B229

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元中心のシアン化物結合構造

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

チトクロム酸化酵素の活性阻害剤であるシアン化物(CN⁻)は、酸素還元中心(ヘム a_3 -Cu_B サイト)に結合する。以前の研究において、CN⁻ 結合酸化型酵素の 2.8 Å 分解能での X 線構造解析を行ったところ、ヘム a_3 -Cu_B サイトに結合したシアン化物の電子密度が見いだされた。しかし、シアン化物の配位様式を検討するには分解能が不十分であった。そこで、本研究では高分解能 X 線構造解析を行うことにより、酸化型、還元型酵素におけるシアン化物の配位様式を調べた。従来の方法により作成した酸化型、及び還元型酵素の結晶に KCN を添加し、CN⁻ 結合還元型の生成は結晶の吸収スペクトル変化により確認した。得られた結晶を 100 K の窒素気流で急速凍結し SPring8 BL44XU にて X 線回折実験を行った結果、CN⁻ 結合酸化型では 2.0 Å、CN⁻ 結合還元型では 2.2 Å 分解能において Completeness 90% 以上、 R_{merge} 10% 以下の回折データが得られた。MR/DM 法により電子密度を計算した結果、酸化型、還元型共に Fe_{a3} と Cu_B との間に電子密度が見いだされた。ただし、還元型では酸化型と比べて電子密度が低かった。構造精密化計算の結果、酸化型ではシアン化物は Fe_{a3} と Cu_B を架橋する配位構造をとり、還元型はヘムの軸方向から傾いて Fe_{a3} に配位していることが分かった。更に、複数の結晶について独立に回折データを収集し解析した場合にもほぼ一致した結果が得られた。

K. Muramoto, M. Hara, S. Aonami, K. Hirata, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Kurauchi, S. Yokoo, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara and S. Yoshikawa : X-ray structure of cyanide-bound oxygen-reduction site in bovine cytochrome *c* oxidase

B231

ウシ心筋チトクロム酸化酵素に特異的に結合する脂質

○寺田 浩人¹、山崎 明子¹、伊藤・新沢 恭子¹、蓼原 吉輝¹、青山 浩²、杉村 高志¹、月原 富武³、吉川 信也¹ (¹ 姫工大・院・理、² 理研・播磨、³ 阪大・蛋白研)

ミトコンドリア呼吸鎖複合体は脂質二重膜に埋まった形で機能しており、酵素複合体に特異的に結合する脂質が、その構造や機能に重要な役割を果たしていると考えられている。現在までに、1.8 Å 分解能での X 線結晶構造解析により、ウシ心筋チトクロム酸化酵素には、1 酵素あたり 33 個の脂肪酸が酵素複合体中に存在することが確認されている。しかし、X 線結晶構造解析では分子中に特異的に固定されていない部分は、その電子密度から構造を正確に予測することができないため、これらの脂肪酸がどのような脂質に由来するものであるのかを決定することは不可能である。従って、酵素の詳細な構造や機能の解析には、X 線結晶構造解析以外の生化学的手法による分析も不可欠である。まず、酵素に含まれる P の定量を行ったところ、酵素 1 分子あたりに P は 13 個存在することがわかった。そのうち 1 個はリン酸化された Thr に由来するもので、残りの 12 個は、これまでの分析により、それぞれ特定の脂肪酸をもった一定の構造のホスファチジルコリン 1 個、ホスファチジルグリセロール 4 個、ホスファチジルエタノールアミン 3 個、カルジオリピン 2 個であることがわかった。しかし、残りの脂肪酸 9 個がどのような脂質に由来しているのかは不明であった。そこで、リン脂質以外に特異的な脂質が結合していると考え、ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶標品より脂質を抽出し、質量分析法により分析した。その結果、本酵素には、強く結合するトリアシルグリセロールが存在することが確認された。このことから、9 個の脂肪酸に由来する電子密度は、3 分子のトリアシルグリセロール由来であることがわかった。酵素より抽出されたトリアシルグリセロールの脂肪酸組成は、ミトコンドリア内膜に存在するトリアシルグリセロールの脂肪酸組成とよく一致した。

H.Terada, A.Yamasaki, K.Shinzawa-Itoh, Y.Tadehara, H.Aoyama, T.Sugimura, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Specific lipids bound to bovine heart Cytochrome *c* oxidase.

