

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 2月28日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770155

研究課題名（和文）変異体を用いたウシチトクロム *c* 酸化酵素の水素結合ネットワークの機能解析研究課題名（英文）Mutagenesis analysis of hydrogen bond network formed in bovine heart cytochrome *c* oxidase

研究代表者

網中 良太 (AMINAKA RYOHTA)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：30467724

研究成果の概要（和文）：ウシチトクロム *c* 酸化酵素の水素結合ネットワークの一つ D-pathway の機能を検証するために、HeLa 細胞を用いたウシ・ヒト雑種酵素発現系により変異体解析した。対応する経路が細菌酵素にあり、水形成用のプロトン (H^+) とポンプ用 H^+ を輸送すると提案されている。両者は構造が酷似し、重要なアミノ酸残基も保存されているため、ウシ酵素も同じ機能をもつと推測され、我々が提案している H^+ ポンプ経路と対立している。本研究の結果、ウシ酵素の D-pathway はポンプ用 H^+ を輸送しないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We carried out mutagenesis analyses of a hydrogen bond network, designated as D-pathway, formed in the bovine heart cytochrome *c* oxidase employing HeLa cell bovine/human hybrid enzyme expression system developed by us. A pathway corresponding to this D-pathway is also found in the bacterial enzymes, and has been proposed to convey both pumping and water forming protons. The structures of these two pathways are almost identical to each other and amino acid residues essential to the bacterial enzymes are conserved in the bovine enzyme. Hence, it has been thought that these two have the same function, thereby opposing to the proton-pumping pathway of the bovine enzyme proposed by us. The results of this study strongly suggest D-pathway is not for pumping proton but for water forming proton.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,100,000	630,000	2,730,000
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

1. 研究開始当初の背景

(1) チトクロム *c* 酸化酵素（酵素）は、膜の正電荷側（図1の positive side）に局在したチトクロム *c* から電子を受容し、分子状酸素を還元するとともに、膜の負電荷側（図1

の negative side) から H^+ を供給して、水を形成する。この反応に共役して、膜の負電荷側から正電荷側へ H^+ をポンプする。以上の反応によって生じる電気化学的 H^+ 濃度勾配によって ATP 合成が駆動される。ウシおよび細菌

酵素の X 線結晶構造解析により両者の間で相同な 3 つの水素結合ネットワーク (D-、K-、H-path) が明らかにされた (図 1)。H⁺は水素結合ネットワークを介して効率よく輸送されると考えられるため、X 線構造は、これら 3 つが H⁺輸送経路であることを示唆する。

(2) 水形成用プロトン輸送経路

図 1 に模式的に示したように、D-、K-path は、膜負電荷側と酸素還元部位とを連結する。この構造上の特徴から、両経路は、水形成用 H⁺輸送経路であることが示唆され、細菌酵素の変異体解析により支持されている (例えば D-path の入り口の Asp91 と出口の Glu242 のそれぞれの変異が、酸素還元活性を消失させる)。水形成用に 4 等量の H⁺が必要であるが、D-、K-path により、2 等量ずつ (あるいは 1 と 3 等量) 輸送されることが変異体の解析結果から示唆されている。

