



# DOJIN NEWS

2014 No.152

ISSN 0385-1516

ドージンニュース

## CONTENTS

### ●Review

蛋白質のレドックス状態の可視化方法の開発  
東京工業大学 原 怜・久堀 徹

### 連載

膜タンパク質機能解析のための結晶構造解析戦略  
兵庫県立大学大学院 吉川 信也

### ●Topics on Chemistry

膜透過性ポリジスルフィド(CPDs)を用いた細胞内導入  
株式会社同仁化学研究所 見汐 航太郎



表紙撮影：産山村のヒゴタイ公園  
photo：永島俊介氏

## CONTENTS

### Review

蛋白質のレドックス状態の可視化方法の開発 ●—— [1]

東京工業大学 原 怜・久堀 徹

### 連載

膜タンパク質機能解析のための結晶構造解析戦略 ●—— [7]

兵庫県立大学大学院 吉川 信也

### Topics on Chemistry

膜透過性ポリジスルフィド (CPDs) を用いた細胞内導入 ●—— [16]

株式会社同仁化学研究所 見汐 航太郎

### Commercial

開発中

レドックス応答タンパク質解析関連試薬 ●—— [6]

新製品

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化物検出蛍光試薬 ●—— [17]

### お知らせ

パンフレットのご案内 ●—— [17]

第25回フォーラム・イン・ドージン開催 ●—— [18]

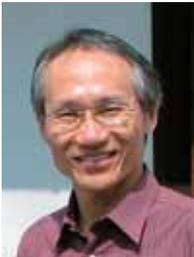
## 蛋白質のレドックス状態の可視化方法の開発

### Visualization of the redox status of protein



原 怜

東京工業大学  
資源化学研究所附属資源循環研究施設  
特任助教



久堀 徹

東京工業大学  
資源化学研究所附属資源循環研究施設  
教授

### Abstract

Redox status of the redox responsive proteins are critical factors to assess their functions. Especially the thiol residue is one of the most reactive side chain in the protein that is subject to change in cellular redox states. A convenient visualization system for the redox state of protein thiol group serves as a useful tool to know the situation of the protein of interest. For the purpose, several chemical modifiers such as AMS and PEG-maleimide were applied to date. After modification of thiols in the protein by these chemicals, the number of the free thiols can be detected as a mobility shift using SDS-PAGE. However, these chemicals showed several disadvantages such as small mobility shift to investigate larger proteins, or non-uniformity after the modification to determine the number of the labeled thiols. To overcome these disadvantages of the conventional chemical modification methods, we developed a new thiol modifier, DNA-maleimide. The advantages of this chemical is discussed.

## 1. はじめに

1964年にLaurentらは、デオキシヌクレオチド還元酵素の研究の過程で、この酵素が基質のヌクレオチドを還元するときに重要な役割を持っている小さな蛋白質を発見し、チオレドキシニン（チオール酸化還元に関わる蛋白質の意）と命名した<sup>1)</sup>。その後の研究により、チオレドキシニンは、生物界に普遍的に存在する蛋白質であることがわかってきた。チオレドキシニンは、分子量12,000くらい、分子内に2つのシステインを含むよく保存された配列であるWCGPCを持った蛋白質で、4本の $\alpha$ ヘリックスと5本の $\beta$ ストランドで構成される特徴的な構造を持っている<sup>2)</sup>。

1970年代後半に、アメリカのBuchananらのグループが、高等植物の葉緑体にやはりチオレドキシニンが存在すること、および、特に葉緑体で行われる光合成の炭酸同化反応を触媒する酵素のいくつかの活性が、チオレドキシニンによって酸化還元制御を受けていることを発見した<sup>3)</sup>。光合成では、光エネルギーをまずクロロフィル分子が吸収し、葉緑体チラコイド膜に存在する2つの光化学反応中心にエネルギーを集約してこれを励起することで水から $\text{NADP}^+$ までの電子伝達を駆動し、還元物質である $\text{NADPH}$ を生産する。この電子伝達反応の際にチラコイド膜のストロマ側からルーメン側に輸送されるプロトンによって形成されるチラコイド膜内外のプロトン駆動力を利用して、 $\text{ATP}$ を合成する。この一連の反応は、「明反応」と呼ばれる。一方、これらの反応によって合成された $\text{NADPH}$ と $\text{ATP}$ は、葉緑体のストロマで働くカルビン回路で二酸化炭素を同化する際に用いられ、糖が合成される。この糖を合成する反応は純粋に酵素反応であり、光の有無に依存しないと考えられたため「暗反応」と呼ばれた。ところが、葉緑体のチオレドキシニンが光合成の電子伝達系から還元力を受け取り、これによって炭酸同化系の酵素群が活性化されていることが明らかになり、カルビン回路は明所で働くことが明らかになった。このため、暗反応という呼び方はあまり使われなくなった。ともあ

れ、炭酸同化に関わる複雑な反応過程を担う酵素のうち、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ( $\text{GAPDH}$ )、フルクトース1,6-ビスホスファターゼ( $\text{FBPase}$ )、セドヘプツロース1,7-ビスホスファターゼ( $\text{SBPase}$ )、ホスホリブプロキナーゼ( $\text{PRK}$ )の4種類は、チオレドキシニンによって酵素分子が還元されることで活性化する、いわゆる「チオール酵素」である。これらの酵素は、いずれも分子内に酸化還元応答するひと組以上のチオール基を持っており、これが酸化されてジスルフィド結合を形成した場合に、酵素活性が低下、ないし、失活することが知られている<sup>4)</sup>。

葉緑体の $\text{ATP}$ 合成酵素は、ミトコンドリアの $\text{ATP}$ 合成酵素や細菌細胞膜に存在する $\text{ATP}$ 合成酵素と基本的に同じ分子構造を持った複合体蛋白質である。1997年にこの酵素は中心軸の $\gamma$ と呼ばれるサブユニットが触媒反応の過程で一方向に回転することが明らかになり、もっとも単純な構造をした分子モーター蛋白質として知られている<sup>5, 6)</sup>。すでに、酵素自身は発見されてから60年を経過し、生化学的にも非常によく研究されている。葉緑体 $\text{ATP}$ 合成酵素は、ミトコンドリアや細菌由来の $\text{ATP}$ 合成酵素とは異なり、単離精製しても $\text{ATP}$ 加水分解活性を示さない。ところが、葉緑体の $\text{ATP}$ 合成酵素は、 $\text{dithiothreitol}$  ( $\text{DTT}$ )のようなチオール還元試薬で処理すると、高い活性を示すようになる。この活性調節に関わっているのは、やはり酵素分子内に存在するジスルフィド結合であり、この結合を形成する二つのシステインは回転する軸部分である $\gamma$ サブユニットにある<sup>7)</sup>。すなわち、 $\text{ATP}$ 合成酵素は、その部品の蛋白質分子が還元されたり、酸化されたりすることによって、回転したりしなかったりを調節できる巧妙な分子モーターというわけである<sup>8)</sup>。

葉緑体には、もうひとつ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ( $\text{G6PDH}$ )というユニークなチオール酵素がある。この酵素は、フルクトース1,6-ビスリン酸から分岐して、酸化的ペントースリン酸回路に代謝系をつなぐ重要な酵素である。この酵素も酸化還

元で活性が変化するスイッチを持っているが、この酵素はこれまで述べてきた葉緑体の酵素とは異なり、酸化されたときに活性型、還元されると不活性型になる。つまり、他のチオール酵素とは逆の制御を受けている<sup>9)</sup>。

葉緑体では、光があたると内部が還元型になり、炭酸同化系の酵素群が活性化して炭酸同化反応が行われるわけだが、夜になるとこれらの酵素は酸化され反応は停止する。また、光合成の電子伝達系が停止すると、NADPHも供給されなくなる。NADPHは細胞内で還元力としてさまざまな代謝系に使われているため、これが供給されない夜間は不都合が起こる可能性がある。しかし、ペントースリン酸回路もNADPHの供給をする重要な役割を担っているため、夜間、光合成の電子伝達系が動いていないときには、この回路が積極的に働くことでNADPHを供給するわけだ。

この例でもわかるように、蛋白質の酸化還元を直接反映するチオール基による酵素の酸化還元制御は、基質や生産物、補因子による制御とともに、酵素機能の制御システムとして非常に重要である。

## 2. 植物細胞内レドックスの重要性：チオレドキシニアフィニティークロマトグラフィー

私たちのグループが、高等植物を材料として酸化還元蛋白質の研究を始めたのは、1997年頃のことである。当時は、前節に記したように、植物の葉緑体で重要なチオール酵素がいくつか発見されており、これを仲介するチオレドキシンの重要性が認識され始めた時期でもあった。チオレドキシンは、それ自身が2つのシステインのチオール基を持っており、標的となる蛋白質（こちらはジスルフィド結合を持っている）との間で、ジチオール-ジスルフィド交換反応を行い、結果的にチオレドキシンは酸化型に、標的蛋白質が還元型になる。この交換反応の過程で、まず、チオレドキシンが持つ2つのチオール基の一方が標的蛋白質のジスルフィド結合と反応して、分子間ジスルフィド結合を形成する。次に、チオレドキシンのもうひとつのチオール基がこの分子間ジスルフィド結合を求核攻撃して、チオレドキシ側にジスルフィド結合が移り、標的蛋白質の方はジチオール型、すなわち還元型に

なる。細胞内には、システイン残基を持った蛋白質は多数あるし、特に光合成生物の場合には、水の分解によって発生する酸素が常に細胞内に存在するので、これらシステインは酸化ストレスにいつも曝されていることになる。従って、葉緑体内には酸化されている蛋白質が多数あると考えられたが、先にも述べたようにそれまでに明らかにされていたチオレドキシンの標的酵素は驚くほど少なかった（図1）。

そこで、最初に私たちが行った研究は、チオレドキシンの標的を積極的に探索することであった。方法としては、チオレドキシンそのものを捕捉担体として用いるクロマトグラフィーを考案した<sup>10)</sup>。すなわち、チオレドキシンが持っている二つのシステインの一方をセリンに置換し、この変異型チオレドキシンが標的蛋白質のジスルフィド結合と反応した時に、そこで反応が停止するようにした。このような変異型チオレドキシンをクロマトグラフィー担体に固定することで、チオレドキシンの標的となり得る蛋白質だけが、チオレドキシンを介して担体に捕捉されるものと予想したのである。反応後は、塩や界面活性剤で担体をよく洗浄して非特異的に吸着しているであろう蛋白質を洗い落とし、最後にジチオスレイトールなどを用いて分子間ジスルフィド結合を還元すれば、チオレドキシンの潜在的な標的蛋白質が網羅的に回収できる、と考えたわけである。

実際、葉緑体から調製した可溶性蛋白質画分を標的蛋白質群として上記のような実験を行ってみると、予想通り、さまざまな蛋白質が捕捉されることがわかった<sup>11)</sup>。この実験を行っていた当時は、まだ高等植物の全ゲノムの解析が行われる前だったので、捕捉された蛋白質をSDSゲル電気泳動で分離し、それぞれの蛋白質のN末端アミノ酸配列をひとつずつ解析するという古典的な方法で、どのような蛋白質が捕捉されたのかを調べた。その結果、それまで葉緑体チオレドキシンの標的蛋白質として報告されていたチオール酵素以外に、複数の新規の蛋白質を得ることに成功した。そして、私たちがこの方法を論文発表した翌年から、数多くの研究者が同様の方法をさまざまな生物種やオルガネラを標的として同様の研究を実施した。ちょうど、生物の全ゲノム情報が充実し始めた時期でもあり、蛋白質の同定技術の進歩の助けもあって、チオレドキシン標的蛋白質候補の数は、爆発的に増加した。例えば、高等植物の葉緑体の場合は、私たちが1997年に研究を開始した当時、10種類しか報告がなかったチオール酵素は、現在では葉緑体の中におそらく300種類、植物全体で400種類の蛋白質がチオレドキシンと相互作用する可能性がある<sup>12)</sup>（表1）。

このようなプロテオミクス解析の進展を強力にサポートしたのが、質量分析法の著しい進歩である。質量分析法自体は、1990年代から実用化されていたが、当初は蛋白質のような巨大分子について正確な分子量を得ることが難しかったし、試料の取扱いも難しく、分析機器も高価で誰も利用できる環境にはなかった。しかし、2002年にノーベル化学賞を受賞したMALDI TOF MS法が急速に進歩し、高分子量の蛋白質の分子量を簡便な方法で正確に分子量決定できるようになった。さらに、2000年に高等植物では先駆けとなるシロイヌナズナの全ゲノムが解読され、ペプチドマスフィンガープリント法(PMF法)によって簡単に蛋白質の同定を行うことが可能になった。このような技術とデータベースの発達で、これまでわかっていなかった蛋白質の翻訳後修飾についても数多くの知見がもたらされた。特に、システイン残基については、それまで酸化でジスルフィド結合を組むことくらいしかわかっていなかったが、グルタチオンが結合するグルタチオン化、

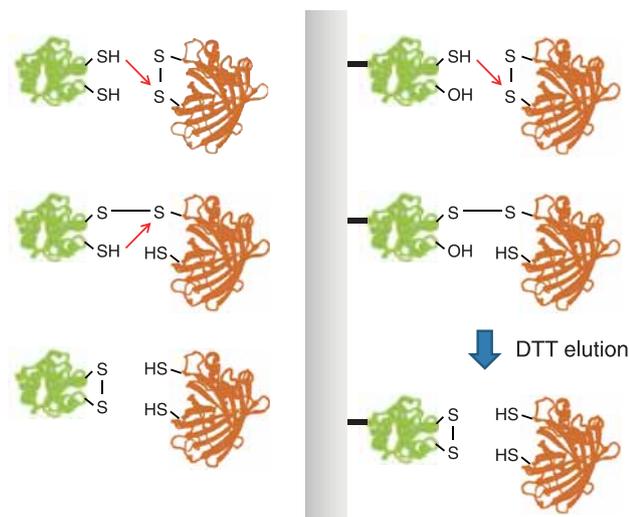


図1 Trxによるジチオール-ジスルフィド交換反応とTrxアフィニティークロマトグラフィー

表 1 Trx 標的酵素のプロテオミクス解析の代表例

Year	Sources	Method	Findings	Reference
1999	Yeast cytosol/Arabidopsis Trx	Mixed-disulfide formation	Type II Prx	Verdoucq <i>et al.</i> , 1999
2001	Peanut seed	mBBR label, 2D	20 proteins	Yano <i>et al.</i> , 2001
	Spinach chloroplasts	Trx affinity	4 proteins	Motohashi <i>et al.</i> , 2001
2002	Chlamydomonas cells	Trx affinity	2-Cys Prx	Goyer <i>et al.</i> , 2002
2003	Spinach chloroplasts	Trx affinity	26 proteins	Balmer <i>et al.</i> , 2003
	Synechocystis PCC6803	Trx affinity	26 proteins	Lindahl and Florencio, 2003
2004	Arabidopsis cytosol	Trx affinity	11 proteins	Yamazaki <i>et al.</i> , 2004
	Arabidopsis thaliana	Alkylation, thiol affinity	20 proteins	Lee <i>et al.</i> , 2004
	E. coli periplasm	DsbA affinity	16 proteins	Kadokura <i>et al.</i> , 2004
2005	E. coli cytosol	Tandem affinity tagging of Trx	80 proteins	Kumar <i>et al.</i> , 2004
	Synechocystis PCC6803	Trx affinity	5 proteins	Hosoya-Matsuda <i>et al.</i> , 2005
2006	Arabidopsis thylakoid membrane	Trx affinity	9 proteins	Motohashi <i>et al.</i> , 2006
2008	Barley embryo	ICAT	90 proteins	Hägglund <i>et al.</i> , 2008
2009	Plasmodium falciparum	Trx affinity	17 proteins	Nicole <i>et al.</i> , 2009
2010	Arabidopsis chloroplast lumen	Trx affinity, mBBR label	19 proteins	Hall <i>et al.</i> , 2010
2013	Arabidopsis plasma membrane	Trx affinity	48 proteins	Ueoka-Nakanishi <i>et al.</i> , 2013
2014	Arabidopsis mitochondria	Trx affinity	101 proteins	Yoshida <i>et al.</i> , 2014

