

様式6

論文目録

報告 番号	甲 業 第 50 号	氏 名	橋 本 満
学位論文題目	ミトコンドリアADP/ATP透過担体における親水性ループの構造と機能的役割		
公刊論文	<p>1. Translocation of Loops Regulates Transport Activity of Mitochondrial ADP/ATP Carrier Deduced from Formation of a Specific Intermolecular Disulfide Bridge Catalyzed by Copper-o-Phenanthroline Eiji Majima, Kazuro Ikawa, Masashi Takeda, Mitsuru Hashimoto, Yasuo Shinohara, Hiroshi Terada 1995年12月8日発行 The Journal of Biological Chemistry誌270巻49号29548-29554頁.</p> <p>2. Fluctuation of the First Loop Facing the Matrix of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier Deduced from Intermolecular Cross-Linking of Cys⁵⁶ Residues by Bifunctional Dimaleimides Mitsuru Hashimoto, Eiji Majima, Satoru Goto, Yasuo Shinohara, Hiroshi Terada 1999年1月19日発行 Biochemistry誌38巻3号1050-1056頁.</p>		
公刊参考論文	<p>1. Expression of Bovine Heart Mitochondrial ADP/ATP Carrier in Yeast Mitochondria : Significantly Enhanced Expression by Replacement of the N-terminal Region of the Bovine Carrier by the Corresponding Region of the Yeast Carriers Mitsuru Hashimoto, Yasuo Shinohara, Eiji Majima, Takashi Hatanaka, Naoshi Yamazaki, Hiroshi Terada 1999年1月12日発行 Biochimica et Biophysica Acta誌1409巻3号113-124頁.</p>		
その他 (総説・単行本等)	なし		

論文内容要旨

報告番号	甲 薬 第 50 号	氏 名	橋本 満
学位論文題目	ミトコンドリアADP/ATP透過担体における親水性ループの構造と機能的役割		
<p>内容要旨</p> <p>ミトコンドリア内膜に存在するADP/ATP透過担体(AAC)は、酸化リン酸化の基質であるADPとその産物であるATPの交換輸送を行う酸化リン酸化反応に必須の膜タンパク質である。AACは種間を通じて約300のアミノ酸残基からなり、類似性の高い約100アミノ酸残基単位が3回繰り返した配列をしている。各繰り返し配列は、2カ所の疎水性領域とそれを連結する約40残基程度の長い親水性領域からなる。この親水性領域はミトコンドリア内腔(マトリックス)側に存在するループを形成している。AACのトポロジーは、N、C両末端が細胞質側に突出した6回膜貫通構造であることが明らかとなっている。またAACは、基質結合部位を細胞質側に向けたc-stateとマトリックス側に向けたm-stateの2種類の立体構造をとり、これらの立体構造間の転移によって透過機能が発現すると考えられている。ウシ心筋AAC(bhAAC)の3つマトリックス側の親水性ループ(M1, M2, M3)にそれぞれ存在するシステイン残基(Cys⁵⁶, Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶)のSH試薬に対する反応性の違いから、各ループの立体配置がそれぞれ異なっていること、及びAACの機能発現に伴った構造転移に際してこれらループは立体配置を変化させることが見いだされている。しかし、これら親水性ループと基質輸送との関連はいまだ不明である。そこで、本研究ではAACの基質透過機構の解明を目的として、特に親水性ループの構造と機能的役割について検討した。</p> <p>1. 化学架橋試薬を用いたADP/ATP透過担体のループの空間的配置の解析</p> <p>SS架橋試薬銅オルトフェナンスロリン(Cu(OP)₂)をウシ心筋ミトコンドリアの反転膜小胞(SMP)に作用させSDS-PAGEに供したところ、30 kDaのAACバンドの減少に伴って、約60 kDaのバンドの出現し、このバンド強度はCu(OP)₂作用濃度に依存して増大した。アミノ酸配列分析の結果、この60kDaのタンパク質はループM1中のCys⁵⁶同士の分子間架橋により生じたbhAACの2量体であることが明らかとなった。従ってAACは、膜中で2つのAAC分子が対称に対向した12回膜貫通型の2量体として機能することが明らかとなった。次に、架橋距離が7.7~16.8 Åと異なる架橋試薬である6種のジマレイミド誘導体をSMPに作用させたところ、全ての架橋試薬がCu(OP)₂同様にCys⁵⁶同士の分子間架橋を特異的に形成した。この結果から、Cys⁵⁶を含むループM1のみがマトリックス側に露出し、他のループは膜内に貫入していることが明らかとなった。更に、この架橋反応を解析した結果、架橋距離が12 Åのジマレイミドが最もCys⁵⁶間の架橋を形成し易いことを見いだした。また、全ての架橋試薬によるCys⁵⁶間の架橋は、m-stateの状態では形成されなかった。以上の結果から、ループM1はAACがm-stateではマトリックス側に露出し、Cys⁵⁶間の距離が12 Åの状態を中心とする広範囲な距離で揺動しているのに対し、c-stateでは一転して膜中に貫入していると解釈することができる。即ち、基質輸送に伴ってAACのループは立体配置を大幅に変化させることになる。また、架橋形成に伴いAACの透過活性が阻害されたことから、ループM1の立体配置変化がAACの透過機能に必須であると考えられ、ループM1は構造転移に伴ったこの「開閉」的な立体配置変化により、基質輸送に際し、マトリックス側のゲートとしての役目を果たしていることが示唆された。</p>			

