

チトクロム *bd* のスカラー機構によるプロトン輸送

○茂木立志¹、三芳秀人²

¹JST・ERATO・ATP システム、¹東工大・資源研、²京大・大学院農学研究科

連絡先：tmogi@res.titech.ac.jp

<緒言>チトクロム *bd* 型キノール酸化酵素は2分子のヘム *b* と1分子のヘム *d* を結合するバクテリアの2サブユニット酵素 (CydAB ; 茂木ら, 2006b) で、ミトコンドリア呼吸鎖の [複合体III+複合体IV] 部分の役割を担っている。酸素分圧の低い増殖条件下で働く呼吸酵素のモデル系として、大腸菌酵素の分子科学的研究が詳細に進められ、低スピノヘム *b*₅₅₈ (His186, Met393) と高スピノヘム *b*₅₉₅ (His19) の軸配位子は同定されたが (Fang ら, 1989)、ヘム *d* についてはヘム *b*₅₉₅-*d* 複核中心を構成することとヘム *d* の配位子は窒素原子であるという段階に留まっている (鍔木ら, 1993, 1995; 堀ら, 1996) (図1)。最近、絶対嫌気性菌 (*Geobacter*, *Desulfovibrio* 等) のナノ酸素呼吸や病原菌 (*Mycobacterium*, *Brucella* 等) の宿主細胞内での適応と病原性発現におけるチトクロム *bd* の役割が注目されている。

われわれは、細胞質側で酸素分子の還元によって4個のプロトンを取り込み、細胞の外側 (ペリプラズム側) で2分子のキノールの酸化によって4個のプロトンを遊離して見かけ上プロトンを膜輸送するスカラー機構を解明するため、大腸菌酵素のプロトン放出部位 (ユビキノール酸化部位) の構造を検討してきた。キノン環の2または3位にアジド基を導入した基質アナログを用いた光親和性標識によってメトキシ基はサブユニットIのV/VII (Q) ループのGlu280近傍にあること (松本ら, 2006a)、Ala/Gln置換変異体の速度論的解析からQループのN末側のLys252とGlu257は基質の結合と酸化に関わっていることを明らかにした (茂木ら, 2006a)。

本研究では、1) 基質酸化部位の構造をアミノ酸の置換変異とヘムの置換によって調べ、2) 細胞質からヘム *d* に至るプロトン取り込みチャネルを同定するためにサブユニットIの膜内アミノ酸残基の置換変異の効果を検討した。

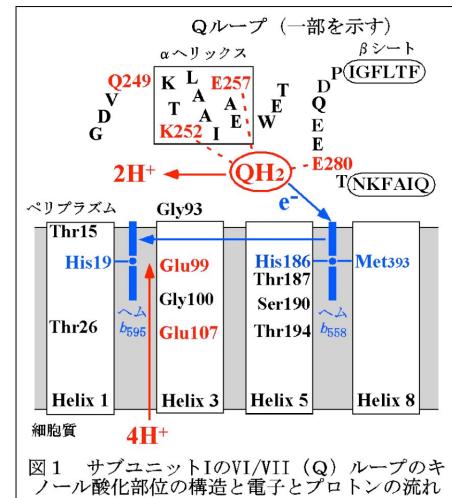


図1 サブユニットIのVI/VII (Q) ループのキノール酸化部位の構造と電子とプロトンの流れ

<方法>アミノ酸置換変異はプラスミド pNG2 と QuickChange XL を用いて導入し、変異酵素は ST4683 ($\Delta cyo \Delta cyd$) / pMF09 (cyo^+) / pNG2 (cyd) 株で発現させた。一晩培養した菌体を超音波破碎後、細胞膜小胞をショ糖密度平衡遠心で単離し、変異酵素はスクロースモノラウレートで可溶化後、陰イオン交換 HPLC と Ni-NTA カラムを用いて精製した。キノール酸化活性は *ping-pong bi-bi* 機構 (松本ら, 2006b) で解析を行な