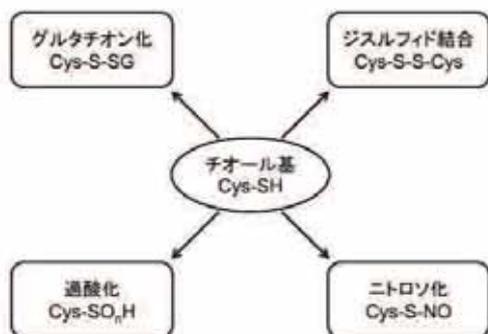


図 2 チオール基のいろいろな修飾

NO によって修飾を受ける S- ニトロソ化、強酸化によって起こるスルフェン化やスルフィン化など、さまざまな修飾が起こっていることがわかってきた (図 2)。

### 3. ペルオキシレドキシシンと蛋白質の酸化還元

ペルオキシレドキシシン(Prx)は、1988 年 Sue Goo Rhee らによって、酵素を酸化から守る機能を持った蛋白質として発見された<sup>13)</sup>。その後、Prx は分子が持っている還元型のチオール基が、標的のジスルフィド結合やスルフェン基、あるいは過酸化水素などの過酸化物を還元する機能を持つ抗酸化ストレス蛋白質であることがわかった。また、反応に関与するチオール基の数の違いによって、1-Cys 型、2-Cys 型、Atypical 2-Cys 型、および、Q 型に分類されること、生体内に非常に量が多い (場合によっては、総蛋白質の数%) 蛋白質であることも明らかになってきた<sup>14)</sup>。そして、Prx は、チオレドキシシンやグルタレドキシシンといった酸化還元蛋白質から還元力の供給を受けて、標的の還元を行っていることがわかってきた。以前から知られているアスコルビン酸ペルオキシダーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどとの大きな違いは、ペルオキシダーゼに比べて代謝回転速度が著しく遅いことである。一方で、過酸化物に対する Km はペルオキシレドキシシンの方がはるかに小さい。すなわち、ペルオキシダーゼがざっと掃除を済ませた後に、ペルオキシレドキシシンが丁寧にホコリを拭き取る役割を担っている、というイメージである。このペルオキシレドキシシンは、チオレドキシシンやグルタレドキシシンから還元力を

受け取って働き、過酸化物と反応して自身が酸化されると、再びチオレドキシシンなどの還元力を供給する蛋白質、あるいは、還元物質によって還元状態に戻ることが知られている。

従って、このようなレドックス蛋白質は、細胞内で常に還元型と酸化型の間で動的平衡状態にあると考えられる。すなわち、これらレドックス蛋白質の細胞内での動態を明らかにするためには、そのチオール基の数を定量してチオール基の酸化還元状態を調べることが必要である。そのために、以前は、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用いた比色定量法<sup>15)</sup> や、monobromobimane (mBBR) を用いた蛍光の変化量の測定<sup>16, 17)</sup> がよく用いられていた。しかし、これらの方法は、いわば系の中の平均値を求めると、定量した値が必ずしも整数では得られず、分子中のシステインの状態を正確に記述することが難しかった。

### 4. 新規マレイミド試薬開発の必要性

1997 年に、小林と伊藤らは、大腸菌ペリプラズムの蛋白質の酸化還元を制御しているレドックス蛋白質 DsbA の研究において、チオール修飾試薬で還元型蛋白質を修飾すると、標識されていない蛋白質と異なる電気泳動移動度を示すことを報告した<sup>18)</sup>。この研究に用いられたチオール修飾試薬は、4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonate というもので、通常 AMS と呼ばれる。AMS の分子量はおよそ 500 なので、ジスルフィド結合が還元された蛋白質は、AMS 修飾によって分子量が約 1000 増加する。従って、SDS ゲル電気泳動によって、AMS 修飾した蛋白質と修飾しなかった蛋白質を比較すると、移動度に差が現れる。チオール基が酸化されてジスルフィド結合を形成している場合には、AMS では修飾されないで、両者のこの差を利用して、酸化状態の蛋白質と還元状態の蛋白質を電気泳動上で簡単に見分けることができるわけだ (図 3)。

この方法の利点は、測定したい系の中にある蛋白質の一部分だけが還元状態であっても、これを電気泳動ゲル上ではバンドとして検出できる点で、前章で紹介した DTNB による定量法に比べるとずっと感度がよい。チオールの定量法の場合には、平均値でしか得られないので、例えば系の中にある蛋白質の 10% が酸化状態にある場合には、得られる定量結果の値が若干小さくなるだけで、それが実験誤差によるものなのか、蛋白質の不均一な酸化の結果なのか見分けることが難しい。AMS 修飾の場合には、10% の蛋白質だけを異なるバンドとして得ることが可能である。

しかし、AMS 修飾法にも欠点がある。最大の問題は、修飾によ

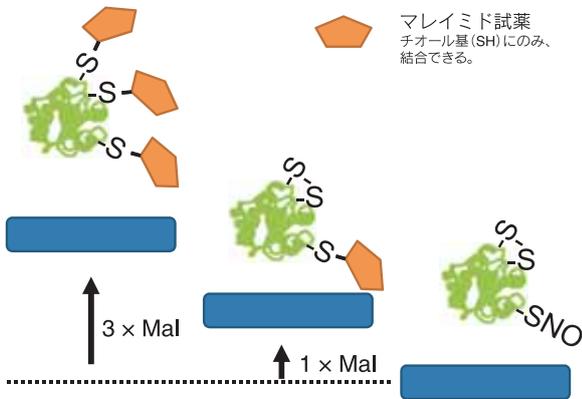


図3 チオール基の修飾による電気泳動の移動度変化

る分子量変化がひとつのシステインあたりわずか 500 なので、分子量の大きな蛋白質の場合には、電気泳動によって十分な移動度の変化が見られないことがある点である。この問題を解決する手段として、分子量の大きなポリエチレングリコールにマレイミド基を導入した通称 PEG マレイミドが用いられている。特に、分子量 5000 程度のポリエチレングリコールがよく用いられるので、分子量 10 万近い大きな蛋白質でも標識によって電気泳動上の移動度の変化を可視化することが可能である<sup>19)</sup>。ところが、PEG マレイミドにも欠点がある。それは、標識した分子の与える電気泳動のバンドがきれいに収束せず広がりを持ってしまうこと、および、標識による移動量が必ずしも PEG の付加によって与えられる分子量に一致しないことである。前者の問題の原因は、おそらく PEG の分子構成によるところが大きい。PEG は工業的に高分子合成（いわゆるリビング重合）によって作られるため、得られる PEG 分子は一定の分子量の前後に幅をもった異なる分子量の集団である。このため、分子量の異なる PEG が蛋白質に付加されることになり、得られる蛋白質 + PEG の分子量もある程度の幅を持つことになるわけだ。

一方、標識された分子の移動度が PEG で加算された分子量に合致しない、という問題は得られる標識蛋白質の性質の問題といえる。AMS の場合には、修飾によって変化する分子量が小さく、また、修飾に用いられた AMS 分子の影響も無視できる範囲であった。ところが、PEG の場合には、分子量の変化量が、時には 1 万、場合によっては数万にもなる。現在、一般に行われている SDS ゲル電気泳動法の場合、2 アミノ酸あたり 1 分子のドデシル硫酸が結合するために、直鎖状に延びたポリペプチド鎖の単位長さあたりの負電荷が同じになり、分子の電気泳動度は分子の大きさによって規定されている。ところが、PEG 分子が結合した場合には、PEG 部分にはドデシル硫酸が結合できないため、電気泳動のルールがそのままでは適用できないわけだ。その結果、電気泳動のバンドの移動度から、単純に PEG マレイミドで修飾されたチオール基の数を見積もることができない。

## 5. DNA マレイミドとその応用

生体内の蛋白質の酸化還元状態の重要性を考えると、特に、チオール基（システイン残基）のレドックスを簡便に知ることができれば、さまざまな情報が得られるに違いない。ところが、前章で述べたように、チオール修飾試薬には、さまざまな問題点があった。そこで、数年前から私たちの研究室では、AMS や PEG

マレイミドなどの従来のチオール試薬に代わる有用なチオール試薬を開発することを目指して研究を行ってきた。

さまざまな高分子の適用を考えたが、どれも標識化合物として使用できる量の問題、その化学的性質の問題などで、なかなか決定打が見つからなかった。そんなときに、卒業生の野島達也氏が最近行っている研究の話をしてくれて、蛋白質を自由自在に配列させるためのアンカーとして、蛋白質に DNA を結合させたところ、電気泳動で分子の移動度がきれいに变化したという話を教えてくれた。今から 3 年ほど前のことである。これは我々の目的にも使えるぞ、ということで、早速、DNA の末端にチオール修飾試薬であるマレイミドを結合させた新規修飾試薬を設計した。

チオール修飾で標識したタンパク質に十分な移動度変化を与えることと、DNA を用いた修飾化合物をエタノール沈殿で精製が可能であることを前提条件として分子サイズを検討し、修飾化合物に用いる一本鎖 DNA の鎖長を 24 塩基に決定した。DNA の塩基配列は、特に分子内および分子間で相補鎖を形成しないことに留意してデザインした。また、一本鎖 DNA の 5' 末端にはアミノ基を導入しておき、このアミノ基をマレイミド導入の足掛かりにした。そして、アミノ基に特異的に結合する NHS とマレイミドを分子の両端に持つ分子架橋化合物と DNA を反応させた後、陰イオン交換クロマトグラフィーとエタノール沈殿によって目的とするマレイミドを導入した DNA 分子を得ることに成功した。筆者らは、この標識化合物を DNA マレイミドと命名した。次に、合成した DNA マレイミドで、実際にさまざまな蛋白質を修飾してみた。その結果、修飾された蛋白質は、予想通り、SDS ゲル電気泳動をした際に AMS よりも大きな移動度の変化を与え、また、PEG マレイミドよりも収束した蛋白質バンドを確認することができた。DNA マレイミドで修飾された蛋白質に DNase を作用させると、電気泳動上の蛋白質の分子量は、未修飾のものにほぼ近い所まで減少したので、蛋白質に結合した DNA は本来の構造を保っているものと予想される。さらに、得られた移動度変化は、チオール基 1 つあたり、すなわち蛋白質に結合した DNA 鎖一本あたり約 9300 相当でほぼ一定の値になった。このことから、修飾後のタンパク質の移動度変化、すなわち、見かけの分子量を、SDS ゲル電気泳動によって測定することで、対象とする修飾以前の蛋白質上でいくつのチオール基が還元型であったのか数えることが可能になる。これまで、3 節に記載した以外の方法で蛋白質上の酸化

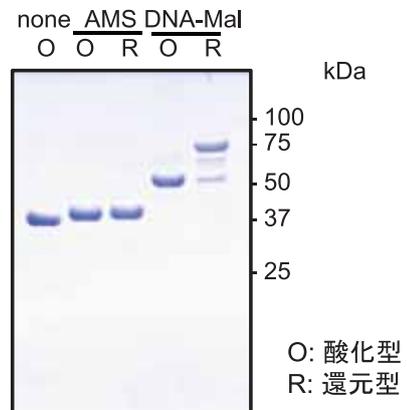


図4 AMS 修飾と DNA 修飾の違い  
分子量 36.6 kDa, 4 Cys, 10% BisTris/MES-PAGE  
酸化型は 2 Cys、還元型は 4Cys

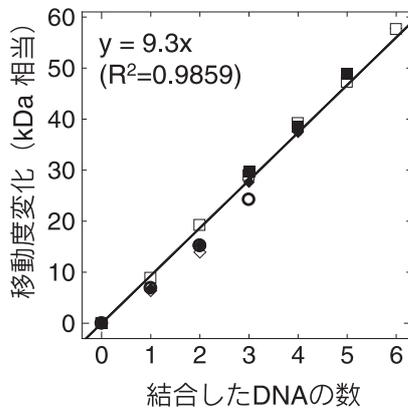


図5 各種蛋白質の異なる数のシステインをDNA 標識した際の移動度変化  
 ○: 12.7 kDa, 3 Cys, 12% NuPAGE  
 ■: 77.7 kDa, 5 Cys, 8% BisTris/MOPS-PAGE  
 □: 35.5 kDa, 6 Cys, 10% BisTris/MES-PAGE  
 ◆: 36.6 kDa, 4 Cys, 10% BisTris/MES-PAGE  
 ◇: 16.5 kDa, 2 Cys, 12% BisTris/MES-PAGE  
 (分子質量、システインの数、電気泳動条件)

還元に関わるチオール基の数を数えるためには、あらかじめシステイン残基の数を変えた変異体を組み換え体蛋白質として作成しマーカーとして用いる方法や、質量分析による解析を行うなどの必要があった。しかし、今回、私たちが開発したDNA マレイミドを用いれば、修飾による移動度変化が目的蛋白質の分子量に関係なく蛋白質に結合したDNA の数によって一定の値を与えるので、簡便に蛋白質上のフリーのチオール基の数を決定することができる<sup>20)</sup> (図4) (図5)。

