Euglena・ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系——シトクロム bc_1 複合体の比較生化学——†

向井 邦晃*, 松原 央

(大阪大学理学部生物学科, *現在, 三菱化成生命科学研究所)

1. はじめに

ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系は, 呼吸基質から分子状酸素までの酸化還元反応を行い, ATP 合成の駆動力を作り出す⁽¹⁾. 酸化還元反応を行うのはミトコンドリア内膜に存在する複合体 I, II, III, IV と呼ばれる 4 種の酵素複合体である. これらはそれぞれ NADH からユビキノンまで, コハク酸からユビキノンまで, 還元型ユビキノンから酸化型シトクロム c まで, 還元型シトクロム c から分子状酸素までの反応を行う. 各複合体による酵素反応をつなぐ基質となるのがユビキノン, シトクロム c である. 呼吸鎖全体は次のように示すことができる.

ウシ心筋, パン酵母では, 現在までに各複合体に含まれる酸化還元中心が明らかにされ, 4 種の複合体を構成する全部で 50 個を超えるポリペプチドの 1 次構造が解析されつつある. 蛋白質複合体の構造と機能の解明の研究は分子レベルで行える段階となった. 一部の好気性のバクテリアにもミトコンドリアの呼吸鎖と機能的, 構造的によく似たものが見つかっている. 蛋白質複合体に含まれる酸化還元中心はミトコンドリアのものと同様であるが, 単純なサブユニット構成になっている. 一方, 最近の分子生物学的な研究によって, ミトコンドリアの呼吸鎖蛋白質複合体を構成する個々のサブユニットをコードする遺伝子は, 大部分が核にあり, 一部のもののみが

ミトコンドリア DNA にコードされていることが明らかになっている. 各遺伝子の発現, 翻訳産物の細胞内の移行, 内膜上でのポリペプチドの分子集合に関する研究が進んでいる⁽²⁾. ここでは, 著者らによって初めて行われた原生動物の呼吸鎖蛋白質複合体の精製とその性質についての研究を中心に述べる.

2. Euglena ミトコンドリアの呼吸系

原生動物の呼吸系の研究は, 哺乳類, 菌類, バクテリアに比べあまり進んでいない. しかし, *Euglena* ミトコンドリアに関しては, これまでの研究によって, 機能上, 上述の複合体 I, II, III, IV が存在することが明らかになっている⁽³⁾. その他に乳酸を利用する経路, および, 複合体 IV とは別の誘導型の末端酸化酵素が存在することが示されている⁽⁴⁾. *Euglena* ミトコンドリアの呼吸系でもうひとつ特徴的なことは, シトクロム c のヘムの結合様式である^(5,6). この点については, のちほどシトクロム c_1 の構造のところで述べる.

3. Euglena シトクロム bc_1 複合体

複合体 III は, 対応するバクテリアのものも含めてシトクロム bc_1 複合体と呼ばれる. ユビキノールを酸化し, 酸化型シトクロム c を還元する酵素活性を持つ. この酸化還元反応に共役してプロトンを内膜外側に汲み出して ATP 合成に必要なプロトンの電気化学ポテンシャルを形成する. 酸化還元中心を持つサブユニットは, シトクロム b , Rieske 型鉄・硫黄蛋白質とシトクロム c_1 である⁽⁷⁾. これらと基質であるユビキノン, シトクロム c を含めた電子伝達とプロトンの汲み出しのメカニズムは, Q サイクルモデルなどによって説明されている⁽⁸⁾.

