2.8 Å分解能のチトクロム酸化酵素の 活性中心の構造

姫路工業大学 理学部 生命科学科 吉川信也

1. はじめに

チトクロム酸化酵素は細胞呼吸の末端酸化酵素で分子状酸素を水にまで還元するとともに、それに共役して水素イオンをミトコンドリア内膜の内から外へ能動輸送する働きをもつ、巨大な膜貫通型膜タンパク質複合体である。この酵素はほとんどの好気性生物の細胞に含まれており、現在多数の生物から単離されている。活性中心にはヘム鉄を2原子と銅を3原子含み、高等動物では13個の異なるペプチドサブユニットとさらにマグネシウムと亜鉛を1原子ずつ含んでいる。鉄原子と銅原子以外の組成は生物種によって相当に異なる。例えば、細菌からはサブユニット2個だけを持ち、マグネシウムと亜鉛のどちらも含まない酵素が得られている。また活性に必須なリン脂質も含まれている^{1), 2)}。この酵素の働きによってはじめて細胞は酸素呼吸が可能になる。このように生理的に重要なこの酵素の研究はその発見³⁾以来常に生体エネルギー論分野での中心課題のひとつであり続けている。さらに、この酵素の活性中心には遷移金属である鉄イオンと銅イオンが含まれていて、種々の分光学的方法によって研究することが可能であるためであって、これまでに、膨大な知見が蓄積されている^{1), 2)}。

しかしながら、この酵素は膜タンパク質であるため、単離精製および結晶化が容易ではない。したがって、X線結晶構造が明らかにされていない。そのため、この酵素による触媒反応の起こる活性部位の構造が知られていなかったため、膨大な分光学的実験結果もこの酵素の機能の解明に十分生かされているとは言えない。

そのようなことから、反応機構の理解を深めるためにX線解析による原子レベルでの立体構造の解明が待たれていた。

1995年8月に筆者を含む日本のグループとドイツのグループとがほとんど同時にこの酵素の高分解能のX線結晶構造を報告した^{4), 5)}。前者はウシ心筋の酵素の完全酸化型の構造を、後者は細菌（パラコッカス）の酵素のアジ化物（ N_3^- ）結合型の構造を発表した。前者の報告では活性中心金属部位の構造に重点が置かれ、後者ではタンパク質部分の構造に重点が置かれていた。この細菌の酵素には、高等動物と異なり、サブユニットは4個しか含まれていないしマグネシウムと亜鉛が含まれていないが、酸化還元中心の構造は共通であると考えられている。これら2つのチトクロム酸化酵素の結晶構造が明らかにされたことにより、この酵素の反応機構の研究の飛躍的な発展が期待できる。以下、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の金属結合部位の構造と結晶化について筆者らの最近の成果を中心にして述べる。

2. 金属結合部位のX線結晶構造の概略

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶化に最も重要な要因は単離した酵素分子を水溶液中に安定化するための界面活性剤の構造であった。現在のところデシルマルトシドで安定化すると2.6 Å分解能以上のX線回折能を示す結晶が得られている。この結晶を用いて重原子同型置換法によって電子密度分布を求めたところ、極めて精度の高い2.8 Å分解能での電子密度が得られた。それは、口絵に示されるような、金属中心とその周辺の構造を明確に示していた。酸素還元部位と考えられるヘム a_3 -Cu $_B$ 部位とヘム a とは細胞質側の膜表面レベルから約13 Å下の面に水平に並んでいる。またCu $_A$ は分光学的に予想されていたように複核で細胞質側を上方にとればヘム a_3 とヘム a の上方それぞれ22 Å, 19 Åの位置に存在していた。上記の3つの金属中心はほぼ直角三角形の頂点に位置し、Cu $_A$ とヘム a_3 の鉄原子が構成する斜辺上にマグネシウム部位が存在する。また図1(a)のようにヘム a_3 の鉄原子とCu $_B$ との距離は4.5 ÅでCu $_B$ 部位は3つのヒスチジンイミダゾールが配位しているだけで他にはH $_2$ Oの配位さえも認められなかった。ヘム a_3 は予想通り5配位であったが、最も驚くべき結果はヘム a_3 鉄原子とCu $_B$ の銅原子との間に塩

