2J1430

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸化還元に伴う His503 のプロトン取り込み機構

○村本 和優¹、青波 里実¹、平田 邦生²、青山 浩³、伊藤・新沢 恭子¹、山下 栄樹²、月原 富武²、横尾 信次¹、吉川 信也¹ (¹ 姫工大院・理・生命、² 阪大・蛋白研、³ 理研・播磨)

チトクロム酸化酵素はヘム a_3 -Cu_B サイトに結合した酸素分子を水分子に還元する。酸素と反応する電子はチトクロム *c* から伝達され、プロトンはミトコンドリアの内側から取り込まれる。酵素表面からヘム a_3 -Cu_B サイトまでのプロトンの移動経路として、結晶構造からサブユニット I 内の 2 つの独立した経路 (D-, K-パス) が提唱されている。これまでに、Zn²⁺、Cd²⁺ が D-パス入り口の His503 に結合することが結晶構造解析により見いだされ、D-パスにおけるプロトンの取り込みを阻害することが示唆された。更に、Zn²⁺、Cd²⁺ と His503 との結合様式は酵素の酸化還元状態により異なり、His503 のイミダゾール基が回転することが見出された。今回、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸化型、還元型結晶の X 線結晶構造解析を行うことにより、Zn²⁺、Cd²⁺ が結合していない状態での His503 の構造変化について調べた。SPRing8, BL44XU で収集された酸化型、還元型の回折データを使用し、それぞれ 1.8 Å、1.9 Å で構造精密化を行った。その結果、Cd²⁺ 結合型の場合と類似して、His503 に結合した水分子の位置が酸化還元状態により異なることが見出され、His503 のイミダゾール基が回転していることが明らかになった。この構造変化は次のようなプロトン取り込み機構を示唆している。還元型のとき His503 のイミダゾール基と D-パスの入り口にある Asp91 の COO⁻ とを水分子が水素結合によって架橋している。イミダゾール基と COO⁻ は一般塩基であるので、プロトンを水分子上に捕捉する。酸化型になると、イミダゾールとこの水分子との水素結合は切断されるが水相にはさらされない。したがって水分子上のプロトンは COO⁻ に捕えられ、D-パスに送り込まれる。

K. Muramoto, S. Aonami, K. Hirata, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoko-o and S. Yoshikawa : Redox-driven collection of protons by histidine 503 of bovine cytochrome *c* oxidase.

2J1500

人工ヘムタンパク質のデザインと実験室進化

○石田 学^{1,2}、磯貝 泰弘²、佐藤 匡史³、奥 忠武³、城 宜嗣^{1,2} (¹ 姫工大・理・生命科学、² 理研・生体物理化学、³ 日大・生物資源科学)

我々は、天然には存在しないアミノ酸配列のタンパク質を設計し、実際に「つくる」ことを通じて、天然タンパク質の変異体研究からは得る事ができなかったタンパク質の構造と機能の関係を理解する事を目的として研究を行っている [1]。

人工ヘムタンパク質の骨組として、天然のタンパク質に数多く見られる 4 ヘリックスバンドルモチーフを選んだ。4 ヘリックスバンドルは人工タンパク質のターゲット構造としてポピュラーで、その高い対称性や構造の単純さから設計が容易である [2]。本研究では、 α ヘリックス傾向性の高いアミノ酸を車輪図の heptad repeat ((abcdefg) × n) に基づいてならべることによって、人工ヘムタンパク質 (A 1) を設計した。設計したアミノ酸配列をコードする人工遺伝子を作製し、大腸菌を用いてタンパク質を合成した。得られた A 1 は、設計通りの α ヘリックス構造をもち、1 分子当たり 2 つのヘムを特異的に結合した。ヘムの親和性は $K_d = 10^{-8} \sim 10^{-6}$ M と一般的な天然ヘムタンパク質よりも低いものであった。

天然のヘムタンパク質が持つ高いヘム親和性と機能は、ヘム近傍にあるアミノ酸の配置が重要であると考えられる。そこで、この A 1 を出発として、 ϵ 型ヘムの導入や実験室進化の手法を用いて、新しい人工タンパク質の合成を行っている。 ϵ 型ヘムを有する人工ヘムタンパク質は、 ϵ 型シクロームに共通の配列モチーフ (C-X-X-C-H) を A 1 に当てはめることにより設計した。また、実験室進化に関しては、疎水性コアのアミノ酸をランダム変異させ、ファージディスプレイ法を用いて、ヘムとの結合でスクリーニングする系を開発中である。