シトクロム bc_1 複合体のサブユニット構造は, ミトコンドリアのものとバクテリアのものでははっきりとした違いがある⁽⁷⁾. 表 1 に示したようにウシ心筋, パン酵母, アカパンカビ, サツマイモのミトコンドリアから精製さ

† *Euglena* Mitochondrial Respiratory Chain Electron Transport System. Comparative Biochemistry of Cytochrome bc_1 Complex. Kuniaki MUKAI and Hiroshi MATSUBARA (Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka 560)

表 1 シトクロム bc_1 複合体のサブユニット構造の比較

サブユニット	ミトコンドリア					バクテリア	
	<i>Euglena</i>	酵 母	アカパンカビ	ウシ心筋	サツマイモ	<i>Paracoccus</i>	<i>Rhodobacter</i>
I	52	49	50	49	51		
II	44	39	45	45	49		
III (シトクロム b)	37	34	30	32	33	39	48
IV (シトクロム c_1)	32.5	31	31	31	32	62	30
V (鉄・硫黄蛋白質)	32	22	22	25	27	20	24
VI	30	17	14	13	17		12
VII	18	13	12	11	10		
VIII	10	11	12	9	10		
IX	9	10	9	8			
X	7	9		7			
XI				6			

サブユニットの見かけの質量を kDa で表わした。 *Euglena* では、鉄・硫黄蛋白質の同定は行っていない。

れたものは8~11個のサブユニットから構成される。したがって酸化還元中心を持たないサブユニットが5~8個存在する。これらの役割はよくわかっていない。バクテリア2種のものは、3または4個のサブユニットから構成されている。つまり、バクテリアのものでは、ほぼ酸化還元中心を持つサブユニットだけから成る。さて、真核細胞のなかでも最も下等な原生動物のシトクロム bc_1 複合体はどのようなものだろうか。そこで著者らは、葉緑体を持たない *Euglena* から、シトクロム bc_1 複合体の精製を行い、性質を調べた。

Euglena シトクロム bc_1 複合体の精製標品は、これまでに精製されたミトコンドリアのものとはほぼ同様で、10個のポリペプチドを含んでいた⁽⁹⁾。シトクロム b とシトクロム c_1 の見かけの分子量も他の種のものと同様であった。しかし、精製標品を分光学的に解析したところ、シトクロム c_1 の吸収スペクトルが特徴的であることを見出した。これまでに知られているシトクロム c_1 の分光学的性質は、ミトコンドリア、バクテリアを問わず共通であるが、*Euglena* では吸収極大の波長が +8 nm シフトしていた。*Euglena* シトクロム c_1 分子には、他の生物種のものとは比べ何らかの構造上の差異があることが示唆された。

4. 特異なヘム結合様式の *Euglena* シトクロム c_1

Euglena シトクロム bc_1 複合体で最も特徴的な点はシトクロム c_1 の分光学的性質である。図1に示したように典型的なC型シトクロムは、そのヘム結合部位に -Cys-X-Y-Cys-His- という共通のアミノ酸配列を持ち、2本のチオエーテル結合でヘムを結合している⁽¹⁰⁾。

Euglena シトクロム bc_1 複合体からシトクロム c_1 を単離して、蛋白質化学的にヘム結合部位のアミノ酸配列を決めた。興味深いことに、典型的なC型シトクロムに見られるヘムを結合する2個のシステインのうちN末端側のものがフェニルアラニンに置換していた^(9,11)。このことは、*Euglena* シトクロム c_1 は例外的に1個のシステインでヘムを結合していることを示している。

実は *Euglena* では、このようなヘム結合様式はもうひとつのC型シトクロムであるシトクロム c ($c-558$) すでに見つかっている^(5,6)。このシトクロム c も典型的なものとは分光学的性質が異なる。したがって、*Euglena* ミトコンドリアでは、2種類のC型シトクロムの両方が同様の特異なヘム結合様式であることが判明した(図1)。このことが何を意味するのか現在のところわからない。もしかすると両方のアポ蛋白質にヘムが結合する反応には、ヘム以外にも何か共通の分子が働いていること

typical C-type cytochromes

Euglena
cytochrome c -Cys- X - Y -Cys- His-
cytochrome c_1 -Ala- Ala- Gln- Cys- His-
 -Phe- Ala- Pro- Cys- His-

図1 *Euglena* ミトコンドリアのC型シトクロムに見られる特異なヘム結合様式

```

ユーグレナ      -1      10      20      30      40      50
酵母      GVDSHPPALPWPWFQWFGQLDWRSVRRGKEVVEQVFAPCHSLSLFIKYRHF
アカパンカビ  MTAAEHGL.A..YA.S.NGP.ETF.HA.I...YQ..RE.C.A...DRVAW.TL
ウシ      MTPAEGL.ATKY..V.E..LKTF.HQAL...FQ..RE.C.S...RVP..AL
Rhodobacter  SDLEL...SY..S.RGLLS...HT.I...FQ..K..CSS...MDYVA...L
Paracoccus  N.NVQDHAFSFEGL.GKF.QAQL...FQ..SE.CST..GMK.VPI.TL
-AAAQEAGDSHAAA.IEDISFSFEGP.GKF.QHQLQ..LQ..TE.CSA..G.RYVPL.TL

        60      70      80      90      100
EAF-MSKREVKNMAASFVDDDDPDEKGEARKRPGRFDTVVQPYKNEGEARYANNALPP
VGVSHTN...R...EE..Y..E...Q.NPK...LS.YIPG..P...A..A..Q....
VGTILTVD.A.AL.EEN.Y.TE.NDQ..E...LS.YLPD...DEA.F.....
VGVCYTED.A.AL.EEV..Q.G.N.D..MFM...LS.YFPK..P.PEA..A.....
SDDGGPQLDPTFVREYAAGL.TIID.DSGEE.DR.ET.MFPTRVGDGMG-----
ADEGGPQLPEDQVR.YAANF.-ITDPETEED..RVPT.HFPTVSGEGMG-----

110      120      130      140      150
DLSVITNARH-----GGVDYIYALLTGYPVPGGVQLST-TQWYNPY
...L.VK...-----C...FS....PDEP.A..A.PP-GSN....
...L.VK...-----C...FS....PDEP.A.ASVGA-GLNF...
...Y.VR...-----E..VFS....C-EP.T..S.RE-GLYF...
...MAK..AGFSGPAGSGMNQLFKGI..PE...RYV..FPEEN.ACAPEGIDGYY..EV
...LMAK..AGFHGPYGTGLSGLFNGI..PE..H.V...DGEKEEAGA---VLYH.AA

        160      170      180      190
FHGGII-----GMPFPLTDDMIEYEDGTPASVPQMAKDVTGFLEWCS
.P..S.-----A.ARV.F...V.....TTS.....T..N..A
.P.TG.-----A.ARV.Y.GLVD.....TS.....VE..N..AA
.P.QA.-----A..LYNEVL.FD.....TMS.V...CT..R..AA
.QV.GVPDTCKDAAGIKTTTHGSAQ...A.F..LVT.....T.D..GQ..AS..M..AA
.A.NW.-----Q.AA..S...QVT.....T.D...T..AA..M..TA

        200      210      220      230      240
NPWWDERKLLGYKTIATLAVIAVSSGYNRFSLGSLWRSRRRLAFRPFNYSK
E.EH...R..L..VII.SSLYLL.IWVKK.KWAGIKT.KFV.N.PKPR.
E.EM.D..RM.M.VLVVTS.LFAL.V.VK.YKWAWLK..KIVYD.PKSPPPATNLALPQQ
E.EH.H..RM.L.MLLMMGLLLPLVYAMK.HKWSVLK..K..Y..PK
E.KLVA..QM.LVAVVM.GLLS.MLYLT.KR.WAPYKRQKA
E.KMMD..QV.FVSVIF.I.L.ALLYLT.KK.WQPIKHP.KPE

```

RAKS

図 2 シトクロム c_1 の 1 次構造の比較

Euglena の成熟シトクロム c_1 の 1 次構造⁽¹²⁾を酵母⁽¹³⁾, アカパンカビ⁽¹⁴⁾, ウシ心筋⁽¹⁵⁾, 光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*⁽¹⁶⁾, 脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans*⁽¹⁷⁾ のものと比較した。高いホモロジーが得られるようにギャップを入れてある。*Euglena* のものと同一のアミノ酸残基は点で示してある。数字は *Euglena* シトクロム c_1 における残基番号。36-40 残基の位置はヘム結合部位。

を暗示しているのかもしれない。この構造は、べつての原生動物クリチジアのミトコンドリアにあるシトクロム $c(c-557)$ でも報告されている。一方、*Euglena* 葉緑体も C 型シトクロム (シトクロム $c-552$) を含むが、そのヘム結合部位は典型的な 2 個のシステインを含む構造である。システイン 1 個でヘムを結合する特殊な C 型シトクロムは、一部の原生動物のミトコンドリアに特徴的なものかもしれない。

Euglena シトクロム c_1 の構造についてさらに知見を得るため、cDNA クローニングによって成熟シトクロム c_1 の全 1 次構造を決定した⁽¹²⁾。cDNA の塩基配列

からも特異なヘム結合部位のアミノ酸配列が同定確認された。図 2 は成熟シトクロム c_1 の 1 次構造を比較したものである。*Euglena* シトクロム c_1 の構造は、バクテリアのものに対してよりも、他のミトコンドリアのものに高いホモロジーを持っていた。また、ヘム鉄の第 5, 第 6 配位子と推定される His-40, Met-159 も保存されている。ヘムの結合様式が特異であるものの、おそらくその立体構造は他のミトコンドリアのものとよく似ていると思われる。ただし、バクテリアのものも含めて、種間でよく保存されている位置のアミノ酸が *Euglena* では構造全体にわたって置換している頻度が高い。このよ

うなアミノ酸置換は, *Euglena* だけで見つかった特異なへム結合様式と関係があるのかもしれない. 特徴的なアミノ酸置換と特異なへム結合様式は互いに相補し合って, 立体構造を安定化しているといったことが考えられるであろう.

原生動物のこの分野の研究はあまり進んでいない. おそらくさらに興味深い知見が得られるものと思われる. ミトコンドリアの構造と機能を理解するだけでなく, その進化的成り立ちについて考察しうるような知見が得られることを期待したい.

- (1) Y. Hatefi : *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1015 (1985).
- (2) 香川靖雄, 太田成男 : 生化学, **61**, 75 (1989).
- (3) T. K. Sharpless and R. A. Butow : *J. Biol. Chem.*, **245**, 50 (1970).
- (4) T. K. Sharpless and R. A. Butow : *J. Biol. Chem.*, **245**, 58 (1970).
- (5) G. W. Pettigrew : *Nature*, **241**, 531 (1973).
- (6) D. K. Lin, R. L. Niece and W. M. Fitch : *Nature*, **241**, 533 (1973).
- (7) G. Hauska, E. Hurt and W. Lockau : *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 97 (1983).
- (8) E. C. Slater : *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 239 (1983).
- (9) K. Mukai, H. Toyosaki, M. Yoshida, Y. Yao, S. Wakabayashi and H. Matsubara : *Eur. J. Biochem.*, **178**, 649 (1989).
- (10) R. Dickerson : *Sci. Am.*, **242**, 98 (1980).
- (11) K. Mukai, M. Yoshida, Y. Yao, S. Wakabayashi and H. Matsubara : *Proc. Jpn. Acad.*, **64**, Ser. B, 41 (1988).
- (12) K. Mukai, S. Wakabayashi and H. Matsubara : *J. Biochem.*, **106**, 479 (1989).
- (13) I. Sadler, K. Suda, G. Schatz, F. Kaudewitz and A. Haid : *EMBO J.*, **3**, 2137 (1984).
- (14) J. Römisch, M. Tropschug, W. Sebald and H. Weiss : *Eur. J. Biochem.*, **164**, 111 (1987).
- (15) S. Wakabayashi, H. Matsubara, C. H. Kim and T. E. King : *J. Biol. Chem.*, **257**, 9335 (1982).
- (16) N. Gabellini and W. Sebald : *Eur. J. Biochem.*, **154**, 569 (1986).
- (17) B. Kurowski and B. Ludwig : *J. Biol. Chem.*, **262**, 13805 (1987).