sugimura, Y., and Matsuzaki, K. (2002) *Biochemistry* 41, 3073-3080.). NBD-ヘリックスとローダミンラベル脂質間の蛍光励起エネルギー移動を利用して測定した脂質小胞間移動のkineticsは一次速度式に従い、脂質濃度依存性を示さなかった。これらは、ペプチドの移動が脂質小胞間の衝突によるものではなく、主として水中のモノマーを介して進行することを示唆している。また、移動現象の律速段階はヘリックスの膜解離過程だと考えられる。膜解離の半減期は25℃でおよそ10時間であり、解離速度の温度依存性から、このヘリックスの膜解離の活性化エネルギーを得ることができた(+17.7 kcal/mol)。膜非透過性のジチオナイトオンによるNBDの還元消光反応によって、ヘリックスの膜に対するトポロジーを調べた。挿入、解離過程ともにトポロジー選択性はなかったが、約±100 mVの膜電位存在下では、ヘリックス挿入のトポロジーを制御しうることを明らかにした。以上のデータに基づき、このヘリックスの挿入－解離過程を説明しうるモデルを議論する。

Yoshiaki Yano and Katsumi Matsuzaki : Membrane insertion and dissociation processes of a model transmembrane helix

2H1630

計算機シミュレーションによる膜貫通ヘリックス配置予測

○小久保 裕功¹、岡本 祐幸^{1,2} (¹ 総研大・機能分子、² 分子研)

アミノ酸配列情報のみからのタンパク質立体構造予測は構造ゲノム時代の最重要課題である。特に、膜タンパク質は遺伝子の約4分の1の数を占めると言われているが、水溶性タンパク質に比べて立体構造が解明されている例が極めて少ない。我々は、膜貫通ヘリックス系タンパク質を対象とし、アミノ酸配列から計算機シミュレーションを用いて立体構造予測を実現することを目的として研究を行っている。特にバクテリオロドプシンは比較的小さい7本膜貫通系タンパク質で立体構造が知られているため、多くの立体構造形成の研究が行われてきた。そこで現在我々は具体的には、united atom の模型を用いて、バクテリオロドプシンのPDB構造の再現を試みたモンテカルロシミュレーションを行っている。その結果から分かることを出来る範囲で議論する。

H. Kokubo and Y. Okamoto : Prediction of transmembrane helix configurations by computer simulations

2H1700

固体¹³C NMR 距離測定によるリン脂質二重膜結合マストパランXの構造解析

○戸所 泰人¹、柳下 元²、木下 理加²、福島 径²、Kim S.-M.²、Kang S.-W.³、藤原 敏道¹、阿久津 秀雄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 横国大・工、³ プサン大・化)

マストパランX (MPX) はスズメバチの毒液から抽出されたアミノ酸14残基からなる両親媒性ペプチドで生体膜上のGタンパク質を活性化する。本研究ではレセプターの低分子モデルとして、リン脂質二重膜と結合した¹³C選択標識MPXの構造を固体¹³C NMR 距離測定に基づいて検討した。

MPX : I N W K G I A A M A K K L L -NH₂

ペプチド固相合成した¹³C選択標識MPX ([Gly5(¹³CO),Ala8(¹³CH₃)] MPX, [Ala7(¹³CO),Ala10(¹³CH₃)] MPX)をDPPC・DPPGからなるリン脂質二重膜に結合させたものを固体NMR測定試料とした。Gly5とAla8、Ala7とAla10のそれぞれについて回転共鳴下での炭素核間双極子結合による縦磁化の減衰を測定した。磁化の減衰から核間距離を求めるために回転共鳴シミュレーションを行った。シミュレーションによる磁化の減衰と実験で得られた磁化の減衰との比較から、核間距離はGly5(¹³C=O)とAla8(¹³H₃)が約4.5 Å、Ala7(¹³C=O)とAla10(¹³CH₃)が約4.5 Åであることがわかった。選択標識した炭素核間について距離の制限を入れX-PLORで構造計算を行なった。計算した構造のGly5のカルボニル炭素からAla10の α 炭素まで主鎖の二面角(5つの ϕ と4つの ψ)をRamachandran Plotし、右巻き α ヘリックス、 β シート領域に入る二面角の個数を調べ、二次構造の割合を計算した。その結果、回転共鳴法で得られた距離においては α ヘリックスをとる確率が高いことがわかった。距離測定と化学シフト値の二次構造依存性により、リン脂質二重膜と強く結合した状態のマストパランXの構造は少なくともGly5からAla10まで α ヘリックス構造をとっていると考えられる。

Y.Todokoro, H.Yanagishita, R.Kinoshita, K.Fukushima, S.-M.Kim, S.-W.Kang, T.Fujiwara and H.Akutsu : The Structural Analysis of Mastoparan-X Bound to Membrane by Internuclear Distance Measurements in Solid-State ¹³C NMR