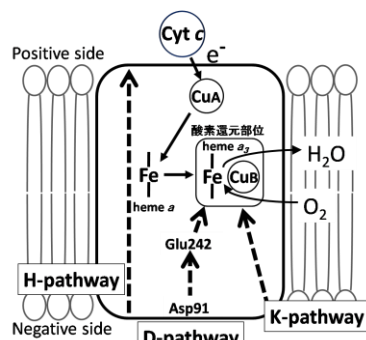


図 1 チトクロム *c* 酸化酵素の H⁺輸送経路

(3) ポンプ用プロトン輸送経路

①H-path ポンプ説 H-path は、酵素の膜両側の分子表面を連結し、酸素還元部位と隔離されている (図 2)。しかし、酸化還元中心のひとつへム a の 2 つの側鎖と水素結合しており、へム a の酸化還元によって駆動される H⁺輸送系であることが示唆される。経路末端の酸性アミノ酸残基 (Asp51) は、酸化型では分子内部の疎水性環境にあり (H⁺親和性が高い状態)、還元型では分子表面に露出する (H⁺親和性が低い状態)。この事実は、Asp51 は、H⁺ポンプ部位であることを示唆する (1, 2)。これは、この部位の Asn への置換がポンプ活性を失活させることから支持されている。また、本経路は、ペプチド結合を含み、この結合を介した一方方向的 H⁺輸送機構が提案されている (図 3)。この機構に必須であるペプチドのアミド水素を炭素に置換 (プロリンを導入) すると、ポンプ活性が消失した。そして、H⁺輸送過程で生じるエノール型ペプチドがタンパク質内部でケト型ペプチドに戻る反応は遅いと予測されていたが、理論的解析によって速やかな tautomerism 機構が見

いだされた (3)。以上の結果より、H-path が H⁺ポンプ経路であることが強く示唆されている (1, 2)。しかし、上記 Asp51 は、動物でのみ高く保存され、他の生物界では保存されていない。さらにペプチド結合を介した効率のよい H⁺移動は、他に例が知られていないため、この説を支持するものは少ない。

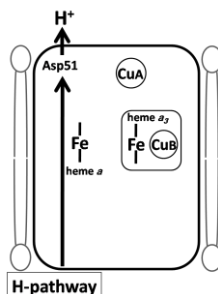


図 2 H-path ポンプ説

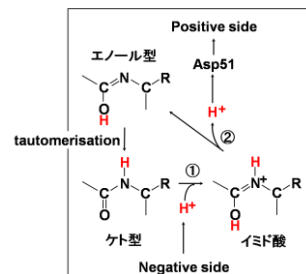


図 3 ペプチド結合を介した H⁺輸送機構

②D-path ポンプ説 D-path が水形成用 H⁺とともにポンプ用 H⁺も輸送すると提案されている (4, 5, 6)。この説では、D-path の末端まで輸送された H⁺が、酸素還元部位方向と、別の方向にそれぞれ振り分けられる (図 4)。細菌 D-path の入り口近く配置された中性のアミノ酸残基 (Asn98、Asn163、ウシ酵素の番号で表記) をそれぞれ酸性のアミノ酸 (Asp) に変異させると、酸素還元活性は高い状態で、ポンプ活性のみが消失した。これらの結果は、この説を支持すると解釈されている (6)。しかし、H⁺の振り分けを示唆する構造的知見はない。また、酸素還元部位への H⁺の漏れを防ぐ構造も備わっていない。但し、この経路の機能に重要であるアミノ酸残基は、よく保存されているため、この説は圧倒的支持を得ている。

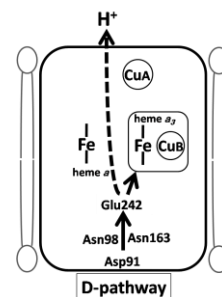


図 4 D-path ポンプ説

2. 研究の目的

ウシと細菌の酵素は、機能を担う部分の構造が相同であるため、同じ経路と機構で H⁺ポンプされると予想されている。しかし、それぞれの X 線構造と変異体解析とに基づいて、異なる経路と機構とが提案されている。細菌酵素の H⁺ポンプ経路 (D-path) は、水形成用 H⁺輸送経路でもあり、重要なアミノ酸残基が保存されているため、ウシ酵素も同じ経路でポ

ンプすると推測され、論争になっている。

しかし、この経路の機能は、ウシ酵素で検証されていなかった。本研究は、申請者らが開発した変異体発現系を用い、ウシ酵素の D-path の機能を検証した。

3. 研究の方法

本研究では、ウシチトクロム *c* 酸化酵素の D-path の機能を検証するため、4 種の変異体 (Asn98Asp, Asn163Asp, Glu242Gln, Asp91Asn) を作成し、変異が機能に及ぼす効果を検討した。本研究には、所属研究室が開発した HeLa 細胞を用いたウシ・ヒト雑種酵素の発現系を利用した (図 5)。