一方で、DNA マレイミドにも大きな欠点がある。それは、PEG マレイミドでも共通に見られる問題であるが、DNA や PEG など比較的大きな分子を蛋白質に結合させるため、修飾された蛋白質をウェスタンブロットティング法に供すると、ゲルからPVDF 膜への転写効率が著しく低下してしまうという点である。ウェスタンブロットティング法では、一般に、分子量の小さな蛋白質よりも大きな蛋白質の方が膜への転写効率が悪いことは知られているが、DNA や PEG を数多く蛋白質に付加することで、ゲルからの移動が物理的に困難になるのかも知れない。しかし、修飾前と修飾後の蛋白質の転写効率が異なると、電気泳動で酸化型と還元型を定量的に分離できるというマレイミド試薬のメリットを活かすことができない (図6)。

この問題に対応するために、私たちは、DNA マレイミドにさらに改良を加えて修飾によって電気泳動時の移動度を変化させる性質を保ったまま、転写効率の落ちない新型DNA マレイミドを開発した。ウェスタンブロットティング法における転写効率の低下の原因は、明らかにDNA という大きな分子が蛋白質に結合していることそのものによって起こると考えられた。そこで、修飾によって蛋白質に結合させたDNA 分子を、SDS ゲル電気泳動後にゲル中で切り離すことにした。蛋白質から外してしまえば、その後の転写効率の低下は起こらないと考えたわけである。このような用時対応型の機能を付加するために、DNA 部分とマレイミド基の間に紫外線照射によって切断される官能基を導入することにした。私たちは、この新しい機能を付加したDNA マレイミドを、光

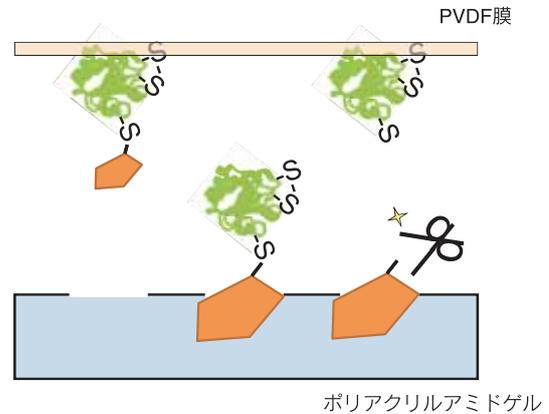


図6 光開裂型DNA マレイミドの概念図

開裂型(PhotoCleavable)という意味で、DNA-PC マレイミドと命名した。DNA-PC マレイミドは、基本設計はDNA マレイミドと同じで、蛋白質修飾と通常のSDSゲル電気泳動では、DNA マレイミドと同条件で用いることができる。また、通常の室内光の条件下で使用する限りは、実験中にDNA 部分が切り取られることはない。しかし、電気泳動のゲル中であっても、通常のUV トランスイルミネーターで照射を行うと、ゲル中で容易にDNA 部分が被修飾蛋白質から切り離されることを確認した。また、実際にDNA-PC マレイミドで修飾した蛋白質を試料としてウェスタンブロットティングを行って見たところ、予想通りに紫外線照射に依存して、得られるシグナルの強度が回復していた。移動度はDNA マレイミドで標識したものと変わらないので、チオール基の数を数えることも可能である。こうして、巨大分子を蛋白質のフリーのチオール基に特異的に結合させて電気泳動によって結合数を識別する方法は、ウェスタンブロットティング法と併用できるようになった。このことによって、例えば、目的蛋白質を識別可能な抗体を持っていれば、細胞内の特定の蛋白質の酸化還元状態や、それが持つチオール基のうち何個が翻訳後修飾を受けているかを簡単にモニターすることが可能になった。今後、DNA マレイミドによる修飾法をペプチドマッピング法や高感度の質量分析装置と併用することによって、蛋白質分子内チオールの状態の可視化が、ますます簡便になるものと予想される。

## 6. 終わりに

私たちが今回開発したDNA マレイミド、および、DNA-PC マレイミドは、蛋白質上のフリーのチオール基修飾試薬として、特に巨大分子のチオール基のレドックス状態や、過酸化、グルタチオン修飾などの翻訳後修飾の状態観察に有効なツールといえる。しかも、SDS ゲル電気泳動だけで、レドックス状態だけでなくその割合も算出することができる優れたツールである。

DNA を結合したマレイミド試薬は、蛋白質に結合した後もDNA としての機能を損なっていないと予想される。このため、用いるDNA の塩基配列を工夫することで、DNA のハイブリダイゼーションを利用した新たなアプリケーションに展開できる可能性がある。さらに、紫外線によって光開裂する機能を利用すれば、その応用の幅はさらに広がるであろう。

## [参考文献]

- 1) T. C. Laurent, E. C. Moore and P. Reichard, *J. Biol. Chem.*, **1964**, 239, 3436-3444.
- 2) S. K. Katti, D. M. LeMaster and H. Eklund, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 212, 167-184.
- 3) R. A. Wolosiuk and B. B. Buchanan, *Nature*, **1977**, 266, 565-567.
- 4) B. B. Buchanan and Y. Balmer, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2005**, 56, 187-220.
- 5) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita Jr., *Nature*, **1997**, 386, 299-302.
- 6) M. Yoshida, E. Muneyuki and T. Hisabori, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2001**, 2, 669-677.
- 7) J. Miki, M. Maeda, Y. Mukohata and M. Futai, *FEBS Lett.*, **1988**, 232, 221-226.
- 8) Y. Kim, H. Konno, Y. Sugano and T. Hisabori, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 9071-9078.
- 9) I. Wenderoth, R. Scheibe and A. von Schaewen, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 26985-26990.
- 10) T. Hisabori, S. Hara, T. Fujii, D. Yamazaki, N. Hosoya-Matsuda and K. Motohashi, *J. Exp. Bot.*, **2005**, 56, 1463-1468.
- 11) K. Motohashi, A. Kondoh, M. T. Stumpp and T. Hisabori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 11224-11229.
- 12) F. Montrichard, F. Alkhalifiou, H. Yano, W. H. Vensel, W. J. Hurkman and B. B. Buchanan, *J. Proteomics*, **2009**, 72, 452-474.
- 13) K. Kim, I. H. Kim, K. Y. Lee, S. G. Rhee and E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 4704-4711.
- 14) K. J. Dietz, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **2003**, 54, 93-107.
- 15) E. Beutler, O. Duron and B. M. Kelly, *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **1963**, 61, 882-888.
- 16) R. C. Fahey, G. L. Newton, R. Dorian and E. M. Kosower, *Anal. Biochem.*, **1981**, 111, 357-365.
- 17) P. C. Chinn, V. Pigiet and R. C. Fahey, *Anal. Biochem.*, **1986**, 159, 143-149.
- 18) T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi and K. Ito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 11857-11862.
- 19) T. Nagano, K. Kojima, T. Hisabori, H. Hayashi, E. H. Morita, T. Kanamori, T. Miyagi, T. Ueda and Y. Nishiyama, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 28697-28704.
- 20) S. Hara, T. Nojima, K. Seio, M. Yoshida and T. Hisabori, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1830, 3077-3081.

## [著者プロフィール]

氏名：原 怜 (Satoshi Hara)  
 所属・職位：東京工業大学資源化学研究所附属資源循環研究施設 特任助教  
 連絡先：〒 226-8503 横浜市緑区長津田 4259  
 TEL: 045-924-5267 FAX: 045-924-5268  
 E-mail: hara.s.ab@m.titech.ac.jp  
 出身大学：東京工業大学  
 学位：理学博士  
 専門分野：生化学、分子生物学、蛋白質科学

氏名：久堀 徹 (Toru Hisabori)  
 所属・職位：東京工業大学資源化学研究所附属資源循環研究施設 教授  
 連絡先：〒 226-8503 横浜市緑区長津田 4259  
 TEL: 045-924-5234 FAX: 045-924-5268  
 E-mail: thisabor@res.titech.ac.jp  
 出身大学：早稲田大学  
 学位：理学博士  
 専門分野：植物生化学、生体エネルギー変換

## 開発中

## レドックス応答タンパク質解析関連試薬

## &lt;特長&gt;

- ・バンドがシャープ
- ・大きいバンドシフト (高分子量タンパク質に適用可)
- ・SH の数に応じたバンドシフト
- ・転写効率が変わらない

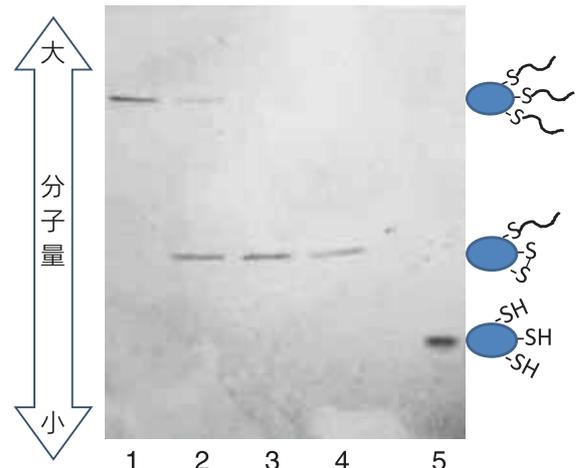


図 Thioredoxin (12 kDa: SH 基を 3 つ有する) の  $\text{H}_2\text{O}_2$  酸化による SH 基の数の変化

1. 未処理後、ラベル化
2. 0.1 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  で処理後、ラベル化
3. 1 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  で処理後、ラベル化
4. 10 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  で処理後、ラベル化
5. 未処理、ラベル化無

レドックス応答タンパク質の一つである Thioredoxin に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を処理することで、チオールがジスルフィドに酸化される。 $\text{H}_2\text{O}_2$  の濃度依存的にジスルフィド体の量が増加し、それに対応したバンドシフトが確認された。

## 連載

## 膜タンパク質機能解析のための 結晶構造解析戦略

吉川 信也  
兵庫県立大学大学院

### 1. はじめに

膜タンパク質の機能解析は、次世代生命科学の中心になると考えられるピコバイオロジーの推進に不可欠である。本連載では、この知名度の低い「ピコバイオロジー」の概念と現状をまず紹介し、そのもっとも重要な課題である膜タンパク質の機能解析のため、結晶構造解析がいかに重要であるかを、事例研究も紹介しながら考察する。次に膜タンパク質結晶化及び結晶構造解析戦略の現状について概説し、今後の展望を考察する。

### 2. ピコバイオロジー

「生命現象はタンパク質の駆動する化学反応である。」と言える。(ここでの「化学」は物理学と化学の境界が消滅している現状を考慮したものである。例えば、光合成に於ける太陽光の受容も「化学反応」に含めている。)したがって、生命現象の解明とはタンパク質の機能を化学反応としてとらえる(化学の言語で記述すること)であると言える。そのためには図1のようにタンパク質の機能中心を構成する各原子の位置を結晶構造解析により、化学反応性を原子間に形成されている化学結合の振動分光法(赤外、ラマン分光)解析により決定する必要がある。このようにしてどのような化学反応性を持つ原子が機能中心空間にどのように配置されているかを決定する。さらに、タンパク質は機能中心の構造を変化させることによって化学反応を駆動する。したがって、上述の機能中心の位置と化学反応性の時間変化を追跡することがタ

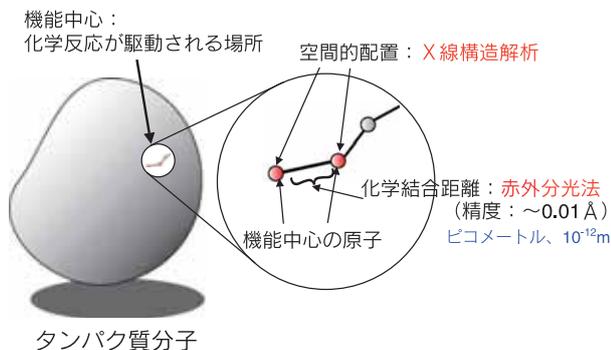


図1 タンパク質の機能中心の構造決定法

ンパク質の機能を化学反応としてとらえる(化学の言葉で記述する)ために必要である。振動分光学的解析により得られた化学結合の振動数にもとづいて、化学結合距離は $10^{-12}\text{m}$ (ピコメートル)より高精度で決定することができる。化学反応性はそのように微小な結合距離の違いに大きく影響される。そこでこのようにして、ピコメートルの精度での機能中心の構造の時間変化にもとづいてタンパク質の機能を解明することにより生命現象を化学の言葉で記述することがピコバイオロジーと命名されている。

原子の位置情報は現在最も精度の高いタンパク質X線結晶構造解析によっても $0.1\text{Å}$ ( $10^{-11}\text{m}$ )程度の精度しか得られない。しかし、結晶構造解析法により原理的には、タンパク質を構成する全ての規則的に配置された原子の3次元的位置を決定することができる。しかし、タンパク質のような巨大分子の各原子の位置を上述のような振動分光学的精度で決定することは現実的には不可能であり、各原子の化学反応性を結晶構造解析だけから求めることは非常に困難である。一方、振動分光学的方法の精度は化学反応性の解析に十分であるが、3次元的情報が原理的に含まれていない。したがって、タンパク質のように巨大で同種の多数の化学結合を含む巨大分子では、検出された振動数がタンパク質中のどの化学結合に由来するかを同定することはほとんど不可能である。このように、結晶構造解析法と振動分光法は相補的であり、ピコバイオロジーの両輪といえる。

機能中心に色素分子が含まれている場合は共鳴ラマン分光法により、特異的にその機能中心の振動分光情報が高精度で得られる。細胞の生存に不可欠な多くのタンパク質は金属イオンや可視吸収を持つ種々の化合物を機能中心に持っているため、共鳴ラマン分光法は反応機構の理解に大きく寄与してきた。しかし、機能中心には可視吸収を持たないアミノ酸残基が可視吸収を持つ化合物を保持し、その機能を発揮させるために重要な役割を持っており、共鳴ラマン分光法にも限界がある。このようなアミノ酸の機能解析には赤外分光法が不可欠である。

特定のアミノ酸の赤外分光情報は、原理的には無細胞遺伝子発現系を構築し、部位特異的同位体標識法により得られる。しかし、現在無細胞発現系構築は主に小型の水溶性タンパク質にしか適用されておらず、興味深い機能を持つ多数のサブユニットで構成された膜タンパク質に関する報告はない。少数の挑戦的な試みはなされているが<sup>1)</sup>、収量、再現性ともにまだ改良の余地は大きい。さらに、次に述べるように、赤外分光学的研究のタンパク質への適用に関する問題点もあるため、膜タンパク質の同位体標識技術の開発はあまり活発に行われていない。

タンパク質は水溶液中で生理機能を発揮する。それは膜タンパク質でも同様で膜貫通型膜タンパク質は水溶液中のリン脂質二重層に組み込まれて両端は水溶液中に、中央部は脂肪酸鎖の形成する疎水的環境に置かれることにより安定化されるよう設計されている。事実、膜タンパク質は有機溶媒中では極めて不安定で変性しやすい。しかし、水は強い赤外吸収を持つため水溶液に赤外分光法を適用することは不可能であることは常識である。したがって、部位特異的同位体標識法が大きく進歩しても、赤外分光学的機能解析は不可能である。一方、タンパク質内部ではタンパク質外の均一溶媒系では実現が極めて困難な微小環境が形成されており、これがタンパク質内部のアミノ酸残基の化学的性質に大きく影響すると予想される。実際、例えば、酢酸の $\text{pKa}$ 値は水溶液からメタノールに溶媒を交換するだけで5程度増加することが知られている<sup>2)</sup>。しかし、これまではX線構造解析によって位置が決定されたタンパク質内部のアミノ酸残基の化学的性質はその周辺

の微小環境をX線構造から見積もることにより推定されてきたが、赤外分光学的実測が不可欠であることは言うまでもない。

機能中心を構成するアミノ酸残基はタンパク質外で人為的に構成することが困難な環境に置かれている可能性が高い。したがって、このような環境で進行する化学反応を既存の化学の語彙だけで記述することは不可能である可能性がある。何故なら、既存の化学はタンパク質外の均一溶媒系での知見に基づいて構築されているからである。したがって、ピコバイオロジー研究の推進のためには化学の語彙を増やす必要がある。ここで生物学と化学とが融合する。この融合もピコバイオロジーの重要な目標の一つと考えられている。

### 3. ピコバイオロジーの推進

生命現象をタンパク質の機能を化学反応としてとらえることにより解明することを目指すピコバイオロジーは以下のようにして推進される。目的とする生命現象の巨視的な現象解析から出発し、その現象を駆動する多数のタンパク質を探索、同定する。次にそれを単離し、個々のタンパク質の機能を上述の2つの技術(結晶構造解析と振動分光学的解析)を利用して化学反応として解明する。このようにして機能を解明された個々のタンパク質がどのようにして、その生命現象を駆動するシステムを形成するかを解析することにより巨視的に解析された現象の機構を解明することができる。生命現象を化学反応として理解する(ピコバイオロジー)ためには上述の2つの技術だけでは不可能であり、このような研究全体が必要であることを強調したい。巨視的な現象解析からタンパク質の同定単離までを細胞生物学的研究、それ以後を構造生物学的研究と大別することができる。これら2つの研究はそれらの方法も考え方も大きく異なるため、通常は別々の研究グループで推進されている。その結果ピコバイオロジーの視点がしばしば欠落し、細胞生物学的研究においては多彩な現象に目を奪われてそれらがタンパク質によって駆動される化学反応であることが忘れられる結果、実験結果の学術的意義づけが不明瞭になり、応用への可能性しか議論されていないことが多くなる。一方、構造生物学的研究が生命現象の解明を目指すというピコバイオロジーを無視されると当該研究者の持っている高度な技術を適用するのに都合のよいタンパク質が研究対象として選択される結果、技術的には極めて高精度ではあるが、生命科学の進歩にはほとんど役立たない実験結果を出し、その分野内で褒め合い感心し合っているだけになりがちである。

しかしながら、特に最近数年で、放射光施設が世界的に見ても増加していることに加えてX線回折実験技術とX線結晶構造解析技術が著しく進歩し、一昔前にはX線結晶構造解析はエキスパートにしか手の届かないものであったが、現在では、素人でも専門家の適切な助言があれば参入できるようになってきている。これは、X線結晶構造解析分野の研究者がこの技術の生命科学の進展への貢献の可能性を深く認識し、非専門家でもこの技術を利用できるよう多大な努力を傾注してきた(現在もしている)結果であり、このX線結晶構造解析技術の開発に携わってきた研究者の科学に対する真摯な姿勢は特筆すべきことである。このような状況の変化の結果、細胞生物学を専門としてきた研究グループがX線結晶構造解析も並行して推進し、細胞生物学研究グループで実験結果を原子座標に基づいて考察するようなことが珍しくなくなってきた。

このように生命現象をタンパク質の駆動する化学反応としてとらえるというピコバイオロジー的研究は確実に盛んになってきて

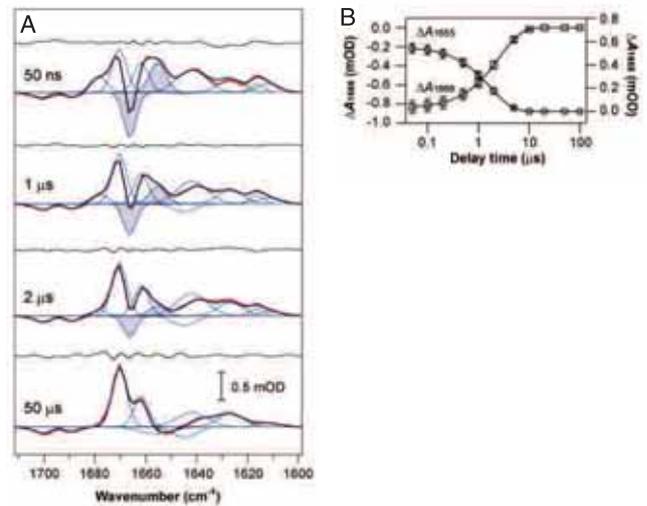


図2 時分割赤外分光解析<sup>5)</sup>

A: ウシ心筋チクロム酸化酵素の完全還元型CO結合型のCO光解離後のタンパク質部分の赤外呼吸スペクトル変化を照射前のスペクトルに対する差スペクトルとして表示されている。SVD解析の結果、最も顕著な変化(影を付けて示されている)は $1655\text{ cm}^{-1}$ と $1666\text{ cm}^{-1}$ にそれぞれ谷と山として記述される。この変化は主鎖のバルジ構造から $\alpha$ -ヘリックス構造への変換に伴うペプチド主鎖のC=O伸縮振動の波数変化に帰属できる。X線結晶構造からこの変化は、Ser382に帰属されている<sup>20,21)</sup>。

B:  $1655\text{ cm}^{-1}$ と $1666\text{ cm}^{-1}$ での吸光度の時間変化

いる。しかし、上述の通り赤外分光解析がタンパク質に適用できないことに加えて、第3世代の放射光による最も優れたX線構造解析法もタンパク質が駆動する反応過程に伴う変化を追跡するに十分な時間分解能を持たない。これまでもラウエ法等、時分割解析の試みはあったが、反応機構解析に十分な時間分解能と構造精度を持つ方法は開発されていなかった。時分割X線構造解析は生命科学研究者には見果てぬ夢であった。したがって、種々の方法で反応過程の中間体を可能な限り多数捕捉、固定し、そのX線構造から反応過程を推定する他なかった。第2の無視できない第3世代放射光設備によるX線構造解析の欠点は、強いX線照射によるタンパク質構造の損傷である。この損傷を防ぐため不凍剤に浸漬した結晶を100K以下の低温で凍結しなければならない。しかし、以下に述べるようにこのような条件で測定されたデータでも、酸化還元金属タンパク質のようにX線感受性の高い場合は、X線損傷を完全に除去することは非常に困難である<sup>3,4)</sup>。

したがって、ピコバイオロジー(タンパク質の機能中心を構成する原子の位置と化学反応性の当該タンパク質が駆動する化学反応過程の進行に伴う変化を追跡することによってタンパク質の機能を化学の言葉で記述する。)の実現は技術的にはほとんど不可能であった。実際、これまでに「ピコバイオロジー的」に解明されたタンパク質機能は皆無である。

しかしながら、最近、兵庫県立大と理研播磨研究所を中心とした、ピコバイオロジーの実現のための地道な息の長い努力が実を結び始め、ピコバイオロジーという夢が現実のものになりつつある。

## 4. ピコバイオロジー推進の技術的基盤の確立

### 4.1 赤外分光システム

水( $\text{H}_2\text{O}$ 、軽水)は特にタンパク質を構成するアミノ酸側鎖とペプチド結合(アミドバンド)によるシグナルのあらわれる波数

領域（指数領域と呼ばれる）に強い吸収を持つため、通常の市販の赤外分光装置（FTIR）でタンパク質部分の赤外スペクトルを検出することは不可能である。そこで水のこの強い吸収の影響を種々の方法で軽減する（例えば、大部分の水を除去した乾燥フィルム。高濃度のタンパク質溶液を短い光路長で測定。軽水を重水（D<sub>2</sub>O）に置換。）ことによって測定が試みられている。しかし、測定精度も汎用性も不十分である。この制約はつまるところ水が強い赤外吸収を持つためである。そこで、フェムト秒レーザーの白色性を利用した強い赤外光源を開発するとともに超高精度の赤外検知器を導入することにより、水の吸収の影響を大幅に軽減し、Amide-I 領域のペプチド C=O の 1 残基のバンド位置の変化でも、時分割（nsec レベル）測定が可能なシステムの開発に成功した。このシステムを利用してウシ心筋チトクロム酸化酵素の CO 光解離後の赤外スペクトル変化（半減期 1.5 μsec）の精密測定に成功した（図 2）<sup>5)</sup>。このスペクトル変化は Amide-I 領域で 1 残基のペプチド C=O のヘリックスからバルジへの遷移が高精度で捉えられることを示している。これらの結果はピコバイオロジーの実現に不可欠な技術の一つである赤外分光技術の確立を示すものである。X 線構造はヘリックスからバルジへの遷移は Ser382 残基でしか起こらないことを示していたため<sup>6)</sup> この赤外吸収変化を部位特異的標識なしに Ser382 残基に同定することができた。この例が示すように高分解能 X 線構造解析と比較することにより、同位体標識なしに、赤外シグナルの帰属が期待できる。原理的には目的タンパク質の結晶を用いて、赤外異方性を決定することによりシグナルの同定は可能である。大きな困難は予想されるが挑戦するに値する研究課題である。

#### 4.2 無損傷時分割 X 線構造解析

ピコバイオロジーのもう一つの基礎技術である時分割 X 線構造解析法は昨年度より稼働を開始した理研自由電子レーザー設備（XFEL、愛称 SACLA）によりまさに急転直下実現した。SACLA は第 3 世代の放射光施設より桁違いに強く、かつ短い（20×10<sup>-15</sup> sec）パルス光を発生することができる。そのため、照射されたタンパク質結晶は完全に破壊され、X 線回析を示さなくなるが、光が強いため破壊される前に X 線回析を明瞭に示す。したがって、フェムト秒（10<sup>-15</sup> sec）レベルの短時間での X 線回析実験が可能になる。さらに強い X 線の照射の結果、結晶の破壊が高速であるため、部

分的に X 線照射の影響を受けたような X 線回析はほとんど無視できる。そのため第 3 世代放射光施設を利用した X 線回析実験のような X 線損傷を無視することができる。しかし、SACLA による X 線回析実験では振動写真の測定が不可能であるため静止写真の測定結果だけから構造解析を行う必要がある。このためのデータ解析法の開発も完了している。その結果、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の休止酸化型の無損傷 X 線構造が 1.9 Å 分解能で決定された（図 3）<sup>4)</sup>。休止酸化型酵素の O<sub>2</sub> 還元中心（heme a<sub>3</sub> と Cu<sub>B</sub> と呼ばれる鉄イオンと銅イオンとで構成されており、heme a<sub>3</sub> の鉄イオン（Fe<sub>a3</sub>）に O<sub>2</sub> が結合し、水にまで還元される。）には過酸化化物イオン（O<sub>2</sub><sup>2-</sup>）が結合していることが酸化還元滴定により示唆されている<sup>7)</sup>。このことが SPring-8 の X 線構造解析により支持された<sup>3)</sup>。しかし、結合している O<sub>2</sub><sup>2-</sup> の O-O 結合距離は 1.7 Å と低分子過酸化化物化合物の X 線回析実験データと一致しない。この結合距離は SPring-8 の X 線による照射により O<sub>2</sub><sup>2-</sup> に対応する電子密度が減少することが認められたので、照射時間依存性を精密に測定し照射時間 0 に外挿した結果得られたものである。この結果はタンパク質中で活性化された状態での結合を示すとも説明は可能ではあるが、X 線照射の影響が 0 外挿によっても除去できていない可能性もある。図 3 に示された SACLA によるフェムト秒 X 線結晶構造解析実験結果は SPring-8 による構造解析では X 線による損傷効果を完全に除去することは不可能であることを示している<sup>4)</sup>。これにより無損傷時分割高分解能 X 線構造解析が SACLA を利用して実現可能であることが実証された。また、この成果のより重要な意義は 20×10<sup>-15</sup> sec の時間分解後の時分割 X 線結晶構造が可能であることを実証したことにある。

この結果、ピコバイオロジー実現のための最大の技術的問題点（水溶液中の赤外分光と時分割 X 線構造解析）はほぼ解決したといえる。今後の飛躍的な発展が期待できる。

## 5. 結晶構造解析の意義

上述の通り、次世代生命科学としてのピコバイオロジーの目標の一つは既存の化学の言葉だけでは記述できない現象を化学の語彙を拡張しつつ解明することである。この目標のためには高分解能で非経験的に X 線構造を決定することが不可欠である。中程度（3 Å 分解能前後）の分解能の X 線構造解析が可能な電子密度に対してはタンパク質外の水溶液中での最も安定なアミノ酸の立体構造があてはめられて構造が決定されている。言い換えると、タンパク質外でのアミノ酸の構造によって電子密度（実験結果）が説明されている。したがって、タンパク質内部でのタンパク質外では存在しない微小環境でタンパク質内でしか形成され得ない構造があっても、その異常が検出されるためには、それを感知できる電子密度の精度（分解能）が必要である。したがって、この異常性が検出できない程度の分解能の X 線構造解析結果からは水溶液中（タンパク質外）で常識的に予想できる反応機構しか検出できない可能性が高い。事実最近多数のタンパク質の中程度の X 線結晶構造が多数報告されているが、その結果に基づく反応機構はタンパク質中での反応機構の特色を十分説明できるものにはなっていないことがほとんどである。上述のような構造決定の手順を考慮すれば当然のことである。したがって中程度の X 線構造からは上述のようなタンパク質内でしか起こり得ない反応を駆動する構造を検出することは不可能である。そのため、構造解析の際、アミノ酸の立体構造を既知とする必要のないレベルの高分解能の電子密度が、タンパク質内部でしか起こらない化学反応の構造解明には必要である。つまり、アミノ酸残基の立体構造がタンパク質

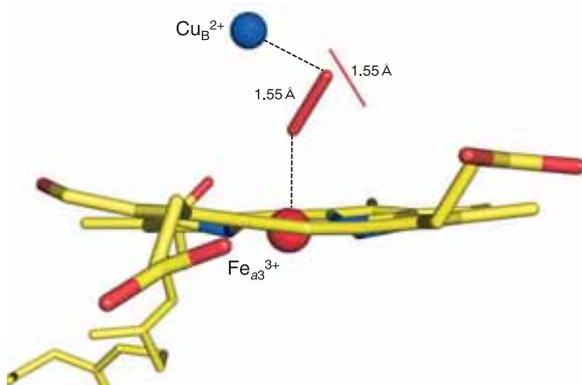


図 3 SACLA を利用したウシ心筋チトクロム酸化酵素の無損傷 X 線構造解析<sup>4)</sup>  
O<sub>2</sub> 還元中心の 1.9 Å 分解能の X 線構造。架橋配位子を赤色棒で示す。細い棒は占有率 5% の配位子を示す。両者ともに結合距離は 1.55 Å である。  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: K. Hirata, et al., *Nat. Methods*, 2014, 11, 734-736, copyright (2014).

外の水溶液のそれらと同一であると仮定して決定されたX線構造はタンパク質外のアミノ酸の構造の線型結合に過ぎないため、その構造からはタンパク質内部の構造特異性を検出することは原理的に不可能である。したがってこの分解能のX線構造解析結果だけではタンパク質機能(アミノ酸の寄せ集めでは実現することのできない機能)を解明するための手がかりを得ることもできない。このためには電子密度の分解能の向上が不可欠である。第3世代の放射光施設XFELでのX線回折実験や得られたX線回折データ処理解析技術のハードウェア、ソフトウェア両面からの進歩はまさに日進月歩である。また、タンパク質の発現、精製結晶化技術の進歩もまことに目ざましい。しかし、これらは中程度の分解能の結晶化を目指したものであり、上述のような高分解能解析を可能にするような結晶化条件の探索のためには上述のようなルーチン作業以上に結晶化条件を個々のタンパク質に特化して探索、改良を試みる必要がある。そのため、タンパク質結晶化条件の探索がピコバイオロジー推進を律速していることが多い。

## 6. 膜タンパク質構造機能研究の意義

生命の基本単位である細胞の最も顕著な構造的特徴の一つは細胞膜をはじめとしたリン脂質二重層で形成されている膜構造であると言えよう。これらの膜構造は単なる仕切ではなく、多種多様の膜タンパク質が組み込まれて種々の機能が付与されている。それらの膜タンパク質は均一溶媒系での化学反応では実現が不可能に近い特異性と高効率を示す。これは、一般に巨大なタンパク質の内部は外部とは明確に環境が異なっているだけではなく、均一溶媒系では実現が不可能に近い種々の微小環境を機能中心のアミノ酸や補因子に付与しているためであると考えられている。また、水溶性の球状タンパク質でも構造に非対称性が付与されることにより相互作用する基質や他のタンパク質に対する機能性が高められている。さらに膜タンパク質の非対称性は膜に方向性(裏と表、Sidedness(側性)と呼ばれている。)を付与する。このSidednessは生体エネルギー変換や物質輸送や機能調節等の細胞が生命を維持するために不可欠な機能の実現を可能にしている。実際、巨視的に見た生命現象で、膜タンパク質が全く関与していないものはないと言える。このようなSidednessを活用した膜タンパク質の駆動する化学反応こそ既存の化学の言葉だけでは理解できない機構で駆動されていることが多いと推定できる。また、このような膜タンパク質の構造機能解明は生命現象の理解に本質的に貢献し得るといふ学術的重要性に加えて、Biomimeticな機能性物質の設計合成や創薬等への応用の可能性が期待できる。このような状況を反映して膜タンパク質の構造機能研究が年々盛んになってきている。

近年の生命科学研究では創薬をはじめとする応用の可能性が注目されることが多い。膜タンパク質も上述のような学術的興味よりは応用の可能性に注目されており、米国では膜タンパク質でなければタンパク質構造機能研究の予算獲得が非常に困難であるとのことである。勿論応用研究の重要性は基礎研究のそれに変わらない。「研究が科学的にいかにくれているかとその研究がどれ程応用研究から遠いかとは全く無関係である。」は至言であると言えよう。以前は実生活と無関係な研究こそが真の学問であると思っていたとしか考えられないような基礎生物学分野の研究者が珍しくなかった。このような研究者は象牙の塔として厳しく批判されるとともに、「生物学」が巨大な予算を必要とする「生命科学」に変貌した結果、巨大な研究グループの応用研究が我国でも年々目立つようになってきている。そのため、このような研究者は激

減している。しかし、上述の「いかに優れた科学であるか？」との問いかけが憚られるようになれば、生命科学の根本が腐ることが危惧される。

幸いにも膜タンパク質研究の基礎応用の両面に対する重要性は広く認識されており、今後の生命科学の中心となると期待できる。上述の通り、膜タンパク質構造機能研究の進展は水溶性タンパク質と同様にX線結晶構造の分解能により律速される。この分解能を決定する最大の要因は結晶の品質である。この品質は目的の膜タンパク質を生体膜から単離し(可溶化)水溶液中に安定化するために必要な界面活性剤の構造に最も強く依存する。したがって、生命科学の発展は優れた界面活性剤の開発によって駆動されると極言することもできよう。

膜タンパク質のピコバイオロジーも勿論目的とする膜タンパク質のX線結晶構造の分解能に律速されて進歩してきた。膜タンパク質結晶化のための界面活性剤のスクリーニングキットも開発され、上述の中程度の分解能の構造決定研究への取り組みを開始する精神的バリアーは以前に比べて確実に低くなっている。しかし、膜タンパク質についても、反応機構のピコバイオロジー的理解のためには、分解能向上のため、目的とするタンパク質に特化した条件の確立が必要である。このような視点に基づく結晶化と界面活性剤の取り扱いに関する議論は本連載次号以降に譲る。

## 7. チトクロム酸化酵素の反応機構研究の歴史

タンパク質の反応機構研究はそのX線構造の分解能の向上に律速される。ここではこのようなピコバイオロジー研究の事例研究として、ウシ心筋チトクロム酸化酵素の反応機構研究の歴史を「X線構造の分解能の向上がどのようにその進歩に貢献してきたか。」との視点から紹介する。

### 7.1 X線構造決定以前の構造機能解析

1995年にウシ心筋チトクロム酸化酵素のX線構造が2.8Å分解能で細菌酵素とほぼ同時に報告された<sup>8,9)</sup>。この成功をきっかけとして、多数の膜タンパク質のX線構造解析の本格的な取り組み

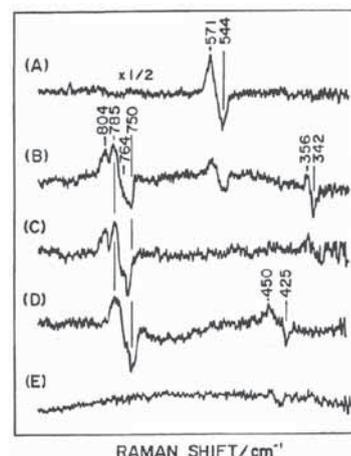


図4 ウシ心筋チトクロム酸化酵素によるO<sub>2</sub>還元過程の時分割共鳴ラマン分光学的解析<sup>13)</sup>  
Fe-O伸縮振動のラマンスペクトルは微小であるため、<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O同位体効果によりバンドが検出された。反応開始0.1(A)、0.27(B)、0.54(C)、5.4(E) m sec後の共鳴ラマンスペクトルへの同位体効果(<sup>18</sup>O<sub>2</sub>/<sup>16</sup>O<sub>2</sub>)差スペクトルとして表示。励起波長423 nm、測定温度3.0°C。  
Reprinted with permission from T. Ogura, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5443-5449. Copyright (1996) American Chemical Society.

が開始されたが、それまではウシ心筋チトクロム酸化酵素のように巨大な膜タンパク質の結晶化は不可能ではないかとの予想が大勢を占めていた。そのため、特に1995年以前には、結晶化を必要としない多様な構造解析の努力が精力的に推進された。

ウシ心筋チトクロム酸化酵素に含まれるサブユニット数が SDS-PAGE 分析のみによって13であると主張されていた<sup>10)</sup>。しかし、最小のサブユニットの分子量は8000程度であるし、特徴的な補因子も含まれていないため、精製標品に再現性よく含まれていても、固有の成分であることを示す積極的な証拠は得られていなかった。酸化還元活性を持つ補因子として6配位低スピン型の heme a と5配位高スピン型の heme a<sub>3</sub> がそれぞれ heme a<sub>3</sub> への電子供与体と O<sub>2</sub> 結合部位として機能していることが可視分光及びラマン分光学的に証明されていた<sup>11)</sup>。また heme a<sub>3</sub> の近傍には銅中心の1つである Cu<sub>B</sub> が配置されていることが EPR 測定による高スピン Fe<sup>3+</sup> と Cu<sub>B</sub><sup>2+</sup> と間の磁気共役を示す結果から強く示唆されていた。第2の銅中心である Cu<sub>A</sub> が複核の Cupredoxin 型構造であることが EPR 測定から主張されていた<sup>12)</sup>。一方細菌チトクロム酸化酵素の部位特異的変異解析に基づいて、水形成のためとポンプされるプロトンとの輸送経路についても議論されていた<sup>11)</sup>。

X線結晶構造が決定されるまでの、本酵素の機能解析の最も重要な成果は共鳴ラマン分光法による O<sub>2</sub> 還元機構解析であろう。上述の通り、発色団を持つ補因子のラマンスペクトルは発色団を可視レーザー光により励起することにより、ラマン散乱強度を大きく高めることができるためタンパク質部分に全く影響されることなく高精度の測定が可能である。(但し、この方法では可視吸収を持たない補因子(例えば Cu<sub>B</sub>)のラマン測定は不可能である。)これにより O<sub>2</sub> 還元反応中間体として Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>2+</sup>-O<sub>2</sub> (A)、Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>3+</sup>-O<sub>2</sub> (P)、Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>4+</sup>-O<sub>2</sub> (F)、Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>3+</sup>-OH (O) の4種が検出された(図4)<sup>13)</sup>。しかし、上述の通り共鳴ラマン分光法は Cu<sub>B</sub> の構造に関する情報を全く与えないため、heme a<sub>3</sub> の構造変化しか検出されていない。しかし、これにより O<sub>2</sub> 還元過程に関する重要な知見が得られた。まず A 中間体から P 中間体への変換の際、O-O 結合が切断されていることが証明された。また、Cu<sub>B</sub> が第2の酸化還元中心として

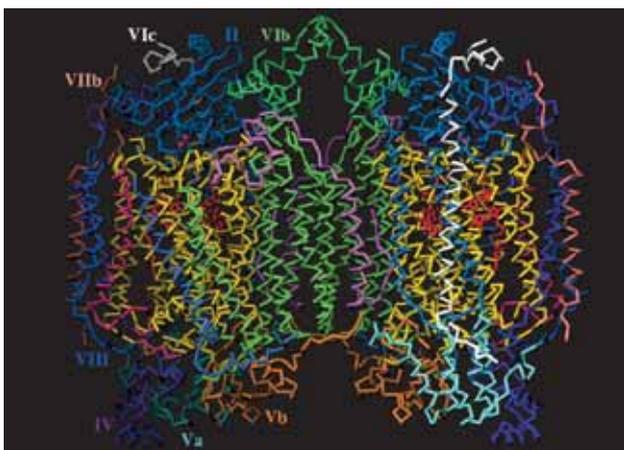


図5 ウシ心筋チトクロム酸化酵素のサブユニット会合<sup>18)</sup>  
2.8Å分解能で決定されたX線構造の主鎖が表示されている。各サブユニットの名称は同色の文字で表示されている。二量体が形成されている。Heme a と heme a<sub>3</sub> が赤色の構造で示されている。Cu<sub>A</sub> は2個の赤球で示されている。  
From T. Tsukihara, et al., *Science*, **1996**, 272, 1136-1144. Reprinted with permission from AAAS.

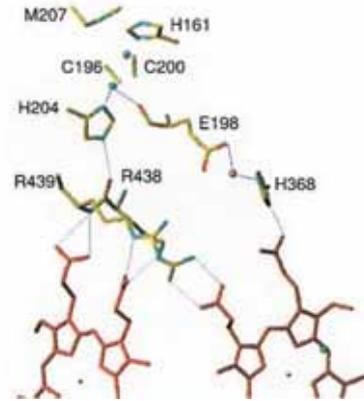


図6 Cu<sub>A</sub>、heme a、heme a<sub>3</sub> 間の水素結合のネットワーク<sup>18)</sup>  
Cu<sub>A</sub>部位の2個の銅イオンは青球で示す。赤球はヘム鉄イオン。青球で示した Cu<sub>B</sub> (右下コーナー近くに存在) は heme a<sub>3</sub> の鉄イオンの青球に近接している。もう一方の赤球は heme a の鉄イオンを示す。E198 と H368 の間の黄土色球は Mg<sup>2+</sup> イオンである。  
From T. Tsukihara, et al., *Science*, **1996**, 272, 1136-1144. Reprinted with permission from AAAS.

Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に近接して配置されているにもかかわらず、Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>2+</sup>-O<sub>2</sub> が検出されたことは全く予想外であった。O<sub>2</sub> は、1電子還元は受けやすいが2電子還元は受けにくいという固有の化学的性質を考慮すると Cu<sub>B</sub> の構造が決定されていなかったため、なぜ A 型が安定であるかは全く不明であった。また A → P 変換の時すでに O-O 結合が切断されているためには<sup>14)</sup> Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Cu<sub>B</sub> からの1電子当量に加えてさらに2電子当量が必要であるが、その由来についてはX線構造情報なしには想像すら不可能であった。また F 中間体、O 中間体の Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 部分の構造についても可視吸収からは得られない重要な情報が共鳴ラマン分光法により得られている。しかし、1990年初めて A 中間体の構造が決定されたが、何故これが検出できるほど安定であるかに関する研究にはX線構造の決定を待たなければならなかった<sup>15, 16, 17)</sup>。

## 7.2 完全酸化型 2.8Å分解能のX線構造決定の意義

1995年ウシ心筋と細菌チトクロム酸化酵素の立体構造が2.8Å分解能で決定された<sup>8)</sup>。ウシ心筋酵素の立体構造には SDS-PAGE から予想されていた通りの13のサブユニットが検出された(図5)<sup>18)</sup>。なお、このX線構造が決定されても生理機能が明らかなサブユニット以外は不純物である可能性は否定できない。しかし、不純物がX線構造中に検出されるほど特異的にかつ定量的に結合する可能性は非常に低いと言える。

Cu<sub>A</sub> の立体構造も EPR の結果を完全に支持するものであった<sup>8)</sup>。2つのヘムの配位構造も分光学的解析結果が示唆する通りであった(図6)<sup>8, 18)</sup>。また、Cu<sub>B</sub> の位置も磁気共役を十分予想させる。2.8Å分解能の構造はアミノ酸側鎖の配向もヘム A のプロピオン酸基、ヒドロキシフェニル基の立体構造も決定する<sup>8, 18)</sup>。勿論この分解能ではこれらの立体構造はタンパク質外で決定された常識的構造から組み立てられている。しかし、他の方法では決定がほぼ不可能であると考えられるような構造(例えばヘムのヒドロキシフェニルエチル側鎖の立体構造)が決定される。そのような構造の一つが、Cu<sub>A</sub>、heme a、heme a<sub>3</sub> とこれらを連結するアミノ酸側鎖の構造(図6)<sup>18)</sup>である。共有結合や水素結合はタンパク質内部の電子伝達経路として機能すると考えられている。生

学的機能解析の結果 Cu<sub>A</sub> から直接 heme a<sub>3</sub> へ電子が伝達されることは生理条件下（正常な代謝回転中）では全くないことが知られている。しかし、この構造は Cu<sub>A</sub> から R438 を経由した heme a<sub>3</sub> への直接の電子伝達は Cu<sub>A</sub> から heme a への電子伝達とほぼ同じ速度で起こることを示唆している。したがって、この X 線構造は heme a と heme a<sub>3</sub> との酸化還元電位を電子伝達に伴って鋭敏に調節することによって heme a<sub>3</sub> への直接の電子伝達を防御していることを強く示唆している。

### 7.3 2.3 Å 分解能の構造決定

1998 年に酸化型/還元型の構造がそれぞれ 2.3/2.35 Å 分解能で決定された<sup>19)</sup>。この分解能の向上により、まず O<sub>2</sub> 還元中心の還元型の構造で Cu<sub>B</sub><sup>1+</sup> が平面 3 配置構造であることが示された。これは Cu<sub>B</sub> が電子供与能力も配位子受容能力も非常に弱い、極めて安定な構造であることを示している。この結果は Cu<sub>B</sub> が Fea<sub>3</sub><sup>2+</sup> 結合した O<sub>2</sub> への第 2 の電子供与体として機能しないことを示している。この構造は A 中間体の安定性に寄与している。さらに Cu<sub>B</sub> に配位している H240 イミダゾール基に Y244 が C-N 共有結合を形成していることが明らかになった (図 7)<sup>19)</sup>。この翻訳後修飾は O<sub>2</sub> 還元に共役したプロトンポンプ酵素のすべてに保存されていることが明らかになった。この Y244OH 基が A → P 変換の際の O-O 結合開裂のための電子供与体の一つとして機能していることを強く示唆している。

この分解能向上によりさらにプロトンポンプ経路が明らかに

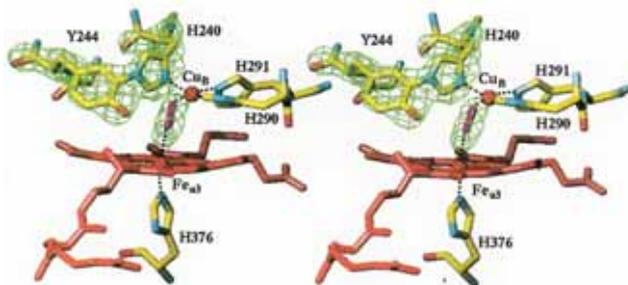


図 7 O<sub>2</sub> 還元中心（休止酸化型）の立体構造<sup>19)</sup>  
立体図表示。His240 のイミダゾール基と Try244 の OH 基との間に共有結合が形成されている。X 線回折実験にフォトンファクトリーが利用されたため Cu<sub>B</sub>-Fea<sub>3</sub> 間の過酸化物が明瞭に認められる。  
From S. Yoshikawa, et al., *Science*, **1998**, 280, 1723-1729. Reprinted with permission from AAAS.

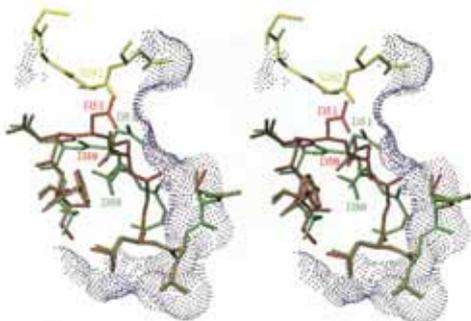


図 8 酸化還元に伴う D51 の立体構造変化<sup>19)</sup>  
赤：酸化型 2.3 Å 分解能。緑：還元型 2.35 Å 分解能。黄：サブユニット II の構造 (酸化還元共役構造変化が認められない) 酸化型の水分子の近接可能表面が点で示されている。D51 (緑構造) は還元型の時分子表面に露出している。  
From S. Yoshikawa, et al., *Science*, **1998**, 280, 1723-1729. Reprinted with permission from AAAS.

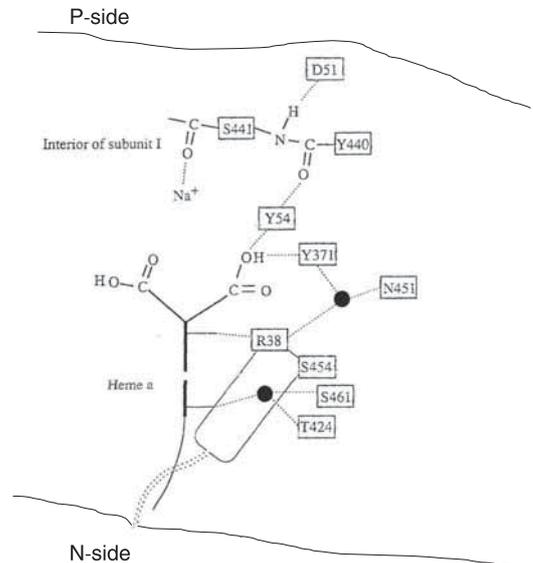


図 9 H-pathway (D51 へのミトコンドリア内膜内側からのプロトン輸送経路) の 2.3 Å 分解能の X 線構造に基づく構造の模式<sup>19)</sup>  
黒丸：結晶構造中に認められる固定された水分子。Heme a のホルミル基が R38 と水素結合を形成している。  
From S. Yoshikawa, et al., *Science*, **1998**, 280, 1723-1729. Reprinted with permission from AAAS.

なった。図 8 に示されているように P-side (ミトコンドリア内膜外側。こちら側にプロトンが蓄積される。) の分子表面近くに位置する D51 が還元型で分子表面に露出することが認められた<sup>19)</sup>。またこの D51 が N-side (ミトコンドリア内膜内側) へ水素結合のネットワークと水経路で連結されていることが示された。また、この経路は heme a の周辺に配置されていることが示された。これらの X 線構造はこの D51 を含む経路 (現在 H-pathway と呼ばれている) がプロトンポンプ経路であることを強く示唆している (図 9)<sup>19)</sup>。また酸化型 (休止酸化型) には O<sub>2</sub><sup>2-</sup> (過酸化物) が Cu<sub>B</sub> と Fea<sub>3</sub> との間に架橋していることが示された (図 7)<sup>19)</sup>。

なお、これまでの X 線回折実験はフォトンファクトリーで 8°C で行われた。

### 7.4 酸化型/還元型 (1.8/1.9 Å) 分解能の構造解析

フォトンファクトリーより強い X 線光源を持つ第 3 世代の放射光 (SPring-8) を利用することにより分解能をさらに向上させることに成功した (2004)<sup>20)</sup>。この分解能の向上により図 10 に示されるように H-pathway の構造が格段に明瞭になった。図 10A に示されている D51 の酸化還元共役立体構造変化には図 10B に示されるような水分子の構造変化が伴っている。さらにペプチド結合が水素結合のネットワークに組み込まれている<sup>20)</sup>。プロトンは、もし強力な供与体と受容体があればペプチド結合を経由して輸送されること、またその輸送にはペプチド結合の keto-form (-CO-NH-) の enol-form (-C(OH)=N-) に対する安定性のため方向性があることが知られている。したがって、このペプチド結合は P-side からのプロトン逆流を防ぐ機能を持つと考えられる。図 11A の模式が示すように H-pathway は上半分が水素結合のネットワーク、下半分が N-side の水が浸入することのできる経路 (水経路) から構成されている。水経路には少なくとも 1 個以上の水分子が存在することのできる空間 (キャビティー) があり、これが水の移動を促進している (図 11A)<sup>21)</sup>。図 11B (水素結合ネット

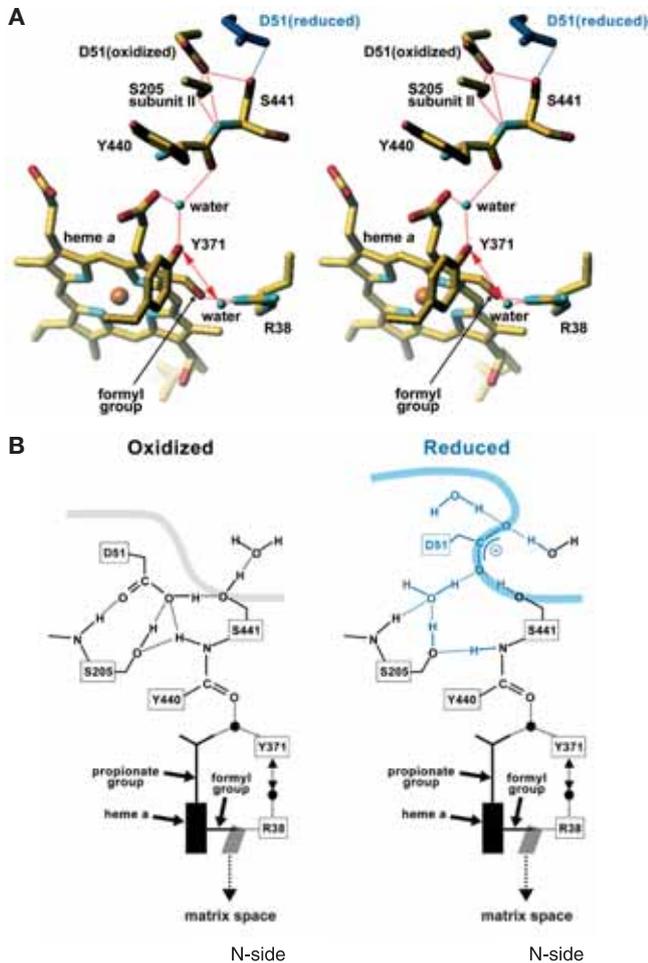


図10 酸化還元に伴うD51の立体構造変化(酸化型1.8Å分解能、還元型1.9Å分解能)<sup>20)</sup>  
 A: 立体図。B: D51周辺の構造変化。  
 T. Tsukihara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15304-15309.  
 Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.

ネットワークの側面図)に示されるように heme a が水素結合のネットワークに2つの水素結合を形成している。heme a から、O<sub>2</sub>還元中心への電子伝達の結果生じた正荷電がヘム周辺へ非局在化する。その影響がこの2つの水素結合を通じて、水素結合のネットワーク上にあるプロトンと静電的相互作用(静電的反発)を誘起し、プロトン能動輸送を駆動することをこのX線構造ははっきりと示している。

しかし、静電的反発に駆動されるのならば能動輸送の方向性を持つことは本来不可能である。このプロトンの逆流防止機構がX線構造の分解能の向上により明らかになった。図12(A: 水経路の酸化還元共役X線構造変化。B: 水経路構造変化の模式図)に示す通り、水経路の最大のキャビティーが、本酵素が酸化されることにより消失することがこの分解能で明らかになった<sup>21)</sup>。このキャビティーの消失により水の交換速度は大幅に低下し、生理的時間範囲ではキャビティーは閉鎖されると考えられる。したがって、この開閉によりプロトン逆流を防止していると考えられる。

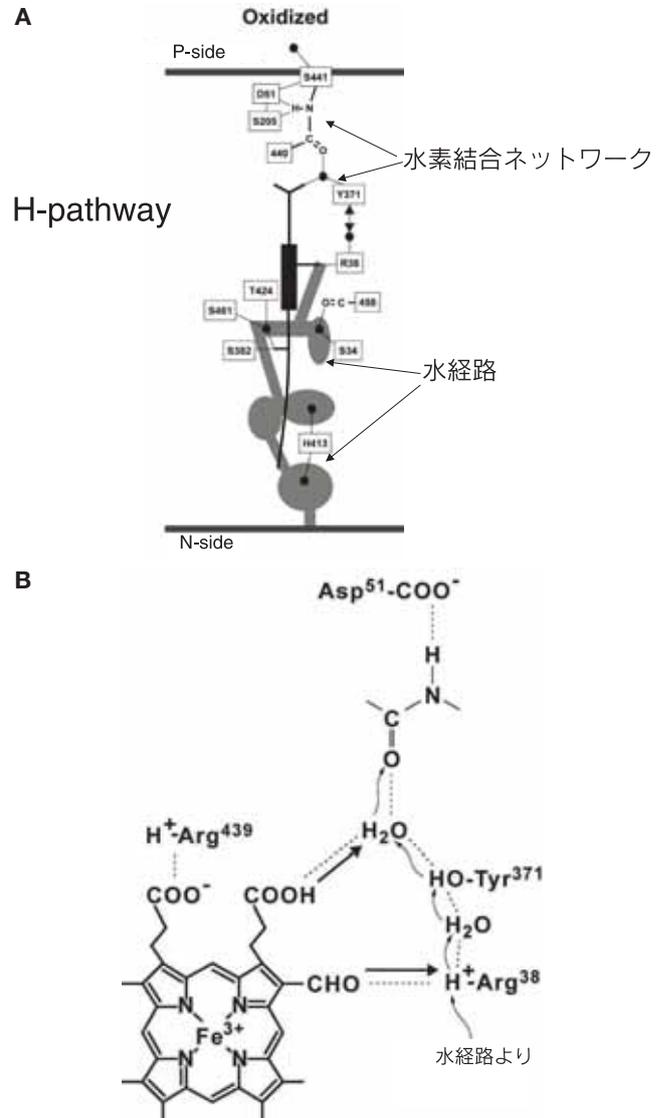


図11 H-pathway (D51へのミトコンドリア内膜内側からのプロトン輸送経路)の酸化型1.8Å分解能のX線構造に基づく構造の模式  
 A: 全体構造の概略。長方形でheme aの側面を表示。上半分は水素結合ネットワーク、下半分は水経路から構成されている。灰色で示された領域にミトコンドリア内膜内部(N-side)の水が到達できる。円と楕円は水分子が保管され得るに十分な大きさの空間を示す。B: heme a平面的垂直方向からの水素結合ネットワークの構造模式。