い、ヘムO合成酵素の過剰発現にはBL21/pLysS/pTTQ18-cyoE株等を用いた。

<結果と考察> 1) 基質酸化部位: 保存的な置換変異体を新たに作成したが、K252RおよびE257Dでは発現量が低下し、K252R、E257D、E280Dのいずれの変異体でもユビキノール1酸化活性の回復は見られず、基質の結合・酸化にはアミノ酸残基の側鎖の電荷のみならずサイズも重要であることが判った。基質・阻害剤のキノール酸化酵素への結合は電子を受け取る低スピinnヘム bの吸収と酸化還元電位に影響を与えることが知られている。そこで、ヘムO合成酵素の過剰発現によってチトクロム bdに結合するヘム bを置換させ、基質酸化活性に及ぼす影響を検討した。精製チトクロム bdのヘムの組成は bbd型から obd型に変わり、ヘムOに置換された還元型ヘム b₅₅₈のαピークは561 nmから558 nmに、Soretピークは428 nmから423 nmにシフトした。また、ユビキノール1に対する K_m 値は1.5倍増加し、 k_{cat}/K_m 値は対照の7%に低下した。枯草菌酵素のヘム dはヘムBで置換できるが(Azarkinaら, 1999)、大腸菌酵素の電子受け取り部位のヘム b₅₅₈のヘムOによる置換は基質酸化部位とヘム b_{595-d}複核中心の双方に大きな影響を与えることが判った。

2) プロトン取り込みチャネルの探索: ヘム dの軸配位子が現在も不明なので、ヘム b₅₉₅を結合するヘリックス1、保存性Glu残基を含むヘリックス3、ヘム b₅₅₈を結合するヘリックス5の膜内の親水性残基または側鎖の小さいGly残基を細胞質からヘム dに至るプロトンチャネル構成する残基の候補として考え(図2)、その置換効果を検討した。ヘリックス1では、ペリプラズム側のThr15(Thr/Serの保存性, 39/45)のLeu変異体は野生型の表現型を示し、細胞質側のT26L(45/46)変異による酵素活性の減少はヘム d含量の減少によることが判った。ヘリックス4のペリプラズム側のGly93(41/46)およびGly100(18/46)のAla置換は酵素活性およびヘム d含量を維持できるので、両Gly残基は機能に必須ではない。一方、Glu99(46/46)およびGlu107(46/46)の置換変異は、ヘム b_{595-d}複核中心および酵素活性を著しく減少させ、ヘム dの近傍にあることが示唆される。酵素の還元に伴って水素結合変化する3個のカルボキシル残基(山崎ら, 1999)に対応する可能性が考えられる。ヘリックス5のThr187、Ser190、Thr194は保存性も低く、ヘム b₅₅₈配位子の隣のT187L変異によるヘム b₅₅₈含量の低下を除いて大きな影響は無いのでプロトン輸送への関与は低いと結論した。本研究では、ヘムの結合に影響を与えるに化学プロトンの取り込み速度の減少に伴って酵素活性を減少させる変異は得られなかつたが、ヘリックス3のGlu99とGlu107はヘム d軸配位子同定の糸口として重要であり、化学プロトンの取り込みチャネルを構成する残基の有力な候補である。

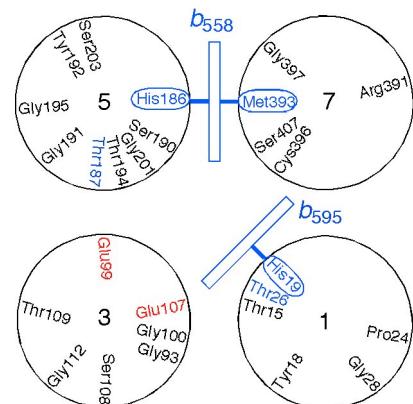


図2 サブユニット1の反応中心の投影モデル