The active site structure of cytochrome oxidase at 2.8 Å resolution

Shinya YOSHIKAWA

Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

図1 ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸化還元中心の結晶構造。(a); 酸素還元部位。(b); Cu_A 部位。

素原子もイオウ原子も認められなかったことである。これらの原子は、完全酸化型の鉄イオンと銅イオンとの間に認められる強い磁気相互作用をもたらすために必須であると考えられている。もちろん、強く固定されているがいくつかの大きく異なる立体構造をとることのできるような外部配位子（例えば H_2O ）の存在は否定できない。ヘム a_3 は2つのヒスチジンイミダゾールの配位した典型的な低スピン型構造であった。また Cu_A 部位では2つの銅原子を2つのシステインのS原子が架橋して四辺形を作り、各銅原子に対して、それぞれもう2個の原子が配位して、2つのシステインS原子とともに四面体を作るように配位していた（図1(b)）。この Cu_A への配位子のうちグルタミン酸は側鎖ではなく主鎖の（ペプチド結合の）カルボニル基が配位していた。このグルタミン酸の側鎖部分はマグネシウムの

ひとつの配位子となっていた。マグネシウムは他にヒスチジン、アスパラギン酸、 H_2O の三配位子を含めて四面体型配位構造をとっていた。

Cu_B の配位子のイミダゾールのひとつはヘム側鎖のホルシル基のカルボニルの上にヘム面とほとんど平行に約3 Åの距離に固定されていた。また同じヘムの長鎖アルキル基のピロール側末端にある水酸基とチロシン残基の水酸基との間に水素結合があることが認められた。またこのチロシンのフェノール面と Cu_B の配位子のひとつのイミダゾール面とは3 Å程度に近接しており、鉄原子と銅原子との間の電子伝達経路となるか、あるいは、このチロシンを通じて酸化還元や配位子結合に伴う立体構造変化を他の部位に伝えることができるようになっているのかも知れない。亜鉛結合部位は上述の酸化還元活性金属部位から遠く離れてマトリックス側にある小さなサブユニットに結合していた。4個のシステイン残基による、ほぼ正四面体型の配位でアミノ酸配列だけから考えると亜鉛フィンガー構造が予想されるが、そのようなフィンガー構造は認められなかった。したがってこの亜鉛の役割はまだ不明である。

なお、2.8 Å分解能のX線結晶構造では活性中心の原子の位置を0.1~0.2 Åの精度で決定することができる。しかし、化学反応の速度はこの精度よりはるかに微小な構造変化によっても大きく影響されることが知られている。したがって反応機構の解明のためにはさらに高分解能での構造決定を行う必要がある。またプロトンポンプの原動力となる立体構造変化を検出するためには上述の完全酸化型の立体構造以外に他の酸化状態および配位子結合状態の結晶構造を解明することが必要であることは言うまでもない。ドイツの研究グループは、細菌（パラコッカス）の酸化型アジ化物結合型では Cu_B の配位子は2つのイミダゾールのみで、遺伝子工学的研究によって予想されている第3のイミダゾール基が結晶構造に認められないと報告している⁹。彼らはこの結果はこのイミダゾールが可動であって、少なくとも2つの立体構造（ Cu_B に配位したものと配位していないもの）をとり得ることを示しており、この可動性によって、 O_2 還元反応に共役して水素イオンが能動輸送されると主張している。この主張を立証するためにも、これら2つの立体構造が活性中心金属の酸化還元と共役して相互変換することを実験的に捉えることが必要であろう。なお、ウシチトクロム酸化酵素の活性中心付近のタンパク質の構造には細菌酵素と共通部分もあるが明らかに異なっていると考えられる部分も認められる。特に、プロトンチャネルとなりそうな構造には違いが著しい。これらについては、投稿中

