2P089

ウシ・ヒト雑種チトクロム酸化酵素の培養細胞での発現と抽出

下方 国稔^{1,4}、○村山 晴香¹、片山 幸江^{1,4}、末松 誠¹、吉川 信也²、月原 富武³、島田 秀夫¹ (¹ 慶應大・医・医化学、² 兵庫県大・院理、³ 阪大・蛋白研、⁴ (社) バイオ産業情報化コンソーシアム)

ウシチトクロム酸化酵素は、ミトコンドリア (mt) と核 DNA にそれぞれエンコードされる 13 種類のサブユニットから成るが、mtDNA 由来のサブユニット I (SI) は、分子量が最大であるとともに酸素還元部位を含む酵素機能に必須のサブユニットである。ウシ SI 遺伝子を強力なプロモーターの支配下に置き、ヒト HeLa 細胞核に導入して、SI はウシ、その他はヒトからなる雑種チトクロム酸化酵素発現系を構築した。この系を用い、Ser441Pro 変異体および Val386Leu/Met390Trp 二重変異体を発現させると、mt でのチトクロム c 酸化活性は保たれるが、チトクロム酸化酵素によるプロトンポンプ活性は消失することを見出し、昨日本大会で報告した。今回、それら変異体発現株、ウシ SI を発現していない HeLa 細胞 (mock) 株、野生型ウシ SI 発現株でのチトクロム酸化酵素含量を定量し、また本酵素の可溶性条件を検討した。

(1) mock 細胞でのチトクロム酸化酵素含量を 100 とすると、野生型は 120、その他の変異体株は 140~150 の値を示した。(2) ヘム当たりのチトクロム c 酸化活性はほぼ一定であった。(3) 可溶性の条件として、a) 1 % dodecylmaltoside、b) 1 % dodecylmaltoside に aminocaproic acid 添加の 2 種類を検討した処、後者の方が 2 倍可溶性とされる量が多かった。

K.Shimokata, H.Murayama, Y.Katayama, M.Suematsu, S.Yoshikawa, T.Tsukihara, H.Shimada : Expression and extraction of bovine/human hybrid cytochrome c oxidase in and from HeLa cells

2P091

3-オキサトリデシルマンノシドを用いたチトクロム酸化酵素の結晶化

○花田 真¹、福本 雅子¹、山本 尚吾¹、杉村 高志¹、青山 浩²、伊藤・新澤 恭子²、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)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の反応機構を真の意味で理解するためには、水素の位置が決定できるほど精度の良いデータに基づく詳細な立体構造に関する情報が必要である。我々はこれまでに界面活性剤としてデシルマルトシドを用いた標品から得られた結晶を用いて酸化型で 1.8 Å 分解能の構造を得ている。しかし、これでは不十分であるため、新たに 10 種以上の新規界面活性剤の設計合成を行い、結晶化を試みた。このうち 3-オキサトリデシルマンノシド (3 OM) を用いると四角柱状結晶が得られた。これまで当研究室で得られた 4 種類の結晶中でチトクロム酸化酵素は全てダイマーとして存在していたのに対し、この 3 OM を用いた結晶中では酵素はモノマーとして存在した。結晶中でダイマーとして存在したデシルマルトシドを用いた標品と結晶中でモノマーとして存在した 3 OM を用いた標品の間には、13 種類のうちの 2 種類のサブユニットの N 末端のアミノ酸配列や結合する脂質の量に差異が認められた。3 OM を用いた標品の精製法、結晶化法の詳細な検討を行った結果、現在までに 1.65 Å 分解能での解析が可能な X 線回折データの収集に成功した。

M.Hanada, M.Fukumoto, S.Yamamoto, T.Sugimura, H.Aoyama, K.Shinzawa-Itoh, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Crystallization of bovine heart Cytochrome c oxidase stabilized with 3-oxatridecyl-mannoside

2P090

細菌 aa₃ 型チトクロム酸化酵素の発現系構築

○行武 良哲¹、下方 国稔^{1,3}、片山 幸江^{1,3}、末松 誠¹、村本和優²、吉川 信也²、島田 秀夫¹ (¹ 慶應大・医・医化学、² 兵庫県大・院理、³ (社) バイオ産業情報化コンソーシアム)

