

「生命活動のプログラム」
平成9年度採択研究代表者

吉川 信也

(姫路工業大学理学部 教授)

「水素イオン能動輸送機構の構造生物学的解析」

1. 研究実施の概要

平成11年10月にはSpring-8に建設中の専用ビームラインが稼動を始めた。そこでこれまでの最大の懸案であった、ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶の凍結X線回析実験の条件の検討を組織的に行った。その結果、1.65 分解能までのX線回析斑点の検出できる程度に条件は改善された。またいくつかの反応中間体のデータ収集にも成功した。しかし、構造変化を検出できるに十分な精度のデータが得られていない可能性も否定できないので、さらに凍結前の処理方法を始めとして全面的に検討している。一方、プロトンポンプ部位と考えられるAsp51はFe_aかCu_Aのどちらか一方の還元によって脱プロトン化することがFTIR法によって明らかになった。また細菌チトクロム酸化酵素の無細胞系での発現にもほぼ成功した。一方休止型チトクロム酸化酵素の架橋過酸化物の共鳴ラマン分光法による確認には、レーザー光に対する強すぎる感受性のためか、まだ再現性が不十分であるのでさらに検討を続けている。低温スペクトル装置と高感度赤外分光装置は予想外の問題点がいくつか発見され、現在、必要なところは設計を変更して、検討している。来年度上半期の完成を目指している。

2. 研究実施内容

1) ウシ心筋チトクロム酸化酵素のX線結晶解析 (蛋白質結晶学グループ、生化学グループ、振動分光学グループ)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶の凍結前の処理方法について組織的に、不凍済の種類まで含めて、検討した。その結果、エチレングリコールに交換しフラッシュ法で凍結することによって再現性にもX線回析能にも大きな進歩が認められ、現在1.65 分解能程度のX線回析斑点が再現性よく認められている。現在1.8 分解能での構造解析を進めている。

反応中間体であるP型およびF型の結晶を調整し低温で固定するためには、結晶中のチトクロム酸化酵素の吸収を精密に測定し、中間体が得られたときに凍結して固定することが必要である。そのための操作を可能にするための空間を持たせた結晶用の分光光度計を設計試作した。現在中間体をH₂O₂によって効率よく作る

方法を検討している。

リン脂質の構造の精密化がほとんど完了し、単量体当たり14個のリン脂質が確認された。内訳はカルジオリピン 5 個、フォスファチジルコリン 1 個、フォスファチジルエタノールアミン 3 個、フォスファチジルグリセロール 5 個である。これらの含む総リン原子数は19であるので、結晶中のリンの化学分析値 24 ± 5 と有意の差は認められない。したがって結晶中に含まれる固有のリン脂質は全て、X線構造中に確認できたと言える。この結果はX線構造解析は構造決定だけでなく、組成の決定にも強力であることを示している。

2) 細菌およびウシ酵素の遺伝子発現実験 (分子生物学グループ)

細菌 (パラコッカス) の遺伝子の無細胞発現系の確立にほぼ成功した。酵素の発現は還元型チトクロムCの酸化活性により確認した。次の目標は発現量を増加させ、吸収スペクトル、活性等の生化学的研究を可能にすることである。ウシ酵素のサブユニット I・IIIでの発現を同じ系で試みたが、成功しなかった。この原因を解明することは核遺伝子支配のサブユニットの機能の解明のためにも有用である。

3) チトクロム酸化酵素の活性中心の構造の分光学的研究 (振動分光学グループ、生化学グループ)

昨年度の実験で検出することのできた、休止型完全酸化型酵素の架橋過酸化物によると考えられる 670cm^{-1} の共鳴ラマン線のH/D交換効果を検討している。しかし、光感受性が強いとため、再現性が不十分であるので、現在完全酸化型の調整法も含めて再検討を行っている。

AspとGluのカルボキシル基の解離を赤外分光法によって検討した。還元型に対する酸化型の差スペクトルの 1740cm^{-1} 付近にCOOH 1 残基分に相当する強度の吸収極大が認められた。また、 1580cm^{-1} 付近にCOO⁻に相当する負の極大が認められた。したがって、還元によってCOOH 1 残基が解離していると考えられる。X線構造はこのような変化の可能なAspあるいはGluはAsp51しかありえないことを示している。さらに、CN⁻存在下で滴定実験を行ったところ吸収スペクトルから見積もられた還元当量にほぼ比例して 1740cm^{-1} 極大は減少し、3電子当量で完全に消失することが認められた。したがって、 $\text{H}\mu\text{a}$ か $\text{C}\mu\text{a}$ のどちらかの酸化還元中心 1ヶ所によってこのカルボキシル基の立体構造が制御されているといえる。

4) 複合体 I の初期定常状態の解析 (生化学グループ)

複合体 I の精製法が著しく改善され、酵素活性測定の精度も高められたので、初期定常状態を詳細に解析することができるようになった。その結果、QとQH₂がそれぞれ最初の基質と最後の反応生成物であるような定序反応であることを明らかにすることができた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

M. Mochizuki, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, T. Usui, T. Tsukihara and S. Yoshikawa
"Quantitative reevaluation of the redox active site of crystalline bovine heart cytochrome
c oxidase" J. Biol. Chem. 274, 33403-33411 (1999).

S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh and T. Tsukihara, " The structure of crystalline bovine
heart cytochrome c oxidase" in Frontiers of Cellular Bioenergetics, S. Papa (ed.), Kluger
Academic/Plenum Publishers, New York (1999) pp. 131-156.

S. Yoshikawa, " X-ray structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome c
oxidase" Biochem. Soc. Trans. 27, 351-362 (1999).

吉川信也 シトクロム酸化酵素 蛋白質核酸酵素 増刊「構造生物学のフロンテ
ィア」第44巻 530-537 (1999)