

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・網中良太（客員）

Shimada, H., Aminaka, R.

生物は細胞によって構成され、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。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。その機能は、どのように発揮されるのだろうか？ 構造に基づいて、機能メカニズムを提案し、それを検証し、その結果を踏まえて新たに提案・検証を展開して解明に務める。

チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) 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 (mt) 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。ウシ心筋 CcO の構造が示唆する H⁺ポンプ経路は、細菌 CcO で提案されている経路と異なる。しかし、細菌酵素で提案されている経路に酷似した構造が、ウシ心筋 CcO に認められる。ウシ・ヒト雑種 CcO の HeLa 細胞発現系を利用した変異体解析は、この経路を支持しない。しかし細胞内での新たな変異によって機能が回復した結果、変異の効果が現れなかった可能性は否定できない。そこで、細胞内で発現する全 CcO サブユニット遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、その可能性は否定された。

チトクロム P450 (P450) は活性部位にヘムを含み、酸素分子を還元的に開裂するとともに、その一原子を脂溶性物質に導入する反応 (水酸化反応) を触媒する。P450 のモデル型である土壌細菌由来の P450cam は、樟脳 (D-camphor) を部位および立体特異的に水酸化する。分子内奥に配置された活性部位に基質が結合すると、基質侵入経路が閉じるとともに活性部位が再構築され基質と広範囲のアミノ酸残基が強く相互作用し、水酸化部位の特異性が決定される。この過程のメカニズムを解明することを目指し、基質結合反応の中間体と最終の X 線結晶構造を決定した。基質侵入経路が開いた状態で、ヘムが基質を疎水結合によって捕捉し、基質と活性部位アミノ酸残基とを近接させる。ついで誘導適合的に構造が変化し最終構造に移行する。ヘムの広い疎水性表面が基質を緩やかに捕捉する結果、その部位で基質が回転し一連の過程が進行する。補欠分子としてのヘムの新規な役割である。

発表論文 List of Publication

1. Substrate access to slow substrate binding P450cam with mutation at proposed gate for water egress/ingress from/to the active site, Ayaka Kishimoto, Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima, Keisuke Sakurai, Katsuyoshi Harada, Takashi Hayashi, Hideo Shimada、第 51 回日本生物物理学会、10 月 28 日、京都、2013
2. Heme serves as scaffold for substrate-driven active site structuring in cytochrome P450cam, Kenji Takagi, Ayaka Kishimoto, Aya Amano, Keisuke Sakurai, Kazumasa Muramoto, Tsunehiro Mizushima, and Hideo Shimada, 第 51 回日本生物物理学会、10 月 28 日、京都、2013
3. Sequencing bovine/human hybrid cytochrome *c* oxidase genes in HeLa cells to verify mutagenesis results disapproving D-path proton pumping, Ryohta Aminaka, Mai Itoh, Kunitoshi Shimokata, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada, 第 51 回日本生物物理学会、10 月 30 日、京都、2013
4. Heme as scaffold for substrate binding coupled active site structuring in cytochrome P450cam, Kenji Takagi, Ayaka Kishimoto, Aya Amano, Keisuke Sakurai, Tsunehiro Mizushima, Hideo Shimada, 1st International Picobiology Institute Symposium, January 7-8, Kouto (Hyogo), 2014
5. Proposed pathway for waters excluded by substrate binding from the active site of cytochrome P450cam – Effects of mutation that blocks the pathway on camphor binding and protein structure-, Ayaka Kishimoto, Rie Fujii, Kenji Takagi, Tsunehiro Mizushima, Keisuke Sakurai, Katsuyoshi Harada, Takashi Hayashi, Hideo Shimada, 1st International Picobiology Institute Symposium, January 7-8, Kouto (Hyogo), 2014