3P113

チトクロム酸化酵素のX線による還元効果の構造解析

○井戸 亘¹、村本 和優¹、伊藤一新澤 恭子¹、山下 栄樹²、青山 浩³、月原 富武²、吉川 信也¹ (¹兵庫県立大・院生命理、²阪大・蛋白研、³理研・播磨)

これまでの分光測定において、低温条件下(100 K)でResting酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素にX線を照射した場合、可視吸収スペクトルのアルファ帯に変化が見いだされた。更に、X線を照射後、温度を300Kまで上昇させると還元型のスペクトルを示すことが分かった。この結果は、X線照射で生じた光電子により、Resting酸化型酵素が還元されたものと考えられる。これまでのX線構造解析からは、Resting酸化型のheme_a₃-Cu_B間にはパーオキサイドが配位し、還元型のheme_a₃-Cu_B間には配位子がないことが示されている。そこで、X線照射によるResting酸化型heme_a₃-Cu_Bサイトの還元過程における構造変化と、還元によって生じるH₂Oの放出経路を調べた。Resting酸化型チトクロム酸化酵素の結晶を用いて低温でX線回折実験を行い、更にX線を照射した後温度を上昇させて一定時間放置し、再び低温でX線回折実験を行った。そして温度処理前と処理後の構造を比較した。その結果、温度処理後にはheme_a₃-Cu_B間のCu_B近くにある電子密度が減少し、Tyr244と水素結合距離にある電子密度が増加することが分かった。よって、今回の結果はX線照射によりパーオキサイドが還元され、生成したH₂OがTyr244の先に移動したものではないかと考えられる。また、Resting酸化型酵素に低温で可視光を照射したときの還元効果についても現在調べている。

W.Ido, K.Muramoto, K.Shinzawa-Itoh, E.Yamashita, H.Aoyama, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Structural analysis of the x-ray induced photoreduction of cytochrome c oxidase.

3P115

Paracoccus denitrificans シトクロム酸化酵素の無細胞系での機能発現系の構築

○片山 幸江^{1,2}、小倉 尚志⁴、下方 国稔^{1,2}、末松 誠¹、月原 富武³、吉川 信也⁴、島田 秀夫¹ (¹慶大・医・医化学、²JBIC、³阪大・蛋白研、⁴兵庫県立大・院生命理)

土壌細菌 *Paracoccus denitrificans* のシトクロム酸化酵素は、膜蛋白質複合体で、相異なる3つのサブユニットSI、SII、SIIIが菌体内での酵素機能発現に必須である。本酵素は酸素還元部位と酸化還元中心とを形成するためにヘムAと銅原子を要求する。大腸菌の無細胞転写翻訳系に、ヘムA、硫酸銅および大腸菌の破砕膜を添加し、SI、SII、SIIIを同時合成させ、約0.5 mg/mlの蛋白質を得ることができた。本合成系で³⁵S-メチオニン標識した蛋白質を、反応液の20,000xg沈殿面分から可溶化後、blue-native PAGEにより分子量分画した。試料のかなりの部分は大きな凝集体を形成していたが、正常な複合体も観察され、これが上記3個のサブユニットを含むことを2次元目のSDS-PAGEによって確認した。さらに、上記沈殿面分のプロテアーゼK処理によって、膜貫通部分の存在が示された。SIのC末端に付加したHis-tagを利用して複合体を単離するため、可溶性試料をニッケルカラム処理した。カラム吸着画分は、1 mM KCN感受性のシトクロムc酸化活性を示した。活性をもつ試料は、合成系から前記添加物のどれを除いても得ることができなかった。この試料は、本酵素に特徴的なSoret/Vis吸収極大を示した。還元型試料の604 nmでの吸収強度から酵素濃度を決定し、ヘム当りの活性を計算すると標準試料の値の約1/30であった。活性が低い原因として、カラム溶出時に添加したイミダゾールの残存による活性阻害が示唆された。酵素試料からイミダゾールを除くことが困難であったため、可溶性試料を新たにイオン交換カラムMonoQで精製して、活性低下を防ぐことができた。以上の結果より細菌由来のシトクロム酸化酵素を無細胞系で機能発現できることが明らかになった。

Y.Katayama, T.Ogura, K.Shimokata, M.Suematsu, T.Tsukihara, S.Yoshikawa and H.Shimada : Cell-free synthesis of functional *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase

3P114

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の吸収スペクトルのpH依存性

○西原 正晴、伊藤・新澤 恭子、吉川 信也 (兵庫県立大・院生命理)

チトクロム酸化酵素は分子状酸素を水にまで還元するとともにプロトンポンプを行う細胞呼吸の末端酸化酵素である。本酵素はプロトンポンプと水分子形成のためにタンパク質内部を能動的にプロトン輸送しなければならない。これら能動輸送は酸化還元中心(ヘム鉄と銅イオン)間の電子伝達反応に共役(駆動)されている。

ヘムの吸収スペクトルは中心金属イオンの酸化状態や配位状態だけでなくタンパク質部分との相互作用により鋭敏に変化する。したがって、プロトン輸送を駆動する機能をもつヘムの吸収スペクトルは溶媒のpHに依存して変化すると予想できる。ヘムの吸収スペクトルは精密に測定することが可能であるため、他の方法では得られないヘムのプロトン輸送機構に関する情報が得られることが期待される。しかし、ヘムの吸収スペクトルはタンパク質の部分的変性によって影響をうける。本酵素の安定な単離標品を得ることが困難であるため、このような解析はこれまでにほとんど行われていなかった。

結晶化は部分的に変性したタンパク質を除去する最適の方法である。また結晶化可能な標品は最も安定であると言える。そこで、我々はウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶標品を用いて吸収スペクトルに及ぼす水素イオン濃度の影響を精密に解析した。

酸化型酵素の吸収スペクトルは精密に測定すると、タンパク質濃度を保存標品の濃度である500 μMから10 μM程度に変化させるだけでも吸収スペクトル変化を誘起した。その変化は数時間持続したが、12時間、20℃で静置すると認められなくなった。そこで、この条件で吸収スペクトルのpH依存性を測定したところ、pKaが9前後の440nmと410nmに山と谷を示す絶対スペクトルの4%程度の強度の差スペクトルが得られた。このpKaはH-pathwayの水素結合ネットワークの末端にあるArg38のそれと推定することができる。

M.Nishihara, K.Shinzawa-Itoh and S.Yoshikawa : pH dependency of absorption spectra of bovine heart cytochrome c oxidase

3P116

Structural Fundamentals for Monoamine Oxidase A Inhibition Control Revealed by Molecular Dynamics Simulations

○Apostolov Rossen、米澤 康滋、鷹野 優、中村 春木 (阪大蛋白研)

The oxidation of neurotransmitters like serotonin and dopamine is catalyzed by two types of monoamine oxidases enzymes : MAOA and MAOB. They are found in the neurons and astroglia, as well as in the liver and gastrointestinal tract. They are of crucial importance for the regulation of the central nervous system. Impaired neurotransmitter balance leads to various neurological disorders like depression, phobias, and substance abuse. MAOA has been a target for anti-depressant drug design for a long time, but still there are many unknowns about how exactly the enzyme works. The crystal structure of MAOA monomer with bound FAD cofactor was used for the construction of a model system for Molecular Dynamics simulation. The protein was embedded in POPC lipid bilayer and fully immersed in a physiological solution of sodium chloride. The system constituted a total of 80000 atoms. The size of the simulation box was 80/100/125 Å. Rigid model was used for bonds including hydrogen atoms, thus allowing for 1 fs timestep. Electrostatic interactions were calculated using PME method, and cutoff distance of 9 Å was used for Van der Waals forces truncation. NPT ensemble along with CHARMM force field was used for the equilibration and production runs. We present analysis of the simulation trajectory and the observed structural changes in flexible loops responsible for active site gating and inhibitor uptake control.

Rossen Apostolov, Yasushige Yonezawa, Yu Takano, Haruki Nakamura : Structural Fundamentals for Monoamine Oxidase A Inhibition Control Revealed by Molecular Dynamics Simulations