## 7.5 呼吸阻害剤結合型酵素のX線構造解析

上述の通り共鳴ラマン分光学的解析により、O<sub>2</sub>還元反応の第1中間体(A中間体)はO<sub>2</sub>結合型であるが、第2中間体(P中間体)ではO-O結合が開裂していることが明らかになっている。したがって、正常なO<sub>2</sub>還元反応過程ではO<sub>2</sub>が水にまで還元される(O-O結合が開裂する)までの間の過程に生じる中間体は生成よりも消失の方が速いため検出は不可能である。そこで、種々の呼吸阻害剤(O<sub>2</sub>の基質類似体)結合型酵素のX線構造解析により、O<sub>2</sub>還元中心の機能を探索することによりO<sub>2</sub>還元機構の理解を深

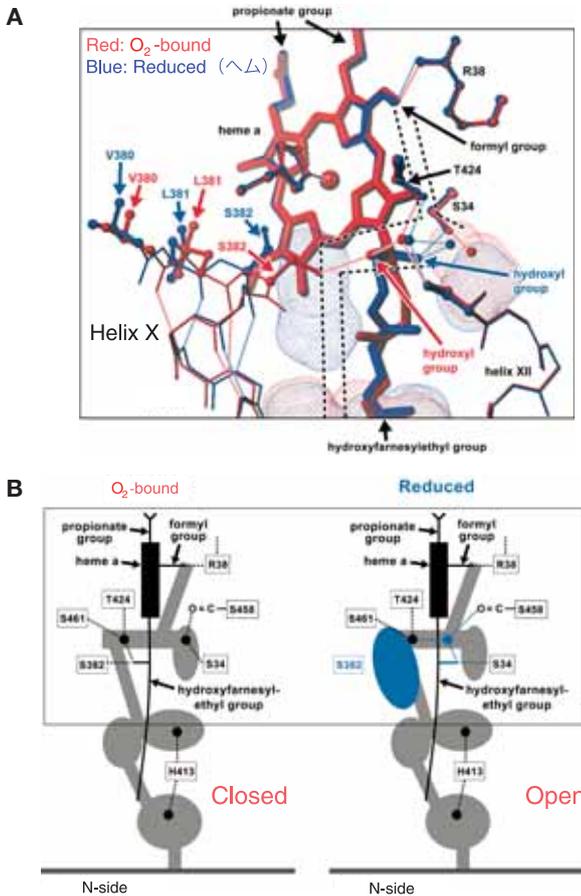


図 12 酸化還元に伴う H-pathway の水経路の立体構造変化<sup>20)</sup>  
 A: 水経路の酸化還元に伴う立体構造変化。青: 酸化型 (1.8 Å 分解能)、赤: 還元型 (1.9 Å 分解能)。水キャビティーは点で表示。B: 水経路の立体構造変化の模式図。青で示された構造は還元型の時のみに認められる。灰色、青色で示された領域にミトコンドリア内膜内部 (N-side) の水が到達できる。円と楕円は水分子が保管され得るに十分な大きさの空間を示す。  
 T. Tsukihara, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15304-15309. Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.

める努力が続けられている。

NO 結合型の X 線構造が 1.8 Å 分解能で決定された (NO は O<sub>2</sub> の最も優れた類似体である)。図 13 のように Cu<sub>B</sub> は完全還元型の時と同様平面 3 配位構造であり配位子との距離は 2.5 Å であり Cu<sub>B</sub> の安定性を考慮すれば配位子への電子伝達は O<sub>2</sub> が結合しているにもかかわらず非常に遅いことを示唆している<sup>21)</sup>。さらに Y244OH からの電子伝達も図 13 に示されているように H240 のイミダゾール基により配位子への相互作用がほぼ完全に妨害されているため配位子への電子伝達は非常に遅いことを示している。同様の結果が CO 結合型についても認められる<sup>21)</sup>。これらの X 線構造解析結果は O<sub>2</sub> 還元部位が配位子 (O<sub>2</sub>) への 2 電子還元を防ぐ構造になっていることを示している。次に CN<sup>-</sup> 結合型は O<sub>2</sub> 結合型の共鳴構造の一つである (Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub><sup>-</sup>) の類似体と考えられる。この X 線構造が 2.05 Å 分解能で決定された (図 14A)<sup>21)</sup>。CN<sup>-</sup> 結合により Cu<sub>B</sub> の配位構造が大きく変化し、結合している CN<sup>-</sup> に対して 3 本の電子伝達経路が形成された (図 14C)<sup>21)</sup>。Fe<sub>a3</sub><sup>2+</sup> からは 2 電子の供与が可能であるのでこの構造は 4 電子の同時供与を強く示唆してい

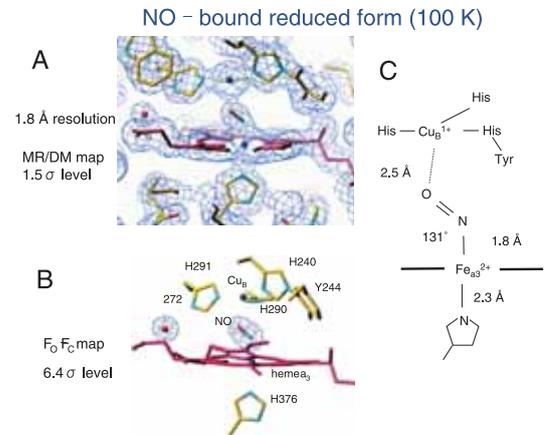


図 13 NO 結合型完全還元型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線構造<sup>21)</sup>  
 A: 1.8 Å 分解能の電子密度。B: A から決定された O<sub>2</sub> 還元中心の構造。  
 C: NO 配位構造。  
 (B,C) K. Muramoto, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107, 7740-7745.

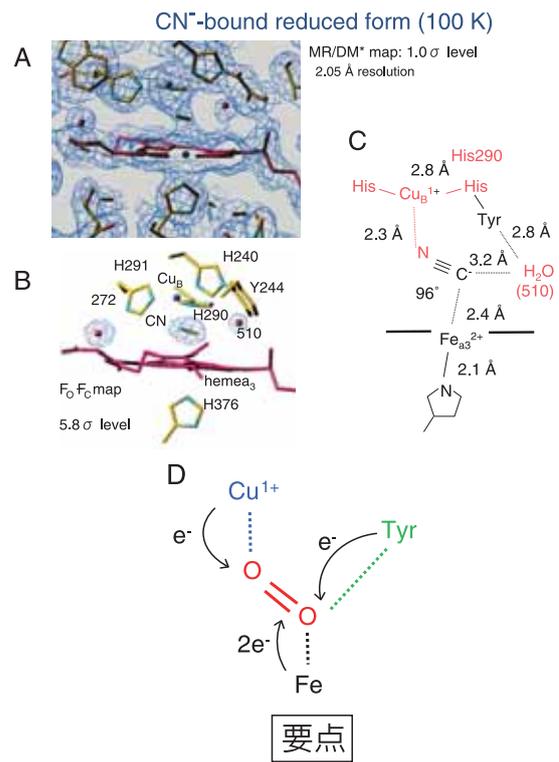


図 14 CN<sup>-</sup> 結合型完全還元型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線構造<sup>21)</sup>  
 A: 2.05 Å 分解能の電子密度。B: A から決定された O<sub>2</sub> 還元中心の構造。  
 C: CN<sup>-</sup> 配位構造。CN<sup>-</sup> 結合によって変化した構造は赤で示されている。  
 D: C に基づいて推定できる O<sub>2</sub> 結合型酵素の立体構造。  
 (B,C) K. Muramoto, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, 107, 7740-7745.

る (図 14D)。言いかえると O<sub>2</sub> 還元中心は O<sub>2</sub><sup>-</sup> が結合した時さらに 2 本の電子伝達経路を形成し、4 電子還元により O<sub>2</sub> を水にまで還元することを強く示唆している。O<sub>2</sub> に 1 電子ずつ逐次供与すると種々の活性酵素種が形成される。しかし、本酵素はここに強く示唆されているように 4 電子還元により活性酵素種を形成せずに

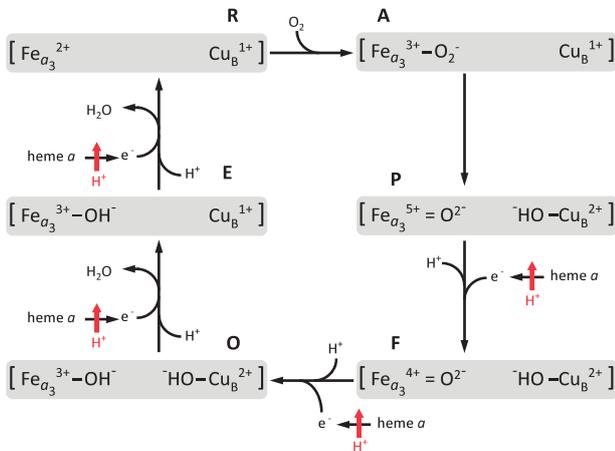


図 15 チトクロム酸化酵素の  $O_2$  還元代謝回転とプロトンポンプとの共役。P 中間体での第 4 番目の酸化当量は簡単のため  $Fe_{e3}$  に置かれている。Y244 に存在する可能性が最も高い。

$O_2$  を水にまで還元する。

CO や NO 結合により還元型で認められる水経路最大のキャビティーが完全酸化型の時と同様に閉鎖されることが明らかになった。また、P、F、O 中間体でも同様に閉鎖されることがそれらの X 線構造は示していた。したがって、水経路は  $O_2$  還元中心が還元型で配位子が結合していない時だけ開いており、N-side からのプロトン (ヒドロニウムイオン) の取り組みを可能にする<sup>21)</sup>。 $O_2$  還元のための電子はチトクロム c から 1 電子ずつ  $Cu_B$ 、heme a を経由して  $O_2$  還元中心に伝達される。詳細な電位解析により、チトクロム c からの 1 電子当量の伝達 (1 代謝回転あたり合計 4 電子当量) に共役して 1 当量のプロトンがポンプされることが知られている。本酵素の代謝回転は図 15 のように要約することができる。 $O_2$  が結合してから完全還元型 (図中の R 中間体) が再生されるまでキャビティーは閉鎖されたままである。したがって、R 中間体が生じてから  $O_2$  が結合するまでに 4 当量のプロトンが水素結合ネットワークに取り込まれなければならない。しかし、1.8 Å 分解能の構造では 4 当量のプロトン受容が可能であるかどうかは明確ではない。プロトン受容部位の探索のため、現在さらに高分解能の X 線構造を決定するための努力が続けられている。

ウシ心筋チトクロム酸化酵素は 1941 年に薬師寺、奥貫によって単離され<sup>22)</sup>、1961 年に米谷によって微結晶化された<sup>23)</sup>。それからさらに 33 年後に X 線解析実験が可能な結晶が得られ、上述の通り 1995 年に 2.8 Å 分解能の X 線構造が決定された<sup>8)</sup>。さらに 15 年後に 1.8 Å 分解能に到達した<sup>21)</sup>。しかし、まだ既存の化学の言葉だけでは説明できない現象には出会っていない。しかし、分解能の向上に伴って新世界が開けるように感じられるほど、既存の化学の言葉で記述はできるが、予想外の発見の連続であった。他の膜タンパク質についても分解能の向上は同様の驚きをもたらすに違いないと思われる。しかし、中程度の分解能に到達すればともかくアミノ酸側鎖が見えるようになる。そこから分解能を高めるのは 2.8 Å 分解能に到達するより通常はるかに困難になる。それでも高分解能に挑戦する価値があることは、例えば分解能 2.3 Å から 1.8 Å への向上によりプロトンポンプ経路の挿入図が図 9 から図 11A へと書きかえられたことから明らかである。このような膜タンパク質 X 線構造の分解能向上の具体的戦略を次回以降議論する。

[参考文献]

- 1) Y. Katayama, K. Shimokata, M. Suematsu, T. Ogura, T. Tsukihara, S. Yoshikawa and H. Shimada, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2010**, *42*, 235-240.
- 2) N. S. Isaacs, *Physical Organic Chemistry*; 2nd ed.; Longman Scientific & Technical: U. K., **1995**; pp. 235-286.
- 3) H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 2165-2169.
- 4) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J. R. Shen, S. Yoshikawa and H. Ago, *Nat. Methods.*, **2014**, *11*, 734-736.
- 5) M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato and S. Yoshikawa, *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 30259-30269.
- 6) S. Yoshikawa, K. Muramoto and K. Shinzawa-Itoh, *Annu. Rev. Biophys.*, **2011**, *40*, 205-223.
- 7) M. Mochizuki, H. Aoyama, K. Shinzawa-Itoh, T. Usui, T. Tsukihara and S. Yoshikawa, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 33403-33411.
- 8) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, *Science*, **1995**, *269*, 1069-1074.
- 9) S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel, *Nature*, **1995**, *376*, 660-669.
- 10) B. Kadenbach, M. Ungibauer, J. Jarausch, U. Buge and L. Kuhn-Nentwig, *Trends Biochem. Sci.*, **1983**, *8*, 398-400.
- 11) S. Ferguson-Miller and G. T. Babcock, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2889-2908.
- 12) P. M. Kroneck, W. A. Antholine, J. Riestner and W. G. Zumft, *FEBS Lett.*, **1988**, *242*, 70-74.
- 13) T. Ogura, S. Hirota, D. A. Proshlyakov and K. Shinzawa-Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5443-5449.
- 14) T. Ogura, S. Takahashi, S. Hirota, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E. H. Appelman and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8527-8536.
- 15) T. Ogura, S. Takahashi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5630-5631.
- 16) S. W. Han, Y. C. Ching and D. L. Rousseau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 2491-2495.
- 17) C. Varotsis, W. H. Woodruff and G. T. Babcock, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6439-6440.
- 18) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, *Science*, **1996**, *272*, 1136-1144.
- 19) S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara, *Science*, **1998**, *280*, 1723-1729.
- 20) T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimada, K. Muramoto, H. Aoyama, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, M. Yao, Y. Ishimura and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 15304-15309.
- 21) K. Muramoto, K. Ohta, K. Shinzawa-Itoh, K. Kanda, M. Taniguchi, H. Nabekura, E. Yamashita, T. Tsukihara and S. Yoshikawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 7740-7745.
- 22) E. Yakushiji and K. Okunuki, *Proc. Impact Acad. Japan*, **1941**, *17*, 205-223.
- 23) T. Yonetani, *J. Biol. Chem.*, **1961**, *236*, 1680-1688.