である。

Peter Nichollsは最近次のように述べている。「The "romantic" era of cytochrome oxidase biochemistry, which began with its discovery by Keilin and Hartree in 1938, is over.」これはこれまでのように原子レベルの立体構造がそう簡単に解明されるはずがないとして、さまざまなspeculationが許された（それなりに意義を認められた）時代は終わったことを宣言したものであろう。

3. 結晶化について

我々はウシ心筋チトクロム酸化酵素を結晶化の材料にした。その第一の理由は、生命科学の究極の目標のひとつは人間であるので、哺乳動物の酵素は我々には最も興味深い研究対象であったからである。サブユニット数の少ない細菌の酵素は高等動物の酵素の研究の比較対照のためには重要であっても、細菌酵素結晶がウシ酵素よりはるかに高分解能のX線回折能を示さない限り、最初に研究すべき対象としての魅力ははるかに小さい。

単位質量当りの表面積は分子量とともに小さくなるので、結晶を安定化に寄与する分子間の接触点の数は、単位質量当りでは少なくなると考えられる。したがって、分子が大きくなることが結晶化の可能性（安定性）を高めるとは言えないであろう。実際これまでのタンパク質結晶化の歴史も、小さなタンパク質の結晶化の成功例の方が大きなものよりはるかに多いことを示している。しかし、原子レベルの分解能のX線回折能を示す結晶が得られる最大の分子量をどのように見積ることができるであろうか？ また結晶の安定性と質は分子が巨大であるほど必ず低下するであろうか？ 少なくとも膜貫通型膜タンパク質に関しては明確な解答はないであろう。何故なら、膜貫通部分の表面には可溶化のための界面活性剤が結合しているため、タンパク質分子間で特異的な相互作用が生じる可能性が低いためこの部分は結晶の安定化に寄与しないと考えられる⁶⁾。一方生体膜の厚さは生物種によらずほぼ一定であるとすればサブユニット数の少ない細菌のチトクロム酸化

酵素の方が結晶の安定化に寄与する親水性表面（膜貫通部分でない部分の分子表面）の面積が、サブユニット数が多く分子量の大きな哺乳動物の酵素より、小さいと言える⁷⁾。事実バクテリアのチトクロム酸化酵素はモノクローナル抗体を結合させて（親水性部分を大きくして）結晶化されている⁴⁾。しかし、ウシ酵素は適当な界面活性剤を選択することによって、何ら修飾を加えることなく結晶化できている。とはいえ、ずっと組成の単純な、本質的に同一の機能をもつ細菌の酵素が得られていたのであるからその結晶化を第一に試みるべきであったのかも知れない。しかし、我々はウシ酵素標品の安定性をよく知っていたし、何よりも上述のようにその結晶に魅せられていた。研究とは本来知的好奇心を原動力として行うものであるとすれば戦略的には不利であってもこんな方法も許されるであろう。研究をゲームのようにとらえる研究者にとっては知的興味より勝負の方が重要であろう。そのような研究が増えることは見かけ上科学を活発にするが、結局、科学の魅力を損なうのではなかろうか。

文 献

- 1) Malmstrom, B. G. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1247-1260.
- 2) Babcock, G. T. and Wikstrom, M. (1992) *Nature* **356**, 301-309.
- 3) Warburg, O. and Negelein, E. (1929) *Biochem. Z.* **214**, 64-106.
- 4) Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
- 5) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Ito, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
- 6) Garovito, R. M. and Picot, D. (1990) *Methods* **1**, 57-69.
- 7) Yoshikawa, S., Shinzawa-Ito, K., Ueda, H., Tsukihara, T., Fukumoto, Y., Kubota, T., Kowamoto, M., Fukuyama, K. and Matsubara, H. (1992) *J. Cryst. Growth* **122**, 298-302.