チトクロム酸化酵素 (CcO) は、細菌から動植物まで好気的生物に広く存在する呼吸系末端酸化酵素であり、分子状酸素を水に還元するとともに、プロトンを膜の内から外にポンプし、ATP 合成を駆動する proton motive force を形成する。ウシ CcO の X 線結晶構造解析と変異体解析そして赤外分光解析に基づいて、サブユニット I (Sub I) Asp51 での、プロトン解離会合が鍵となるプロトンポンプ機構が提唱されている。しかし Asp は、動物 CcO では保存されているが、細菌、真菌、植物では非解離性アミノ酸残基に置換されている。したがって、ウシ酵素と同様な機構が働いているかどうか注目されている。我々は、変異体を利用して、プロトンポンプ機構を比較検討するため、*Paracoccus denitrificans* (*P.d.*) の aa₃ 型 CcO の発現系を構築した。

P.d. の CcO Sub I 遺伝子 (*ctaDII* 遺伝子) を破壊するため、まずクローン化された当該遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子を挿入し破壊用遺伝子として、自殺用ベクターに挿入した。得られたベクターを三親接合法にて、*P.d.* 細胞に導入し、相同組換えで CcO Sub I 遺伝子を破壊させた。遺伝子の破壊は、サザンブロット解析と CcO 特有の可視吸収スペクトルの有無で確認した。つぎに、広域ベクターを利用し Sub I 遺伝子本来のプロモーターに支配される Sub I 発現ベクターを構築した。このベクターを今回作製した破壊株に導入すると、CcO 特有の可視吸収スペクトルが回復し、その吸収強度も野生型株と同程度であった。Sub I の C 末端には、His-tag を結合させてあるので、それを利用して CcO を Ni²⁺-NTA カラムに吸着させ、溶出画分を陰イオン交換カラムで精製した。精製標品は天然型酵素と同等のチトクロム c 酸化活性を示した。

Y.Yukutake, K.Shimokata, Y.Katayama, M.Suematsu, K.Muramoto, S.Yoshikawa, H.Shimada : Construction of the expression system for bacterial aa₃-type cytochrome c oxidase

2P092

酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の活性中心の構造

○青山 浩¹、村本 和優²、菅 倫寛³、平田 邦夫³、山下 栄樹³、伊藤・新沢 恭子²、吉川 信也²、月原 富武³ (¹ 理研・播磨、² 兵庫県立大・院生命理、³ 阪大・蛋白研)

酸化型チトクロム酸化酵素の酸素還元中心である Fe_{a3} と Cu_B の間には、その EPR シグナルが観測されないことから、何らかの橋架け構造があると予想されており、古くはヒスチジン残基や硫黄原子などの存在が予想されていた。現在もその化学種が何であるかは未確定で、大きな問題として残っている。常温で 3 2 個の結晶を使った 2.3 Å 分解能の X 線結晶構造解析では、過酸化物の存在を提唱した。しかし、100K での 1.8 Å 分解能の構造解析では過酸化物の電子密度が低くなっていた。また、X 線照射により吸収スペクトルに変化が生じることがわかった。

そこで、X 線損傷の影響が少ない回折強度データを得るために 4 6 6 個の結晶を使用して、SPRING-8 BL44XU ビームラインでデータ収集を行った。積分強度計算は自作の SCLONE と CCP4 プログラム *scala* により行い、露光時間 1 秒のデータは 2.5 Å 分解能、露光時間 1 5 秒のデータは 2.1 Å 分解能までの構造解析が可能であった。しかし低温のデータでは、鉄や銅原子の電子密度に異方性の影響が大きく、これらの重原子の異方性温度因子の精密化が可能な CCP4 プログラム *Refmac5* による精密化を行った。露光時間 1 秒と 1 5 秒の構造に違いはなく、どちらも Fe_{a3} と Cu_B の間には、酸素原子 2 個分の電子密度が確かに存在していた。次に酸素原子間の化学結合の存在の有無を明らかにするため、結合長を変えて精密化を行い、残余フーリエ電子密度図を指標に最も妥当な構造を求めたところ、酸素原子間に結合があると考えられる配位構造が得られた。このことから酸化型酵素の Fe_{a3} と Cu_B の間には間違いなく過酸化物が存在することが明らかとなった。

H.Aoyama, K.Muramoto, M.Suga, K.Hirata, E.Yamashita, K.Shinzawa-Itoh, S.Yoshikawa, T.Tsukihara : Structure of active sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase