

Investigation of the essential amino acid residues of respiratory complex I in  
*Escherichia coli* for proton translocation

(大腸菌呼吸鎖複合体 I のプロトン輸送における必須アミノ酸残基に関する研究)

佐藤元亮

呼吸鎖電子伝達系はミトコンドリアの内膜やバクテリアの細胞膜に存在しており、エネルギー代謝の鍵となる ATP の合成に必要な膜内外の H<sup>+</sup> 輸送を行っている。なかでも NADH-キノン酸化還元酵素（複合体 I）は、呼吸鎖電子伝達系で最大のタンパク質複合体であり、その機能障害が種々の神経変性疾患の原因となることが知られている。また農業科学分野では、生物種間選択性を付与したドラッグデザインの実現に伴い、近年では有望な農薬作用点の一つとして着目されている。

複合体 I は水溶性ドメインと疎水性膜ドメインが接合した L 字型構造をとっている。水溶性ドメインは FMN および 8~9 個の Fe-S クラスターを含み、NADH からユビキノンへと電子を伝達する。一方、膜ドメインでは電子伝達に共役した H<sup>+</sup> 輸送が行われる。近年の複合体 I に関する構造生物学的研究の進展によって、その全貌が徐々に明らかになりつつあるが、本酵素は呼吸鎖酵素の中で最も研究の進展が遅れている。特に哺乳類ミトコンドリアの複合体 I は 44 種類ものサブユニットから成る非常に複雑なタンパク質複合体であり、ミトコンドリア DNA への変異導入が困難等の理由から、変異型酵素を用いた研究は殆ど行われていない。一方、バクテリアの複合体 I はミトコンドリア複合体 I におけるコアサブユニットと相同性の高い 14 種類のみで構成されており、その X 線結晶構造が報告されていることなどから、複合体 I の機能解析を行う上で格好のモデルと言える。

そこで本学位申請者は大腸菌の複合体 I を取り上げ、生物種間で保存された領域に部位特異的変異を導入した酵素を作製・解析することで、その機能解明を目指した。変異導入に際しては、組換え操作によりサブユニット構成比に影響が生じないように、大腸菌の染色体 DNA に直接変異を導入する手法を用いた。得られた変異型酵素について、電子伝達活性や H<sup>+</sup> 輸送活性の測定、サブユニット構成、ならびに阻害剤に対する感受性変化の評価を行い、各変異が複合体 I 全体に及ぼす影響を解析した。

#### 1. サブユニット NuoI の電子伝達部位の解析

これまでに、水溶性ドメインに存在する多くの Fe-S クラスターにおいて EPR シグナルが同定されてきていたが、NuoI に含まれる 2 つの Fe-S クラスター N6a および N6b に特有のシグナルは明らかにされていなかった。両クラスター近傍の種々のアミノ酸に変異を導入した結果、クラスター N6a 近傍の変異体 (C63S と P110A)、および N6b 近傍の変異体 (P71A) が酵素活性を僅かに保持していた。そこで、これら変異体と野生型酵素の EPR スペクトルを比較した結果、両クラスターに特有の EPR シグナルを検出することに初めて成功した。

これにより、従来 EPR スペクトル解析の妨害要因として考えられていた両クラスター間のスピンスピン相互作用は存在しないことを立証した。

## 2. サブユニット NuoD のキノン結合領域の解析

NuoD は複合体 I の中で最もアミノ酸配列が保存されたサブユニットであり、上述のクラスター N6b から受け取った電子をユビキノンに渡すクラスター N2 と、キノン結合領域を含む。本研究ではキノン結合領域の構造特性を明らかにするため、同領域を構成する NuoD に変異導入を実施した。その結果、N 末端近傍のループ (Gly217-Phe227) 周辺のアミノ酸を置換することで酵素活性の低下および阻害剤に対する感受性変化が認められた。これにより、同ループ周辺がキノンおよび阻害剤の結合部として特に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに X 線結晶構造の情報と比較することで、Tyr273 がユビキノンのキノン環部と相互作用している可能性が示された。一方、同相互作用が予想されていた His224 は、キノンとの結合に直接的に関与しないことが明らかになった。

## 3. サブユニット NuoK 中央のグルタミン酸残基の機能解析

3 回膜貫通型タンパク質である NuoK サブユニットの中央部には活性に重要な 2 つのグルタミン酸 (Glu36 および Glu72) が存在する。両グルタミン酸の機能を解明するために、その位置を同一ヘリックス上でシフトさせた変異型酵素 (E36A/ L32E など) を作成した。その結果、同一のヘリックスターン上にグルタミン酸をシフトした変異型酵素は、活性を維持していることが判明した。本結果より両残基は活性に重要であること、および共に位置上の自由度が僅かにあることが明らかになった。X 線結晶構造の情報と合わせて考えると、両残基は (水分子を介して) 水素結合を形成しており、隣接するサブユニットの極性アミノ酸 (後述) との一連の水素結合ネットワークが H<sup>+</sup> 輸送の鍵を担っていることが予想された。即ち、NuoA、J、K、H サブユニットが協調して H<sup>+</sup> 輸送能を担っていることが示唆された。

## 4. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター様サブユニットである NuoN、NuoM および NuoL の解析

NuoN、NuoM および NuoL サブユニットは互いに類似した Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター様の構造からなる膜タンパク質である。NuoM と NuoL は H<sup>+</sup> 輸送能に関与していることがわかっていたが、NuoN サブユニットが同機能を担っている可能性は疑問視されてきた。そこで、NuoN サブユニットに複数の変異を導入して解析を行った結果、膜貫通型ヘリックスの中央部に位置し高度に保存されている極性残基 (Glu133、Lys217、Lys247、Lys395) が活性に必須であり、同サブユニットが H<sup>+</sup> 輸送能に関与していることを明らかにした。さらに、NuoM および NuoL についての研究も行い、NuoM の Glu407、NuoL の Arg175 および Lys342 も活性に必須であることを新たに明らかにした。これにより、膜ドメインの活性必須残基は全て膜貫通ヘリックスの中央部に存在しており、特にサブユニットの境界に位置する極性残基の

変異が酵素活性に大きな影響を及ぼすことが判明した。また、NuoN、NuoM、および NuoL の 7 番目と 12 番目のリックスの歪曲点に存在している Pro 残基は活性に必須ではなく、H<sup>+</sup> 輸送に必要な膜ドメインの構造変化は大きな動きを伴うものではない可能性が示唆された。さらに、NuoN におけるその他の変異型酵素ならびに C 末端欠失体の解析より、NuoL 由来のヘリックス HL との接合部分、および NuoM の  $\beta$  シートとの接合点は、膜ドメインの構造を維持する上で重要であることがわかった。

以上の結果より、複合体 I の H<sup>+</sup> 輸送には、各膜サブユニットの中央部を跨いだ水平方向の構造変化の伝播が重要であると推定した。さらに、H<sup>+</sup> 輸送経路は多くの研究グループが着目している個々の膜サブユニットの内部だけではなく、膜サブユニットの境界領域にも存在している可能性が示唆された。