2. bhAACの酵母細胞における機能的発現系の構築

bhAACは、現在までのAAC研究のほとんどで標品とされてきた。そのbhAACを遺伝子工学的手法により機能解析するための実験系を確立することを目的として、固有のAAC遺伝子(yAAC1, yAAC2)が破壊された酵母細胞WB-12を宿主として、bhAACの機能的発現系の構築を試みた。しかし、bhAACは酵母細胞のミトコンドリアにほとんど発現しなかった。そこで、bhAACと酵母AACのアミノ酸配列の比較を行い、推定2次構造上で細胞側に突出しているN末端領域のアミノ酸残基数及び配列が、bhAACと酵母AACで全く異なることに着目し、bhAACのN末端領域11残基をyAAC2(26残基)またはyAAC1(16残基)の相当領域と置換したキメラbhAACのWB-12細胞での発現を試みた。その結果、キメラbhAACは顕著にミトコンドリアに発現した。更に、これらキメラbhAACがnativeなbhAACと同等の透過機能を有していた。以上の結果から、bhAACを機能を保持したキメラ体として酵母細胞にて機能的に発現させることに成功した。

3. Cys⁵⁶の機能的役割とループM1の立体配置変化に関するアミノ酸残基の同定

膜透過性のSH試薬であるN-エチルマレイミド(NEM)が、Cys⁵⁶を標識することでbhAACの透過活性が阻害されることが知られている。そこで、Cys⁵⁶の機能的役割を検討する目的でNEMのAACの透過機能への影響を検討した。その結果、NEMはCys⁵⁶を修飾することで、マトリックス側からの基質結合を阻害することなく、m-stateからc-stateへの構造転移を阻害した。従って、基質結合後の構造転移に際したループM1の立体配置変化が、AACの透過機能に必須であることが明らかとなった。更に、キメラbhAAC及びyAAC2のCys⁵⁶に相当するシステイン残基を部位特異的変異解析した結果、置換したアミノ酸残基の側鎖体積の増大に依存して、変異AACの基質透過活性は低下した。従って、Cys⁵⁶はAACの透過機能に必須のアミノ酸残基ではなく、NEMによる活性阻害は、AACの構造転移の際Cys⁵⁶周辺で生じる何らかの残基間相互作用に対して、立体障害となっていると考えられた。そこで、Cys⁵⁶のN末端側に隣接するアスパラギン酸残基が、種間で保存されていることに着目し、この残基の部位特異的変異体を調製し、その基質透過活性を検討したところ、アスパラギンやアラニンに置換することで、透過活性は完全に消失した。この結果から、アスパラギン酸残基のカルボキシル基がAACの構造転移の際に他のアミノ酸残基と塩橋を形成するなどの相互作用を行っていると思われる。