(1) 変異遺伝子の調製と発現ベクターの HeLa 細胞への導入

ウシ酵素は 13 個のサブユニットから構成される。3 つの水素結合ネットワークは、ミトコンドリア DNA にコードされるサブユニット I (Sub I) が担っている。変異を導入したウシ Sub I 遺伝子を、強力なプロモーター (CMV プロモーター) の支配下に置き、発現ベクターを構築した (図 5)。その後、発現ベクターを細胞に安定に保持させた。細胞質で合成されたサブユニットは、N 端に融合させたミトコンドリア標的シグナル配列によりミトコンドリアに輸送され、そこでヒトの他のサブユニットと集し機能化する (1, 2)。この細胞には、内在性のヒト酵素が共存するものの、この系では、雑種酵素は優勢に発現する (図 6)。

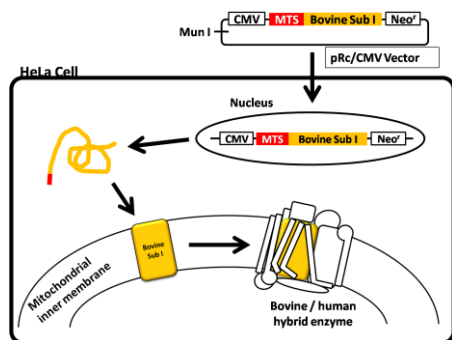


図 5 ウシ・ヒト雑種酵素の発現系

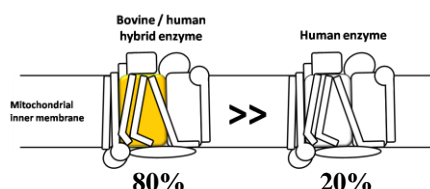


図 6 ウシ・ヒト雑種酵素が優勢に発現

(2) ウシ・ヒト雑種酵素形成の確認

雑種酵素が形成されたか否かは、ヒト Sub I に特異的な抗体を用いたイムノブロット法

で検討した。培養細胞からミトコンドリア標品を調製し、可視吸収スペクトルにより酵素濃度を決定した。その後、酵素濃度を一定にしたサンプルの SDS-PAGE を行い、イムノブロット法により定量的に優勢か否かを検討した。

(3) 活性測定

雑種酵素が形成されると、雑種酵素が優勢に発現し、内在性のヒト酵素が減少するため、変異体酵素を単離しないでミトコンドリアの状態でも機能を評価できる。

変異体発現株を培養後、ミトコンドリア画分を調製した。低張液で処理することでミトコンドリアの外膜が破壊されたミトプラストを調製し、内膜に局在する酵素のチトクロム *c* 酸化活性とプロトンポンプ活性を測定した。

①チトクロム *c* 酸化活性

酵素による還元型チトクロム *c* の酸化反応を、550 nm の吸光度変化を測定した。

②H⁺ポンプ活性

還元型チトクロム *c* の酸化と共役した、酵素による膜内側から外側への H⁺ の放出を pH 電極を用いて測定した。

(4) 変異の確認

発現ベクター内の遺伝子に導入した変異に加え、培養細胞内で、新たな変異が生じる可能性は低い。しかし、細菌酵素の変異体解析結果を支持しない変異体について、機能復帰突然変異を検討するため、全サブユニットの塩基配列を決定した。ゲノム DNA を抽出し、目的の DNA 領域を PCR により増幅後、塩基配列を決定した。また、イントロン領域を含み、目的遺伝子領域が長鎖におよぶものについては、mRNA の抽出後、RT-PCR により cDNA を調製し、目的の領域を PCR により増幅後、塩基配列を決定した。これにより、導入した変異遺伝子の保持、および、新たな変異の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) Asn98Asp, Asn163Asp 変異体解析結果

①イムノブロット解析

Asn98Asp, Asn163Asp 変異体発現ベクターを導入した株において、雑種酵素が優勢に発現しているか否かを、イムノブロット法により確認した (図 7a, b)。両変異体ともに WT に比べバンドの黒化度が低下していた。WT および変異体サンプルの酵素濃度を一定にして SDS-PAGE を行った。したがって、ヒト Sub I が顕著に減少し、ウシ Sub I が優勢に発現していることを示す。

