

## タンパク質の機能メカニズムの研究

Studies on functional mechanism of proteins

島田秀夫・片山幸江（特任）・網中良太（特任）  
Shimada, H., Katayama Y., Aminaka, R.

生物は細胞によって構成され、それら細胞の活動は、多種類の酵素・タンパク質の働きによって支えられている。それぞれの酵素・タンパク質は、固有のアミノ酸配列と立体構造をもつ。我々は、構造に基づいて、機能メカニズムを提案できるものの、そこでのアミノ酸残基の役割を検証することによって、提案を否定あるいはより確実にできる。アミノ酸残基の役割の検証には、部位特異的アミノ酸置換を用いた解析が有効であることがよく知られている。

チトクロム *c* 酸化酵素は、細胞呼吸系の末端に位置し、酸素分子を還元し水分子を形成するとともに水素イオン ( $H^+$ ) を、ミトコンドリア内膜（細菌では細胞膜）を横断して能動輸送 ( $H^+$ ポンプと呼ぶ) する。細菌酵素で提案されている  $H^+$ ポンプ経路と酷似した構造が、ウシ心筋酵素に見いだされ、アミノ酸残基も保存されているため、それは  $H^+$ ポンプ経路であると推定されている。一方、ウシ心筋酵素の構造解析と変異体解析は、異なる  $H^+$ ポンプ経路を示唆し、対立していた。ウシ酵素の前者の経路を変異体解析した結果、その経路の  $H^+$ ポンプ機能は支持されなかった。しかし、酸素分子を還元し、水を形成するための  $H^+$ の輸送経路であることが示唆された。

チトクロム P450 は、酸素分子の O-O 結合を還元的に開裂し、その一原子を有機物質に導入する反応を触媒する。本酵素群には、ホルモンなどの生体機能物質を合成するものや、薬毒物を代謝するものが含まれている。本酵素の活性部位を占める複数の水分子が基質によって排除される。それら水分子が、特定の経路を通じて排出される機構を提案している。その経路を閉じると予測される変異が、事実水の排出を妨害することを強く示唆する結果が得られており、提案は支持されている。

### 発表論文 List of Publication

- 1 Water expelling pathway of cytochrome P450cam - Effect of mutation of a gate forming Asp297 to Leu on D-camphor binding -, Kishimoto, A., Fujii, R., Sakurai, K., Harada, K., Shimokata, K., Hayashi, T., and Shimada, H. 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011

- 2 Reaction of norcamphor with cytochrome P450cam with a mutation of Asp297 forming a gate for putative water expelling pathway, Kitamura, N., Kishimoto, A., Fujii, R., Sakurai, K., Harada, K., Shimokata, K., Hayashi, T., and Shimada, H. 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011
- 3 Optimization of expression condition and purification of *cbb<sub>3</sub>*-type cytochrome c oxidase, Ando, Y., Sugimoto, A., Shimada, H., Shinzawa-Itoh, K., Genis, RB., Yoshikawa, S., and Muramoto, K. 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011
- 4 Development of a *Paracoccus denitrificans* cell-free protein synthesis system, Katayama, Y., Itoh, M., Yoshikawa, S., and Shimada, H. 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011
- 5 Mutagenesis analysis of proton transport pathway suggested by X-ray structure of bovine heart cytochrome c oxidase, Aminaka, R., Shimokata, K., Itoh, M., Katayama, Y., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., and Shimada, H., 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011  
(重要な成果として選ばれ、口頭発表に加え、会期中ポスターを掲示して、ポスター発表も行った。)
- 6 Diversity in proton pumping mechanisms of the terminal oxidases, Shimada, H., and Yoshikawa, S., presented in symposium “Structural Features and Molecular Evolution of Bioenergetic Enzymes.,” 第 49 回日本生物物理学会、姫路 9 月、2011
- 7 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、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、第 37 回日本生体エネルギー研究会、京都、12 月、2011
- 8 チトクロム *cbb<sub>3</sub>* 酸化酵素の発現と精製、安藤友里子・伊藤=新澤 恭子・島田秀夫・RB Gennis、吉川信也・村本和優、第 37 回日本生体エネルギー研究会、京都、12 月、2011

## 科学研究費補助金等

- 1 文部科学省研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(B) 課題番号 21370073  
研究課題 分子生物学的手法によるウシと細菌のチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究  
研究代表者 島田秀夫
- 2 文部科学省研究費補助金（平成 22～23 年度）若手研究 B 課題番号 22770155  
研究課題 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  
研究代表者 網中良太