[著者プロフィール]

氏名：吉川信也 (Yoshikawa Shinya)

所属：兵庫県立大学大学院生命理学研究科

連絡先：〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

TEL: 0791-58-0345

E-mail: yoshi@sci.u-hyogo.ac.jp

出身大学：大阪大学大学院理学研究科博士後期課程生物化学専攻

学位：理学博士

現在の研究テーマ：ミトコンドリア呼吸のピコバイオロジー

# Topics on Chemistry

## 膜透過性ポリジスルフィド (CPDs) を用いた細胞内導入

株式会社同仁化学研究所 見汐 航太郎

ドラッグデリバリーシステム (DDS) において、効率的な細胞内への薬物導入は大きな課題の一つである<sup>1)</sup>。

この課題に対して、HIV ウイルス由来の TAT ペプチドの有用性が見出されて以来、アルギニンに富んだペプチドを利用した薬物等の細胞内導入が活発に研究され、DDS への応用が期待されている。このようなアルギニンペプチドを利用した細胞内への取り込みはマクロピノサイトーシスと呼ばれる特殊なエンドサイトーシスが関与しており、導入したい化合物をアルギニンペプチドと結合させることによって、比較的容易に細胞内に取り込ませることが可能である<sup>2)</sup>。しかしながら、アルギニンペプチドは、細胞毒性があること、また、エンドソームに捕捉されるために効率的な細胞内導入が行えない、などの課題が残されている。

本稿では、これらの課題を克服した新しい細胞内導入法について紹介したい。

最近、細胞毒性が少ないキャリアとして、細胞膜透過性ポリジスルフィド (CPDs) を用いた細胞内導入が注目されている。これらは、ジスルフィド結合を介してアルギニンペプチドのような細胞膜透過性部位をポリマー化したものであり、細胞内に導入されるとグルタチオンなどの還元物質によって還元され、目的物質が放出されるというものである。このようなメカニズムを利用することで、低毒性で効率的な細胞質への輸送を可能にしている。一般的に CPDs は、ポリエチレンジアミン (PEI) のようなポリマーにジスルフィドを有する分子を化学修飾することや、ジスルフィドを有するモノマーを用いて共有結合的にポリマー化することによって作製する。しかし、このような手法では主に遺伝子導入のような非共有結合的な細胞内導入にしか適用できなかった。そこで、Matile らは、開環ジスルフィド交換反応を用いた新しい CPDs 作製法を提案している<sup>3)</sup>。本手法を用いた場合、ポリマー化は基質のチオール基がトリガーとなって進行する。基質のチオール基が、アルギニン側鎖を導入した環状 S-S 結合をもつモノマーと反応すると、ジスルフィド結合が開裂し、新しいチオール基が生成される。このチオール基が別の環状 S-S 結合をもつモノマーと反応すると、また新しいチオール基が生成される。この反応が連続して起こることで、ポリマー化が進行し、ヨードアセトアミドを加えることによって停止する (Fig. 1)。

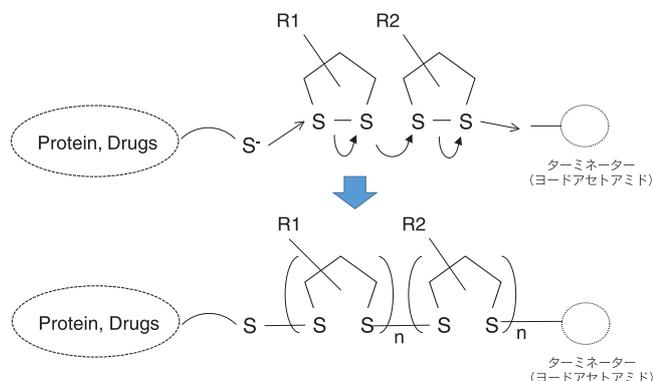


Fig. 1 ポリジスルフィド化機構

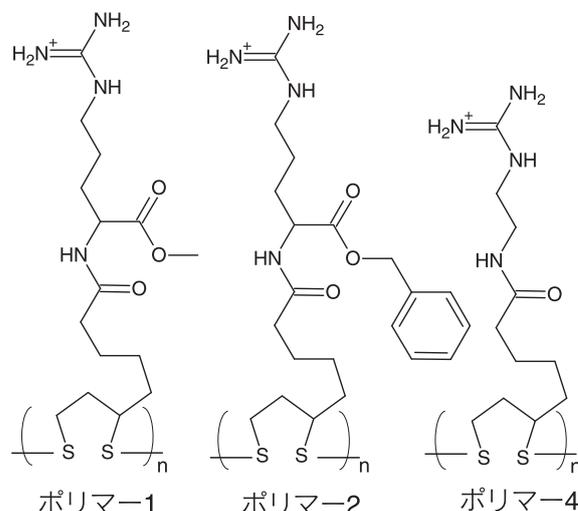


Fig. 2 ポリマーの構造

Matile らは、これらの手法で作製した CPDs の細胞内導入の様子を、基質として蛍光物質であるカルボキシフルオレセイン (CF) チオール基誘導体を用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLMS) で観察している<sup>4)</sup>。

その結果、比較的脂溶性の低いリボ酸ベースの側鎖を持つポリマー 4 が効率的に細胞質に導入され、脂溶性の高いポリマー 2 はエンドソーム内に、そしてメチルエステルを有するポリマー 1 は核に集積することが確認されている。

このような側鎖の構造によるポリマーの細胞内局在の違いは、脂溶性と S-S 交換反応の速度が関係していると考えられる。脂溶性が高いポリマー 2 はエンドサイトーシスを介して細胞内に導入され、エンドソームに捕捉されやすい。一方、脂溶性の低いポリマー 1, 4 は、エンドサイトーシスを介さず、細胞膜表面のチオール基と CPDs が共有結合することによって、細胞膜を通過し、細胞内のグルタチオンにより細胞内に放出されると推察されている。また、細胞質に局在化するポリマー 4 は S-S 交換反応の速度が速く、核に局在化するポリマー 1 は交換反応が遅い。つまり、ポリマー 4 は細胞内に導入された後、即座にグルタチオンと反応して細胞質内で基質が放出されるのに対し、ポリマー 1 はその反応速度が遅いため細胞質で放出されず核まで移行する、とされている。さらに、ポリマー 4 の細胞毒性は非常に低く、ポリアルギニンでは明らかな細胞毒性を示す 10  $\mu\text{M}$  でもほとんど細胞毒性を示していない。このような細胞毒性の低さは、その特有の細胞内導入機構によるものと考えられる (Fig. 3)。

以上のように、今回紹介した CPDs は低毒性で、かつ効率的な細胞内導入を可能にする。また、チオール基を有する化合物であれば、容易にポリマーに挿入することができ、導入効率は付加した化合物には依存しない。今後、S-S 交換反応の速度制御や細胞内導入の詳細なメカニズム解明等の問題点を解決していくことで、ドラッグデリバリーシステムの発展にも大きく貢献する可能性があると考えられる。

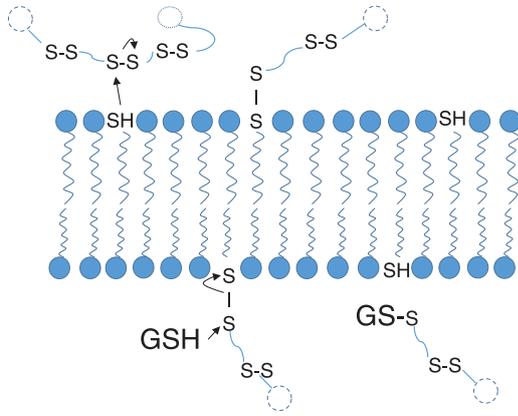


Fig. 3 ポリジスルフィド化機構

[参考文献]

- 1) A. G. Torres and M. J. Gait, *Trends Biotechnol.*, **2012**, 30, 185-190.
- 2) M. Kosuge, T. Takeuchi, I. Nakase, A. Tomos Jones and S. Futaki, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 656-664.
- 3) E. Bang, G. Gasparini, G. Molinard, A. Roux, N. Sakai and Stefan Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 2088-2091.
- 4) G. Gasparini, E. Bang, G. Molinard, D. V. Tulumello, S. Ward, S. O. Kelley, A. Roux, N. Sakai and S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 6069-6074.

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ

小社カスタマーリレーション部ではお寄せいただいたお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。



**第一弾「はじめての細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定プロトコル」**  
原理・Ca<sup>2+</sup>プローブの特徴・測定方法・トラブルシューティングの方法など問い合わせ担当者がわかりやすく解説したプロトコルです。



**第二弾「はじめての抗体標識プロトコル」**  
直接標識法の利点や実施例などを解りやすくまとめました。  
はじめて抗体を標識される方にご覧いただきたいプロトコルです。



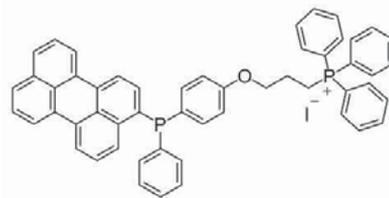
**第三弾「はじめての酸化ストレスマーカー測定プロトコル」**  
各酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法、小社製品を使用するの測定方法などをまとめたプロトコルです。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。  
フリーダイヤル：0120-489548  
e-mail: info@dojindo.co.jp

新製品 (6月23日発売)

ミトコンドリア膜脂溶性過酸化検出蛍光試薬

MitoPeDPP



<特長>

- ・細胞小器官であるミトコンドリアに特異的に集積
- ・ミトコンドリア膜の脂溶性過酸化物を選択的に検出
- ・励起波長 488 nm、蛍光波長 535 nm で測定可能

小社では脂質過酸化検出試薬として DPPP、Spy-LHP、Liperfluo を販売しております。この度これらの製品に加え、ミトコンドリア膜中の脂溶性過酸化物を検出する試薬を商品化致しました。

ミトコンドリアは ATP 産生のみならず、活性酸素を発生する細胞小器官として知られています。活性酸素に代表されるヒドロキシラジカル (HO<sup>•</sup>)、スーパーオキシドアニオンラジカル (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>)、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) は膜中の不飽和脂肪酸を酸化的に損傷し過酸化脂質を形成します。このような酸化ストレスで生じる生成物を可視化することで、ミトコンドリア機能への影響をリアルタイムに解析することが可能になります。

本製品は生細胞膜を透過してミトコンドリアに集積する性能を有しています。ミトコンドリアに集積した MitoPeDPP は、脂溶性過酸化物によって特異的に酸化され蛍光を発します (Fig. 1)。一般に汎用される 488 nm の励起波長で観測することが可能なため、蛍光顕微鏡を用いた脂溶性過酸化物のイメージングが可能です。

MitoPeDPP は福岡大学・塩路准教授により開発された試薬です。



Fig. 1 HepG2 細胞での過酸化物添加による過酸化検出イメージング  
(A): MitoPeDPP を細胞にロード後、t-BHP\*による外部刺激を加え 15 分後に観察  
(B): ミトコンドリア染色試薬 MitoRed 染色  
(C): (A) と (B) の重ね合わせ画像  
\* t-BHP: tert-Butylhydrogenperoxide

[参考文献]

- K. Shioji *et al.*, "Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 3911-3915.

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoPeDPP	5 µg × 3	18,000	M466

DOJINDO

25th Forum in DOJIN

# 温故知新の ミトコンドリア学



- Revisiting Mitochondriology -

**2014.11.14 (金) 10:00~17:00 (開場9:30)**  
**熊本ホテルキャスル2F (熊本市中央区城東町4-2)**

代表世話人: 山本 哲郎 (元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野)

主催: 株式会社 同仁化学研究所 後援: 株式会社 ケミカル同仁

**講演プログラム**

- 10:00~10:05** 主催者挨拶 野田 栄二 (株式会社同仁化学研究所)  
**10:05~10:15** 世話人挨拶 山本 哲郎 (元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野)

**Session 1 : (座長: 山本 哲郎 (元熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野))**

- 10:15~11:15** **中田 和人** (筑波大学 生命環境系)  
 「ミトコンドリアゲノム変異による多様な病態発症機構」  
**11:15~12:00** **今村 博臣** (京都大学 白眉センター)  
 「ライブイメージングで明らかになってきた細胞内ATP濃度の時空間動態」  
**12:00~13:30** ランチブレイク (ランチョンセミナー)

**Session 2 : (座長: 小椋 光 (熊本大学発医学研究所分子細胞制御分野))**

- 13:30~14:15** **小柴 琢己** (九州大学大学院理学研究院生物科学部門統合生物学)  
 「哺乳動物における抗ウイルス免疫とミトコンドリアとの関係」  
**14:15~15:00** **岡 敏彦** (立教大学理学部生命理学科分子細胞生物学)  
 「ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構」  
**15:00~15:15** コーヒーブレイク

**Session 3 : (座長: 富澤 一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部生体機能病態学))**

- 15:15~16:00** **江崎 雅俊** (熊本大学発医学研究所分子細胞制御分野)  
 「AAAシャペロンp97/Cdc48pによるミトコンドリア形態制御機構」  
**16:00~16:45** **岡本 浩二** (大阪大学大学院 生命機能研究科 ミトコンドリア動態学研究室)  
 「ミトコンドリアを丸ごと隔離・除去する仕組み」  
**16:45~17:00** 閉会の挨拶 三浦 洵 (株式会社同仁化学研究所)  
**17:00~18:30** ミキサー

**参加費 無料** | **定員 140名**

**問い合わせ・参加申込先**

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5 (株)同仁化学研究所内「フォーラム・イン・ドージン事務局」(担当: 江口・白石)  
 Tel: 0120-489548 Fax: 0120-021557 E-mail: info@dojindo.co.jp

ホームページアドレス

URL : <http://www.dojindo.co.jp/>  
 E-mail : [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp)

フリーファックス  
 フリーダイヤル

0120-021557  
 0120-489548

**DOJIN** News No.152

ドージンニュース No.152 平成 26 年 10 月 2 日発行  
 株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES  
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒861-2202  
 発行責任者 志賀匡宣 編集責任者 江口太一 年 4 回発行 許可なくコピーを禁ず