

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、低スピンヘム *b*₅₅₈ (His186, Met393) と高スピンヘム *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 (鏑木ら, 1993, 1995; 堀ら, 1996) (図1)。

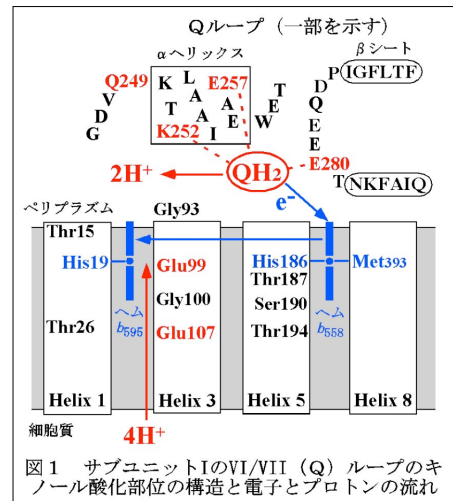


図1 サブユニットIのVI/VII (Q) ループのキノール酸化部位の構造と電子とプロトンの流れ

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/VI (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。

<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。一晚培養した菌体を超音波破碎後、細胞膜小胞をシヨ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