4. ループM2における基質認識機構の解明

過去の報告から、bhAACにおいて基質結合部位であることが示唆されているループM2領域の3次元構造とATPとの相互作用の様式を分子力学計算及び分子動力学計算を用いたCGシミュレーションにより解析したところ、Arg¹⁵¹とAsp¹⁶⁷が塩橋を形成し、これがATPのポリリン酸エステルを静電的に吸引することと、この塩橋により形成されるループ内ループ中の疎水性残基のクラスター(Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³, Phe¹⁶⁴)に結合後のアデニン環が疎水的相互作用により侵入することが見いだされている。そこでこのシミュレーションをもとに上記残基の部位特異的変異解析を行ったところ、Phe¹⁶⁴を除く上記の残基が透過機能に必須であることが明らかとなった。以上の結果は、このループM2内ループ(Arg¹⁵¹~Asp¹⁶⁷)領域がbhAACの主たる基質結合部位であることを強く示唆した。

以上の研究成果より、AACの基質輸送には、マトリックス側の巨大な親水性ループが深く関与していることが明らかとなった。また、これらはそれぞれ異なる構造と機能的役割を有しており、これらループの協調的な構造転移がAACの基質輸送の本体であることが強く示唆された。このことは、一般的な輸送担体による物質輸送にも応用できると考えられる。

ミトコンドリア ADP/ATP 透過担体に
おける親水性ループの構造と機能的役割

1999年

橋 本 満

ミトコンドリア ADP/ATP 透過担体に
おける親水性ループの構造と機能的役割

1999年

橋 本 満

目次

第1章 序論

1.1 ミトコンドリア	1
1.2 ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー	1
1.3 ADP/ATP 透過担体	3
1.3.1 機能的特徴	
1.3.2 構造的特徴	
1.3.3 機能構造と基質結合部位	
1.4 研究の目的	7
1.5 参考文献	9

第2章 銅オルトフェナンスロリン錯体を用いた ADP/ATP 透過担体の多量体構造の解析

2.1 緒言	11
2.2 結果	13
2.2.1 銅オルトフェナンスロリンによる ADP/ATP 透過担体分子間架橋の形成	
2.2.2 ADP/ATP 透過担体の存在状態に応じた Cu(OP)_2 による架橋反応	
2.2.3 ADP/ATP 透過担体の分子間架橋形成に関与するシステイン残基の同定	
2.3 考察	19
2.3.1 銅オルトフェナンスロリンによる ADP/ATP 透過担体架橋反応	
2.3.2 ADP/ATP 透過担体のループの配置	
2.3.3 ADP/ATP 透過担体の機能単位	
2.4 参考文献	23
2.5 実験方法	24

第3章 2価性架橋試薬を用いた ADP/ATP 透過担体の 2 量体構造と透過機能発現機構の解析

3.1 緒言	27
3.2 結果	29
3.2.1 コンピューター解析によるジマレイミド誘導体の架橋距離の決定	
3.2.2 ジレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋の形成	
3.2.3 ジマレイミド誘導体の分子間架橋反応に対する各種試薬の影響	
3.2.4 ADP/ATP 透過担体の ADP 透過活性に対する架橋反応の影響	
3.2.5 ジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋形成反応の比較	
3.2.6 ジマレイミド誘導体の SH 基反応性の比較	
3.2.7 Cys ⁵⁶ 間架橋形成反応における架橋距離依存性	
3.3 考察	37
3.3.1 ADP/ATP 透過担体の膜内構造におけるシステイン残基の存在位置	
3.3.2 ADP/ATP 透過担体の立体構造とループ M1 の存在状態	
3.3.3 基質輸送におけるループ M1 の機能的役割	
3.4 参考文献	40
3.5 実験方法	41

第4章 ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の酵母細胞における機能的発現系の確立

4.1 緒言	43
4.1.1 宿主細胞の選択	
4.1.2 酵母細胞の ADP/ATP 透過担体	
4.2 結果	46
4.2.1 ADP/ATP 透過担体欠損酵母細胞での bhAAC 及び yAAC2 の機能的発現	
4.2.2 ADP/ATP 透過担体欠損酵母細胞でのキメラ bhAAC の機能的発現	
4.2.3 酵母ミトコンドリアにおける各種 ADP/ATP 透過担体発現量の定量	
4.2.4 酵母ミトコンドリアにおける各種 ADP/ATP 透過担体の ADP 透過活性	
4.2.5 各種 ADP/ATP 透過担体の酵母細胞における転写レベル	
4.3 考察	55
4.3.1 構築した発現系の特徴と利点	
4.3.2 bhAAC の酵母細胞における機能発現	
4.3.3 ADP/ATP 透過担体の機能発現における N 末端領域の役割	
4.4 参考文献	59
4.5 実験方法	61

