総 説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 75, No. 10, pp. 1061~1065, 2001]

プロトン情報の生物学的エネルギー変換に関する研究[†]

(2001 年度農芸化学奨励賞受賞)

三本木 至 宏

(大阪大学産業科学研究所)

Key words: ATP synthase; cytochrome *c*; protein stability; proton motive force; P-type ATPase

はじめに

呼吸や光合成によって得られる自由エネルギーは、生体膜を介するプロトンの電気化学的な濃度勾配（プロトン駆動力）という形で蓄えられる。膜において、プロトン駆動力は ATP の合成に使われるほか、荷電粒子を輸送するために用いられ、細菌のべん毛運動の原動力になっている（図 1）。すなわち、生体膜はプロトンの情報が形態の異なるエネルギーに変換される「場」と言うことができる。プロトン駆動力の生成からそのエネルギー変換のメカニズムを研究する「生体エネルギー論」は、生化学の中心的なトピックスの一つである。近年、この分野に構造生物学、あるいは生物物理学などの新たな研究手段が適用され、これまで未知であった部分が明らかになりつつある。そして現在、従来の知見をふまえ、新しい視点からプロトン情報のエネルギー変換の本質をとらえ直す時期にきている。

以上のようにプロトン情報をエネルギー源ととらえる一方、生命現象に関連するプロトンにはもう一つの側面がある。プロトンは、神経細胞ではシグナルとして受容され、その結果、酸味や痛みといった知覚として認識されるのである。このようにプロトンを神経シグナルととらえた場合、生体膜はプロトン情報を受容する「場」とも言うことができる。

筆者らは、遺伝学、生化学、分子生物学、有機化学、生物物理学、構造生物学などの多方面からのアプロー

図 1 細菌呼吸鎖によるプロトン駆動力の生成とその利用
細菌細胞と関連する膜タンパク質を模式的に示した。

チを駆使し、生体膜におけるプロトン情報の受容・生成・エネルギー変換に関与するタンパク質の機能と物性について研究を行っている。本稿ではその概要を紹介する。

1. チトクローム *c* の生合成

チトクローム *c* は呼吸鎖あるいは光合成電子伝達系を構成するヘムタンパク質であり、自らが酸化還元反応を行うことによって、プロトン駆動力の生成にかかわっている。細菌の可溶性チトクローム *c* は形質膜の外側に局在する。膜結合型のチトクローム *c* も存在するが、ヘムを含み酸化還元反応が実際に行われるドメインは膜の表層（外側）にある。チトクローム *c* のホロタンパク質において、ヘムはポリペプチド鎖に共有結合しており、この点で他のチトクロームと異なっている。チトクローム *c* の生合成過程において、すなわちチトクローム *c* が細胞内で成熟し機能を獲得するためには、ポリペプチド鎖とヘムの膜輸送、および両者の共有結合が重要なステップとなる⁽¹⁾。筆者らはチトクローム *c* の機能を考えるうえで、その生合成過程を明らかにする必要があると考えた。

[†] Studies on Biological Energy Conversion from Proton

Yoshihiro SAMBONGI (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

まず、細菌のチトクローム *c* のポリペプチド鎖が細胞基質で翻訳された後、ヘムとは別々にペリプラズムに輸送され、ホロ型になることを明らかにした^(2,3)。ヘムは保存配列 Cys-X-X-Cys-His 中の二つの Cys 残基にチオエーテル結合している。筆者らは、ヘムがポリペプチド鎖に結合する前には、この二つの Cys チオール基の酸化還元状態が膜およびペリプラズムに存在するジスルフィド酸化還元酵素群によって制御されていることを見いだした^(4,5)。また、ミトコンドリアではヘムリアーゼがヘムの結合反応を触媒することが知られていたが、細菌では、対応する触媒系はなく、チオエーテル結合反応そのものが自発的に起こる可能性を示した^(2,6)。以上の成果は、チトクローム *c* の生合成過程の解明に大きく貢献しただけでなく、後にフェレドキシンなど、他の酸化還元タンパク質にも適用され、この研究分野における一つの方向性を示すことができた。

2. チトクローム *c* の遺伝子発現様式

細菌の呼吸鎖電子伝達系の成分は多様である。同じ細菌でも、最終的な電子受容体に対応して呼吸鎖のタンパク質・酵素の構成は異なり、プロトン駆動力が形成される。このような多様性を考えたとき、呼吸鎖を構成するタンパク質の発現様式は興味深い。そこで筆者らは、チトクローム *c* の遺伝子発現についても研究を行った。まず、土壌細菌 *Paracoccus denitrificans* のチトクローム *c*-550 の遺伝子発現レベルが生育条件に強く依存することを明らかにした⁽⁷⁾。また、大腸菌から亜硝酸還元酵素であるチトクローム *c*-552 遺伝子をクローン化し、そのプロモーターの転写活性が無酸素・亜硝酸塩存在下で大きく上昇することを見いだした⁽⁸⁾。これらの結果は、細菌の多様な呼吸鎖タンパク質群の構成が転写のレベルで制御されていることを示唆している。

3. チトクローム *c* の大量発現と安定性の機構

細菌におけるチトクローム *c* 遺伝子の発現様式から学んだ点、および前述した生合成過程の研究で得た知見を応用して、クローン化したチトクローム *c* 遺伝子をホロタンパク質として発現させることに成功した^(5,9~11)。特に大腸菌を宿主に用いた場合、チトクローム *c* の発現レベルが全ペリプラズムタンパク質量の 10% 以上に達することを示し⁽⁵⁾、その後の分子レベルでのチトクローム *c* の研究分野に大きく貢献した。

そのなかでも、変異導入が可能になったことの意義は大きく、チトクローム *c* の物性、特にタンパク質としての安定性のメカニズムを解明することができた。

生育至適温度が 70°C である好熱菌 *Hydrogenobacter thermophilus* のチトクローム *c*-552 は、常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* のチトクローム *c*-551 とアミノ酸配列が 56% も一致し⁽¹²⁾、主鎖のフォールディングもほとんど同じである(図 2)⁽¹³⁾。しかし前者は、熱や変性剤に対して極めて安定であった⁽¹⁴⁾。この安定性の差は、二つのチトクローム *c* のアミノ酸側鎖間相互作用が異なるために生じるのではないかと考え、両者に部位特異的に変異を導入した。変異タンパク質の安定性を熱力学的に解析した結果、チトクローム *c*-552 の高い安定性に寄与する五つのアミノ酸残基を同定することができた(図 2)⁽¹⁵⁾。さらに、この 5 残基に相当する常温菌チトクローム *c*-551 のアミノ酸をチトクローム *c*-552 に見られる残基に同時に置換したところ、安定性の低かったタンパク質をチトクローム *c*-552 と同程度に安定化させることに成功した⁽¹⁶⁾。また筆者らは、チトクローム *c*-552 の結晶化にも成功し⁽¹⁷⁾、熱安定性の高い他のチトクローム *c* も単離している⁽¹⁸⁾。これらの成果によって、高温に耐えるタンパク質を作るための概念を提唱することができた。その概念は工学的、あるいは医学的に価値のあるタンパク質へ適用できると考えている。

大腸菌を用いてチトクローム *c* を大量に得ることができるようになって、安定同位体でラベルしたチトクローム *c* の調製が可能になった。NMR で上記の安定性実験に用いたチトクローム *c* ラベル体の構造解析を行い、その立体構造を決定した⁽¹⁶⁾。その結果、安定性のメカニズムを原子のレベルで考察することができた。さらに、チトクローム *c* の大量発現系は、電子伝達体としての機能、あるいはタンパク質の構造構築についての研究も加速した^(19,20)。

4. ATP 合成酵素におけるエネルギー変換

プロトン駆動力の大きな役割は、生体のエネルギー貨幣である ATP を合成することである。これに関与する膜タンパク質が ATP 合成酵素 (FoF₁) である(図 1)。FoF₁ は逆反応として ATP を加水分解し、プロトンを送ることもできる。したがって、FoF₁ はプロトン駆動力として膜に蓄えられたエネルギーを可逆的に化学エネルギー (ATP) に変換しうる酵素であり、

呼吸鎖タンパク質群が多様であるのとは対照的に生物が普遍的にもつ分子装置である⁽²¹⁾。ATPの触媒反応は、5種類のサブユニット($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$)からなり膜から突き出ているF₁部分で行われ、膜に内在するF_o部分(ab_2c_{10-14} サブユニット複合体からなる)はプロトンの輸送路を形成する。F₁部分はATPの分解活性を保ったまま膜から容易にはずすことができる。F₁を用いた1分子観察から、連続的にATP分子が分解される際に、 $\alpha_3\beta_3$ に対してその中央に位置する γ サブユニットが一方方向に回転することが筆者らを含む数グループによって示された^(22, 23)。

では、FoF₁において、化学触媒反応とプロトン輸送の共役のメカニズムはどうなっているのか、 γ サブユニットの回転という機械的な仕事がFoにどのように伝わっているのだろうか？この疑問に答えるために、大腸菌由来のFoF₁分子を生きたまま顕微鏡で直接観察できる実験系を構築し、ATP分解に伴うサブユニットの動きを可視化した(図3)。その結果、FoのcサブユニットはF₁の γ サブユニットと一緒に回っていることを発見した^(24, 25)。FoF₁では、このモーターのような回転運動によって、プロトン輸送と共役して化学触媒反応が行われていると結論し

常温菌(*Pseudomonas aeruginosa*)
チトクロームc-551

好熱菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)
チトクロームc-552

図2 常温菌、好熱菌由来のチトクロームcの構造比較

立体構造は主鎖をtubeで、ヘムをball and stickで表した。下は両者のアミノ酸配列で、黄色ボックスは一致するアミノ酸残基を示す。好熱菌チトクロームc-552の高い安定性に寄与する残基には赤丸印を付した。

図3 ATP合成酵素の回転実験

F₁部分を介してガラス基盤に固定した酵素のcサブユニットに蛍光アクチン繊維をつけ、ATP分解時の回転運動を光学顕微鏡で観察した。右はアクチン繊維が反時計回りに回転する様子(2例)を示す。

た、ATP 合成酵素は、これまでに知られている最小のロータリーモーターであり、ナノテクノロジーへの応用が期待される。

5. ATP に依存する重金属イオンの膜輸送

FoF₁ によって合成された ATP の化学エネルギーは、生体内における恒常性の維持に利用される。筆者らは、ATP に依存するイオン輸送についても興味ある結果を得ている。生体にとって銅は必須の元素であるが、その過剰蓄積は有害である⁽²⁶⁾。ヒトの銅代謝異常疾患 (Wilson 病, Menkes 病) の原因遺伝子となっているのが ATP の分解と共役してイオンを輸送する P 型 ATPase であることが明らかになっていた⁽²⁷⁾。この P 型 ATPase は細菌にも存在し、銅イオンに対する耐性に寄与している (図 1)。さらに、酵母で対応する遺伝子産物が、細胞内の銅イオン濃度を厳密に調節していることが示されていた⁽²⁸⁾。筆者らは、ヒトの Wilson 病遺伝子産物、およびその線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の相同分子を酵母において機能をもった状態で発現させ、実際に銅イオンを輸送することを初めて明らかにした^(29~31)。これらの研究から、ヒトの病因遺伝子を酵母で簡便に扱えるようになり、遺伝子診断への応用が可能となった⁽³¹⁾。さらに筆者らは、この銅イオン輸送タンパク質に銅イオンを受け渡すシャペロン分子を同定し⁽³²⁾、細胞内における銅イオン調節機構のモデルを提唱した⁽²⁶⁾。

6. プロトン認識のメカニズム

動物は神経系の働きによって外界の多様な情報を処理する。生体膜におけるプロトン情報は冒頭に述べたようにエネルギー源となるばかりでなく、酸味や痛みの感覚をひき起こす神経シグナルにもなる。

筆者らは、プロトンを認識するメカニズムを理解するために、線虫をモデルとして実験を行った⁽³³⁾。まず、中性領域で前進運動をしている線虫が pH 4 以下の環境に出会うと、すぐさま前進を停止し後戻りすることを見いだした。この忌避行動が酸イオンの種類に関係なく観察されたこと、さらに酸性物質の塩に対しては忌避しなかったことから、線虫は外界のプロトンを認識して行動するシステムを備えていると考えた。筆者らは、この神経ネットワークを明らかにすべく、レーザー光線照射によって線虫の特定の神経細胞を破壊し、その個体の行動を観察したところ、プロトンのセンシングに必要な三つの化学受容ニューロンを同定

することができた。さらに、遺伝子欠損をもつ変異体の行動や、薬剤に対する行動の変化を観察した結果、線虫においてプロトンの受容に関与する膜タンパク質の存在を明らかにした。対応する分子はヒトやマウスなどの高等動物でも発見されており⁽³⁴⁾、本研究によってプロトンの認識機構の普遍的な理解が深まったと言える。

また、同様の手法を用いて線虫が重金属イオンから忌避することを見だし、その神経メカニズムを細胞のレベルで明らかにしている⁽³⁵⁾。このように筆者らは、プロトンのみならず、広くカチオンの生体内恒常性維持にかかわる神経系の役割について、新たな切り口からその重要性を示すことができた。

おわりに

プロトン駆動力を生成する電子伝達系構成成分のなかで、筆者らはチトクローム c に焦点をあて、その遺伝子発現、生合成、構造形成の熱力学について研究を行った。さらに、プロトン駆動力のエネルギーを ATP に変換する ATP 合成酵素、および ATP を利用して銅イオンを輸送する P 型 ATPase の機能を解明した。また、動物個体 (線虫) の行動を観察することで、イオン認識の分子機構に迫ることができた。これらの研究を通じて、研究対象 (分子、細胞、個体) と方法 (物理学、化学、生物学) を目的に応じて使い分け、分野にとらわれない学際的なアプローチの必要性を実感した。今後も生体膜におけるプロトン情報の受容・生成と伝達のメカニズムの理解に貢献できればと思っている。

本研究は東京大学農学部 (児玉 徹名誉教授、五十嵐泰夫教授)、英国・Oxford 大学生化学科 (Stuart J. Ferguson 教授)、大阪大学産業科学研究所 (二井将光教授、植田育男教授) で行われたものです。ご指導いただきました各先生方に心より感謝申し上げます。また、それぞれの研究室に在籍された方々に感謝申し上げます。共同研究させていただきました大阪大学薬学部的小林祐次教授、同内山進博士、第一製薬株式会社の長谷川 淳氏、大阪大学医学部の柳田敏雄教授、秋田大学医学部の杉山俊博教授、大阪大学理学部の松原央名誉教授、同福山恵一教授、和歌山県立医科大学の錦見盛光教授に厚く御礼申し上げます。最後に、奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長松野隆一先生ならびに諸先生に厚く御礼申し上げます。

- す。
- (1) M. D. Page, Y. Sambongi, and S. J. Ferguson: *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 103-108 (1998).
 - (2) Y. Sambongi and S. J. Ferguson: *FEBS Lett.*, **340**, 65-70 (1994).
 - (3) Y. Sambongi, R. Stoll, and S. J. Ferguson: *Mol. Microbiol.*, **19**, 1193-1204 (1996).
 - (4) Y. Sambongi and S. J. Ferguson: *FEBS Lett.*, **353**, 235-238 (1994).
 - (5) Y. Sambongi and S. J. Ferguson: *FEBS Lett.*, **398**, 265-268 (1996).
 - (6) Y. Sambongi, H. Crooke, J. Cole, and S. J. Ferguson: *FEBS Lett.*, **344**, 207-210 (1994).
 - (7) R. Stoll, M. D. Page, Y. Sambongi, and S. J. Ferguson: *Microbiology*, **142**, 2577-2585 (1996).
 - (8) A. Darwin, H. Hussain, L. Griffiths, J. Grove, Y. Sambongi, S. Busby, and J. Cole: *Mol. Microbiol.*, **9**, 1255-1265 (1993).
 - (9) Y. Sambongi, J. H. Yang, Y. Igarashi, and T. Kodama: *Eur. J. Biochem.*, **198**, 7-12 (1991).
 - (10) H. Arai, Y. Zhang, Y. Sambongi, Y. Igarashi, and T. Kodama: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 489-492 (1995).
 - (11) Y. Zhang, H. Arai, Y. Sambongi, Y. Igarashi, and T. Kodama: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 346-349 (1998).
 - (12) Y. Sambongi, M. Ishii, Y. Igarashi, and T. Kodama: *J. Bacteriol.*, **171**, 65-69 (1989).
 - (13) J. Hasegawa, T. Yoshida, T. Yamazaki, Y. Sambongi, Y. Yu, Y. Igarashi, T. Kodama, K. Yamazaki, Y. Kyogoku, and Y. Kobayashi: *Biochemistry*, **37**, 9641-9649 (1998).
 - (14) Y. Sambongi, Y. Igarashi, and T. Kodama: *Biochemistry*, **28**, 9574-9578 (1989).
 - (15) J. Hasegawa, H. Shimahara, M. Mizutani, S. Uchiyama, H. Arai, M. Ishii, Y. Kobayashi, S. J. Ferguson, Y. Sambongi, and Y. Igarashi: *J. Biol. Chem.*, **274**, 37533-37537 (1999).
 - (16) J. Hasegawa, S. Uchiyama, Y. Tanimoto, M. Mizutani, Y. Kobayashi, Y. Sambongi, and Y. Igarashi: *J. Biol. Chem.*, **275**, 37824-37828 (2000).
 - (17) K. Fukuyama, H. Matsubara, Y. Sambongi, and T. Kodama: *J. Biochem.*, **110**, 854-855 (1991).
 - (18) Y. Sambongi, S. Chen, K. Yokoyama, Y. Igarashi, and T. Kodama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 990-991 (1992).
 - (19) E. J. Tomlinson and S. J. Ferguson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5156-5160 (2000).
 - (20) T. A. Pertinhez, M. Bouchard, E. J. Tomlinson, R. Wain, S. J. Ferguson, C. M. Dobson, and L. J. Smith: *FEBS Lett.*, **495**, 184-186 (2001).
 - (21) Y. Sambongi, I. Ueda, Y. Wada, and M. Futai: *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**, 441-448 (2000).
 - (22) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr.: *Nature*, **386**, 299-302 (1997).
 - (23) H. Omote, N. Sambonmatsu, K. Saito, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, T. Yanagida, Y. Wada, and M. Futai: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 7780-7784 (1999).
 - (24) Y. Sambongi, Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada, and M. Futai: *Science*, **286**, 1722-1724 (1999).
 - (25) M. Tanabe, K. Nishio, Y. Iko, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada, and M. Futai: *J. Biol. Chem.*, **276**, 15269-15274 (2001).
 - (26) 三本木至宏, 若林篤光: 化学と生物, **37**, 427-429 (1999).
 - (27) P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, and D. W. Cox: *Nat. Genet.*, **5**, 327-337 (1993).
 - (28) D. S. Yuan, R. Stearman, A. Dancis, T. Dunn, T. Beeler, and R. D. Klausner: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2632-2636 (1995).
 - (29) Y. Sambongi, T. Wakabayashi, T. Yoshimizu, H. Omote, T. Oka, and M. Futai: *J. Biochem.*, **121**, 1169-1175 (1997).
 - (30) T. Yoshimizu, H. Omote, T. Wakabayashi, Y. Sambongi, and M. Futai: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1258-1260 (1998).
 - (31) M. Iida, M. K. Terada, Y. Sambongi, T. Wakabayashi, N. Miura, K. Koyama, M. Futai, and T. Sugiyama: *FEBS Lett.*, **428**, 281-285 (1998).
 - (32) T. Wakabayashi, N. Nakamura, Y. Sambongi, Y. Wada, T. Oka, and M. Futai: *FEBS Lett.*, **440**, 141-146 (1998).
 - (33) Y. Sambongi, K. Takeda, T. Wakabayashi, I. Ueda, Y. Wada, and M. Futai: *NeuroReport*, **11**, 2229-2232 (2000).
 - (34) S. Ugawa, Y. Minami, W. Guo, Y. Saishin, K. Takatsuji, T. Yamamoto, M. Tohyama, and S. Shimada: *Nature*, **395**, 555-556 (1998).
 - (35) Y. Sambongi, T. Nagae, Y. Liu, T. Yoshimizu, K. Takeda, Y. Wada, and M. Futai: *NeuroReport*, **10**, 753-757 (1999).