B230

ウシ心筋チトクロム酸化酵素 Na⁺/Ca²⁺ 結合部位の構造

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

チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析により、サブユニット I のヘム *a* 付近にはウシ心筋酵素では Na⁺ が結合しているが、細菌 *Paracoccus denitrificans* や *Rhodobacter sphaeroides* の酵素では Ca²⁺ が結合していることが見いだされている。一方、Na⁺ や Ca²⁺ の添加によりヘム *a* の吸収スペクトルがウシ酵素では可逆的に変化するが、細菌酵素では変化しないことが報告されている。これは、ウシ酵素では Na⁺ と Ca²⁺ が可逆的に結合・解離するが、細菌酵素では Ca²⁺ が強く結合していることを示唆している。そこで本研究では、Ca²⁺ で処理したウシ酵素の X 線構造解析により Ca²⁺ 結合部位を調べた。従来の方法により作成した酸化型、及び還元型酵素の結晶に CaCl₂ を添加し、SPring8 BL44XU にて X 線回折実験を行った。Ca²⁺ 結合酸化型、Ca²⁺ 結合還元型共に、2.1 Å 分解能において Completeness 90% 以上、 R_{merge} 10% 以下の回折データを収集し、MR/DM 法により電子密度を計算した。得られた電子密度から、酸化型、還元型ともに Ca²⁺ が Na⁺ と置換して結合していること、及び配位様式が Na⁺ では 5 配位、Ca²⁺ では 6 配位であることが分かった。構造精密化計算の結果、Na⁺ 結合型と Ca²⁺ 結合型とでは配位様式の違いにより、ヘム *a* のホルミル基とプロピオン酸付近のアミノ酸構造に僅かな違いが見られた。この構造変化により吸収スペクトルが変化すると考えられる。Ca²⁺ の配位構造はウシ酵素と細菌酵素とで類似していた。しかし、配位子の 1 つがウシ酵素では水分子であるのに対し細菌酵素ではアミノ酸側鎖であることから、この違いが Ca²⁺ の結合・解離に影響していると考えられる。

K. Muramoto, S. Maegawa, S. Aonami, K. Hirata, H. Aoyama, E. Yamashita, S. Yokoo, T. Kurauchi, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara and S. Yoshikawa : X-ray structure of Na⁺/Ca²⁺-binding site in bovine cytochrome *c* oxidase

B232

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元中心付近における酸素透過経路

○村本 和優¹、山下 栄樹²、青山 浩³、伊藤・新沢 恭子¹、望月 正雄¹、櫻井 啓介²、月原 富武²、吉川 信也¹ (¹ 姫工大・院理、² 阪大・蛋白研、³ 理研・播磨)

チトクロム酸化酵素は酸素分子をヘム a_3 -Cu_B サイトに結合し、還元反応を触媒することにより水分子を生成する。X 線構造解析から、酸素分子の透過経路であると考えられる疎水性チャネル構造が、サブユニット III の膜貫通部位表面とヘム a_3 -Cu_B サイトの間の膜面に平行な領域に見いだされている。ただし、チャネル内に酸素や水分子は見つかっていない。今回、酸素透過経路について調べるため、キセノン (Xe) で処理したウシ酵素の X 線構造解析を行った。従来の方法により作成した酸化型の結晶を Xe 雰囲気下で処理し、SPring8 BL44XU にて X 線回折実験を行った。2.5 Å 分解能の回折データを収集し、MR/DM 法により電子密度、及び異常分散フーリエマップを計算した結果、1 個の Xe が疎水性チャネルの途中に結合していることが分かった。このことから、酸素分子もチャネル内を透過可能であることが示唆される。また、キセノン結合部位は酸素分子を保持する性質を持つと考えられる。一方、プロトンの輸送のモデルとして、酵素反応サイクル中ではチャネル内のヘム a_3 -Cu_B サイト付近に水分子の配列が存在し、水素結合ネットワークを形成することが提唱されている。そこで今回、酵素の分子表面計算を行うことによりチャネルの性質を調べた。その結果、チャネル内の空間は水分子が 1 次元的に配列することは可能であると考えられる。しかし、ヘム a_3 -Cu_B サイトへつながる水分子の配列が存在する場合には、チャネルが塞がれて酸素透過の障害になることが予想される。

K. Muramoto, E. Yamashita, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, M. Mochizuki, K. Sakurai, T. Tsukihara and S. Yoshikawa : Oxygen pathway to the oxygen-reduction site in bovine cytochrome *c* oxidase