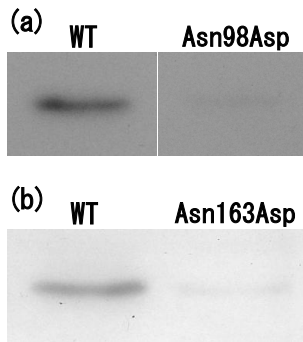


図7 Asn98Asp、Asn163Asp 変異体株のイムノブロット解析

②活性測定

雑種酵素が優勢に発現した株を用いてチトクロム *c* 酸化活性および H^+ ポンプ活性測定を行った(図8)。

チトクロム *c* 酸化活性測定において、両変異体は、WTと同様に速やかに還元型チトクロム *c* を酸化化した(図8a、b、c)。つまり、これらの変異は酸素還元活性に影響を与えなかった。

H^+ ポンプ活性測定において、還元型チトクロム *c* の添加後、反応液が酸性化した(図8d、e、f)。これは、膜内側から外側への H^+ の放出を示す。 H^+ イオノフォアである FCCP を添加すると、 H^+ の放出は認められなかった。これは、健全なミトコンドリア内膜に存在する酵素により、 H^+ が放出されたことを示す。両変異体においても、 H^+ が膜内側から外側へ放出された。したがって、両変異は H^+ ポンプ活性に影響を与えない。

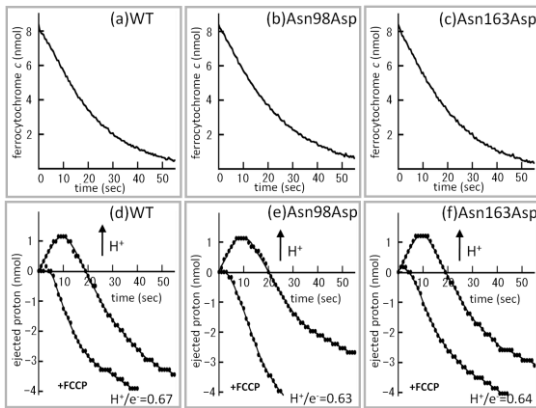


図8 変異体 Asn98Asp、Asn163Asp の活性測定 (a)、(b)、(c) チトクロム *c* 酸化活性。(d)、(e)、(f) H^+ ポンプ活性。(n=7-8)

③変異の確認

変異(Asn98Asp、Asn163Asp)は、酵素活性に影響を与えなかった。この結果は、細菌酵素の変異体解析結果とは異なる結果である。したがって、機能復帰突然変異を検討するため、全サブユニット遺伝子の塩基配列を決定した。その結果より、Sub I に導入した変異は保持され、それ以外の変異は全サブユニッ

ト遺伝子において認められなかった(表1)。したがって、これらの変異は酵素機能に影響を与えないことを示す。

表1 全サブユニット遺伝子の塩基配列決定 ○は変異が無かったことを示す。

Subunit Name	Gene Name	WT	Asn98Asp	Asn163Asp
Bovine Sub I	COX I	○	Asn98Asp	Asn163Asp
SubII	COX II	○	○	○
SubIII	COX III	○	○	○
SubIV	COX VI 1	○	○	○
SubVa	COX VA	○	○	○
SubVb	COX VB	○	○	○
SubVIa	COX VIA1	○	○	○
	COX VIA2	○	○	○
SubVIb	COX VIB1	○	○	○
	COX VIB2	○	○	○
SubVIc	COX VIC	○	○	○
SubVIIa	COX VIIA1	○	○	○
	COX VIIA2L	○	○	○
SubVIIb	COX VIIIB	○	○	○
	COX VIIIB2	○	○	○
SubVIIc	COX VIIC	○	○	○
SubVIII	COX VIIIA	○	○	○
	COX VIIC	○	○	○

(2) Glu242Gln 解析結果

①培養条件の検討

Glu242Gln 変異体は、通常の培養条件では細胞死が顕著であった。細菌酵素では、これらの変異は、酸素還元活性を消失する。ウシ酵素でも活性が消失しているために、細胞死が誘導されているのではないかと考えた。そこで、ミトコンドリア DNA 欠損株を培養する際に用いる培地へ変更し(培地組成; DMEM - high glucose, 10% fetal bovine serum, 200 μ g/mL G418, 1% penicillin - streptomycin, 1mM sodium pyruvate, 50 μ g/mL uridine)、継代の際にプレートに加える細胞数を増やして大量培養を行った。

②イムノブロット解析

Glu242Gln 変異体株において、雑種酵素の発現の有無をイムノブロットで確認した(図9)。変異体株のバンドの黒化度は WT に比べ $62.8 \pm 5.5\%$ (n=4)であった。つまり、内在性のヒト酵素が約 60%、雑種酵素が約 40%発現した株であった。

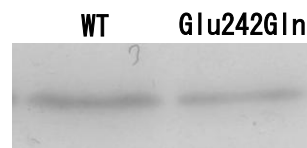


図9 Glu242Gln 変異体株のイムノブロット解析

③活性測定

得られた変異体株を用いて、チトクロム *c* 酸化活性および H^+ ポンプ活性測定を行った

(図 10)。

チトクロム *c* 酸化活性測定において、変異体は、WT に比べ活性が 40%低下した。また、 H^+ ポンプ活性においても、WT に比べ 40%低下した。

この変異体株では、内在性のヒト酵素が 60%、雑種酵素が 40%発現していた。40%の活性の低下は、雑種酵素によるものと考えられる。したがって、変異 Glu242Gln は酵素活性を消失させた。

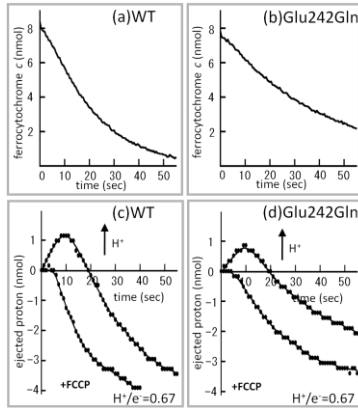


図 10 変異体 Glu242Gln の活性測定 (a)、(b) チトクロム *c* 酸化活性。(c)、(d) H^+ ポンプ活性。(n=7-8)

(3) Asp91Asn 変異体解析

①培養条件の検討

Asp91Asn 変異体も細胞死が顕著であったため、ミトコンドリア DNA 欠損株用培地を用いた。しかし、細胞死を抑制することはできなかった。そこで、この培地に活性酸素除去剤である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) を終濃度 1mM となるように添加した。その結果、細胞死が抑制された。また、NAC 添加培地で培養した細胞を、NAC 添加および無添加の培地へ同じ細胞数継代した。その後、3-4 日毎に新しい培地へ等体積の細胞懸濁液を継代した。その結果、NAC 無添加培地では細胞数が減少した(図 11、培養開始 26 日後に撮影)。この結果より、Asp91Asn 変異体株では、活性酸素が発生していると考えられる。これは、チトクロム *c* 酸化酵素の活性が低下していることを示唆する。

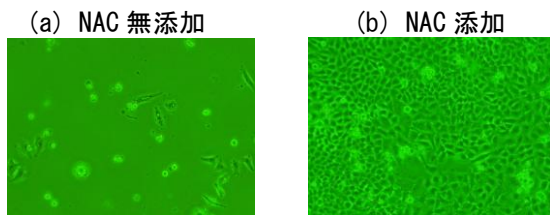


図 11 Asp91Asn 変異体株への NAC の効果

②イムノブロット解析

Asp91Asn 変異体株において、雑種酵素の発現の有無をイムノブロットで確認した。変異体株のバンドの黒化度は WT に比べ $60.5 \pm 10\%$ ($n=4$)であった。つまり、内在性のヒト酵素が約 60%、雑種酵素が約 40%発現した株であった。

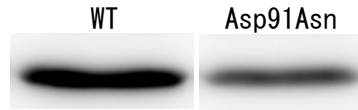


図 12 Asp91Asn 変異体株のイムノブロット解析

③活性測定

この変異体株を用いて、チトクロム *c* 酸化活性および H^+ ポンプ活性測定を行った(図 13)。その結果、WT に比べチトクロム *c* 酸化活性および H^+ ポンプ活性ともに 40%低下した。この株の雑種酵素の発現量は 40%であるため、この活性の低下は雑種酵素が酵素活性を消失したことによるものである。