第5章 ADP/ATP 透過担体の透過機能発現における第1ループの立体配置変化に関与するアミノ酸残基の同定

5.1 緒言	67
5.2 結果	69
5.2.1 MMTS による bhAAC 標識反応	
5.2.2 bhAAC の ADP 透過活性に対する NEM, MMTS の影響	
5.2.3 EMA の Cys ¹⁵⁹ 標識反応に対する NEM, MMTS の影響	
5.2.4 bhAAC の立体構造変化に対する NEM, MMTS の影響	
5.2.5 y2NbhAAC 及び yAAC2 の Cys ^{M1} 変異体の機能解析	
5.2.6 Cys ^{M1} 残基に隣接する Asp 残基の変異に伴う ADP/ATP 透過担体の機能変化	
5.3 考察	81
5.3.1 MMTS による bhAAC 標識反応とその影響	
5.3.2 Cys ^{M1} 修飾の ADP/ATP 透過担体に対する影響	
5.3.3 Cys ^{M1} のループ M1 の立体配置変化に対する機能的役割	
5.3.4 ループ M1 の立体配置変化に対するアスパラギン酸残基の関与	
5.4 参考文献	85
5.5 実験方法	87

第6章 ADP/ATP 透過担体の基質認識に関与するマトリックス側第2ループ中のアミノ酸残基の同定

6.1 緒言	91
6.2 結果	93
6.2.1 ADP/ATP 透過担体のループ M2 領域のアミノ酸配列比較	
6.2.2 y2NbhAAC におけるループ M2 領域部位特異的変異体の機能解析	
6.3 考察	97
6.4 参考文献	100
6.5 実験方法	101

第7章 総括

7.1 ADP/ATP 透過担体の機能構造と親水性ループの膜内構造と機能的役割	103
7.2 ADP/ATP 透過担体の基質透過機構	106
7.3 他の溶質輸送担体ファミリーの基質輸送機構	108
7.4 参考文献	110

本稿で用いた省略形

AAC, ADP/ATP carrier
ADP, adenosine 5'-diphosphate
ATP, adenosine 5'-triphosphate
ATR, atractyloside
BCA, biconchonic acid
bhAAC, bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier
BHM, bovine heart mitochondria
BKA, bongkreic acid
BMH, bismaleimido-hexane
BMME, bismaleimidomethylether
BSA, bovine serum albumin
CBB, coomassie brilliant blue R-250
CATR, carboxyatractyloside
Cu(OP)₂, copper *o*-phenanthroline
DMF, *N,N*-dimethylformamide
DTT, dithiothreitol
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EMA, eosin 5-maleimide
GSH, reduced type of glutathione
HEPES, *N*-(2-hydroxyethyl)-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HPLC, high performance liquid chromatography
MDPDM, (methylenediphenylene)dimalimide
2-ME, 2-mercaptethanol
MMTS, methyl methanethiolsulfonate
MOPS, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid
NACys, *N*-acetyl-L-cysteine
NEM, *N*-ethylmaleimide
ORF, open reading frame
PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis
PCR, polymerase chain reaction
PIPES, piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)
PDM, phenylenedimalimide
SDS, sodium dodecyl sulfate
SMP, submitochondrial particles
TFA, trifluoroacetic acid
yAAC1 and yAAC2, Type 1 and 2 isoform in yeast ADP/ATP carrier
YCp, yeast centromeric plasmid (usually indicates pRS314-YA2P in this text)
YEpl, yeast episomal plasmid (usually indicates pYO326-YA2P in this text)
y1NbhAAC, chimeric bhAAC with the N-terminal amino acid sequence of yAAC1
y2NbhAAC, chimeric bhAAC with the N-terminal amino acid sequence of yAAC2

第1章 序論

1.1 ミトコンドリア

ミトコンドリアは、細胞中のエネルギー変換の場となる細胞内小器官であり、その主要な役割は酸化リン酸化によりエネルギー供給物質ATPを合成することである。ミトコンドリアはその構造上、内膜と外膜の二重膜からなるという特徴を有している。内膜と外膜の機能的役割は大きく異なり、外膜は主にミトコンドリアの形態維持に重要であるのに対し、内膜には電子伝達系やATP合成酵素などの膜タンパク質が多数存在し、酸化リン酸化の直接の場となっている。また、外膜と内膜ではその物質透過能も大きく異なり、外膜ではポーリンと呼ばれるチャネルを介して、分子量 1万以下の物質が非特異的に透過するのに対し [1]、内膜では基本的に小分子やイオンの透過は、それぞれの物質に特異的な溶質輸送担体と呼ばれるタンパク質によって為されており、これを介さない物質透過は基本的に行われない。これら溶質輸送担体は、内膜上やマトリックス内で生じる様々な代謝反応の基質や生成物を特異的かつ選択的に透過させる役割を担っており、ミトコンドリアの機能発現には必須の構成成分である。