1. Y. Isogai *et al.*, *Protein Eng.* **15**, 2002 (in press).

2. D. E. Robertson *et al.*, *Nature* **368**, 425-432, 1994.

M. Ishida, Y. Isogai, T. Satoh, T. Oku and Y. Shiro : Design and laboratory evolution of artificial heme proteins

2J1445

ウシ心筋チトクロム酸化酵素サブユニット III の役割：酸素透過経路への DCCD 結合構造

村本 和優¹、青波 里実¹、倉内 毅¹、青山 浩²、山下 栄樹³、平田 邦生³、月原 富武³、伊藤・新沢 恭子¹、○吉川 信也¹ (¹ 姫工大院・理・生命、² 理研・播磨、³ 阪大・蛋白研)

チトクロム酸化酵素はミトコンドリアにある膜タンパク質で、酸素分子の水分子への還元反応を触媒する。酸素分子はサブユニット I の膜貫通領域にあるヘム a_3 -Cu_B サイトに結合する。これまでの X 線結晶構造解析による研究から、ヘム a_3 -Cu_B サイトへの酸素分子の透過経路 (またはヘム a_3 -Cu_B サイトからの水分子の経路) となりうる構造が 3ヶ所に見出されている。それらのうちの 1 つは、サブユニット III の膜貫通ヘリックス II-VI 間から、ヘリックス I-III 間、サブユニット I のヘリックス IV-V 間、II-VI 間を通り、ヘム a_3 -Cu_B サイトへつながら経路である。一方、これまでの生化学的研究からサブユニット III のヘリックス III にある Gln90 にジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) が結合し、酵素活性を阻害することが報告されている。本研究では、DCCD が結合した酵素の X 線結晶構造解析を行い、DCCD の結合による立体構造変化、ならびにサブユニット III の機能について検討した。DCCD 結合型酵素の結晶は、DCCD を含む溶液中に結晶を浸すことにより作成した。得られた結晶を 100K で急速凍結した後、液体窒素中に保存し、SPRing8 BL44XU ビームラインにおいて X 線回折実験を行った。得られた回折強度データを 2.35 Å 分解能で解析した結果、Gln90 に結合した DCCD の電子密度、ならびに付近にあるリン脂質の脂肪酸残基の構造変化が見出された。更に、分子表面の計算から DCCD が結合した構造では、上記の経路の入り口付近が塞がることが分かった。これらの結果は、酸素分子 (水分子) がこの経路を移動すること、及び DCCD の結合は移動の障害となり酵素活性の阻害を引き起こすことを示唆している。

K. Muramoto, S. Aonami, T. Kurauchi, H. Aoyama, E. Yamashita, K. Hirata, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh and S. Yoshikawa : Role of the subunit III in bovine heart cytochrome *c* oxidase: DCCD-bound structure of putative oxygen pathway.

2J1515

Synechocystis hemeoxygenase によるヘム分解特性

○右田 たい子¹、張 旭紅²、吉田 匡² (¹ 山口大・農・生物機能科学、² 山形大・医・生化学)

Heme oxygenase(HO) は、酸素と還元当量を用いてヘムを Fe(III) イオンと biliverdin および CO に分解する oxidoreductase である。哺乳類の他いくつかの病原菌、さらに原核植物や原始藻類においても存在が知られている。著者らは藍藻の一種である *Synechocystis* Sp. PCC6803 の recombinant タンパク (Syn HO) を得、ヘム複合体の形成やその分光学的特性について既に報告している。本研究では、Syn HO によるヘム分解過程について UV-VIS および EPR 分光法を用いて検討した。Syn HO は Ascorbate の存在下で heme を biliverdin に転換するが、その速度は同様の条件下での rat HO の反応に比し約 5 倍遅い。一方、NADPH/cytochrome P450 reductase の下での反応は、oxyheme が蓄積しこれから verdoheme への転換が極めて遅く、これは rat HO での速やかな反応と好対照をなす。この oxyheme-Syn HO 複合体に 40 当量の ascorbate を作用させると、速やかに oxy 体は消失した。あらかじめ ascorbate と reductase を含む溶液中で NADPH(6eq) を作用させると、oxy 体以降の分解反応の速度低下が ascorbate の濃度に応じて軽減され、360 当量では rat HO の ascorbate (1200 eq) による反応と同程度まで加速された。EPR で観測すると、1.5 eq の NADPH で ferric heme の EPR 信号はほぼ消失しさらに 135 eq の ascorbate の添加で完全に消失した。この試料の UV-VIS spectrum から verdoheme の生成が確認された。したがって、heme-SynHO は heme-rat HO に比べヘム鉄の酸化還元電位が低く ascorbate では oxy 体の形成が不利であるため反応が遅く、また NADPH/reductase では oxy 体が安定で、hydroxyheme への転換にはさらに電子が必要であることを示唆している。藻類における本来の還元系と考えられている ferredoxin/reductase での反応についても検討した。

C. T. Migita, X. Zhang and T. Yoshida : Characterization of the heme-catabolic reaction of *Synechocystis* hemeoxygenase