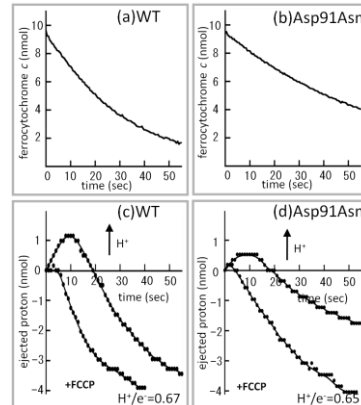


図 13 変異体 Asp91Asn の活性測定 (a)、(b) チトクロム *c* 酸化活性。(c)、(d) H^+ ポンプ活性。(n=7-11)

(4) 結論

変異 Asn98Asp、Asn163Asp は、ウシ酵素の活性に影響を与えなかった。これは、ポンプ用 H^+ を輸送しないこと示唆する。また、この結果は、細菌酵素の変異体解析結果とは異なる。変異 Asp91Asn、Glu242Gln は、酸素還元活性を消失した。これは、水形成用 H^+ を輸送することを支持する。以上の結果より、ウシ酵素 D-path は、水形成用 H^+ は輸送するが、ポンプ用 H^+ は輸送しないことが示唆される。ウシと細菌酵素の間で、機能を担う部位の構造が酷似しているにもかかわらず、D-path の機能が異なる。

(5) 参考文献

1. Tsukihara, T., et al. (2003) *PNAS* 100:15304-15309
2. Shimokata, K., et al. (2007) *PNAS* 104:4200-4205.
3. Kamiya, K., et al. (2007) *JACS* 9663-9673.
4. Smirnova,

I. A., et al. (1999) *Biochemistry* 38:6826-68335. 5. Pawate, A. S., et al. (2002) *Biochemistry* 41:13417-134236. 6. Pfizner, U., et al. (2000) *Biochemistry* 39:6756-67624.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Mutational analyses of D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase suggest that the pathway does not transfer the pumping protons R. Aminaka, M. Itoh, K. Shimokata, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1817, S104 (2012) 査読無し

② Mutagenesis studies on D-pathway function of bovine heart cytochrome *c* oxidase R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1797, 93-94 (2010) 査読無し

[学会発表] (計8件)

① R. Aminaka, M. Itoh, K. Shimokata, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa and H. Shimada, Characterization by mutagenesis analysis of putative proton transfer pathway, D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 第50回生物物理学会、名古屋、2012年9月22-24日

② R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, Mutational analyses of D-pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase suggest that the pathway does not transfer the pumping protons, 17th European Bioenergetics Conference, 2012年9月15-20日、フライブルク (ドイツ)

③ 網中良太、下方国稔、伊藤真衣、片山幸江、月原富武、吉川信也、島田秀夫、ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素のプロトン輸送経路の変異体解析、第37回日本生体エネルギー研究会、2011年12月20-22日、京都産業大学

④ R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, Mutagenesis analysis of proton transport pathway suggested by X-ray structure of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 第49回日本生物物理学会、2011年9月16-18日、兵庫県立大学

⑤ 招待講演 R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, Mutagenesis

analysis of proton transport pathway suggested by X-ray structure of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 第49回日本生物物理学会、2011年9月16-18日、兵庫県立大学

⑥ R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素の水形成用プロトン輸送経路の変異体解析、第36回日本生体エネルギー研究会、2010年11月18-20日、大阪大学

⑦ R. Aminaka, K. Shimokata, M. Ito, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa and H. Shimada, Proton pumping pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 第48回日本生物物理学会、2010年9月20-22日、東北大学

⑧ R. Aminaka, K. Shimokata, M. Itoh, Y. Katayama, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, H. Shimada, Mutagenesis studies on D-pathway function of bovine heart cytochrome *c* oxidase, 16th European Bioenergetics Conference, 2010年7月17-22日、ワルシャワ (ポーランド)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網中 良太 (AMINAKA RYOHTA)

兵庫県立大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：30467724