1.2 ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー

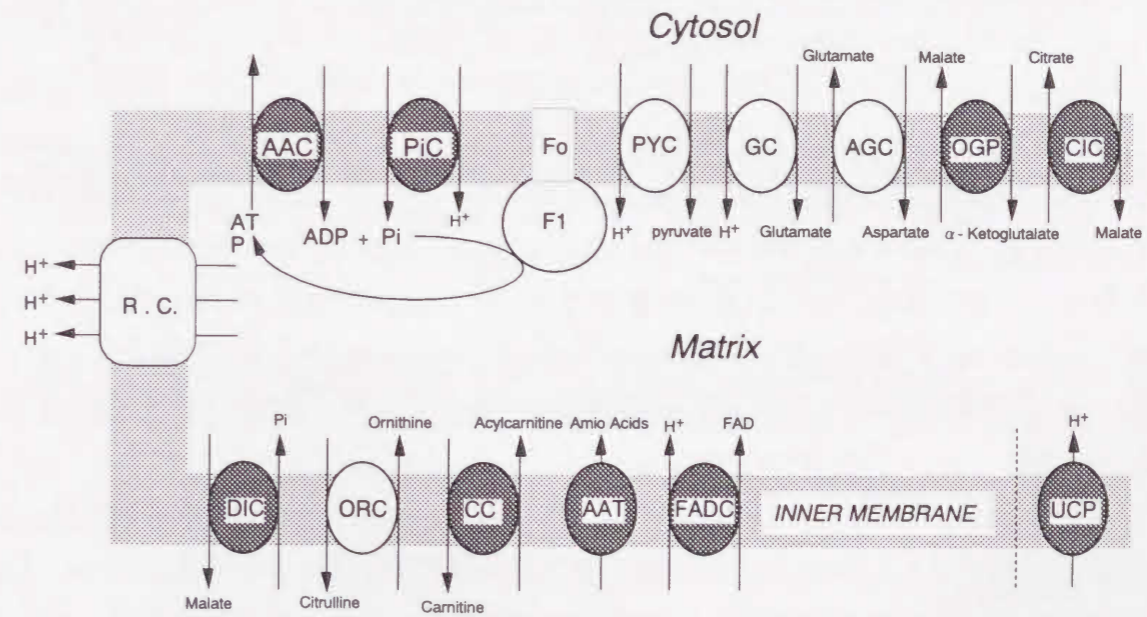


図1-1ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー

AAC: ADP/ATP透過担体, PiC:リン酸輸送担体, PYC:ピルビン酸キャリアー, GC:グルタミン酸輸送担体, AGC:アスパラギン酸/グルタミン酸輸送担体, OGP: 2-オキソグルタル酸輸送担体, CIC:クエン酸輸送担体, DIC:ジカルボン酸輸送担体, ORC:オルニチン輸送担体, CC:カルニチン輸送担体, AAT:アミノ酸輸送担体, FADC: FAD輸送担体, UCP:脱共役タンパク質, R.C.:呼吸鎖, FoF1: FoF1-ATP合成酵素をそれぞれ示す。

図1-1には、現在までに同定された13種類のミトコンドリア内膜の溶質輸送担体を示す [2]。これら溶質輸送担体は個々で非常に高い基質特異性を有し、それぞれが酸化リン酸化反応 (AAC, PiC) や、アセチルCoA合成及びTCA回路 (PYC, CAC, OGC, AGC)、糖新生 (DIC)、尿素サイクル (ORC, GC)、脂肪酸合成 (CIC)、熱産生 (UCP) など多様なミトコンドリアにおける代謝反応の基質や反応産物を輸送することでそれらの代謝反応を制御している。これらタンパク質のSDS-PAGEでの推定分子質量は28 ~ 37 kDaと各輸送担体間で非常に近接していることが知られている [2]。また、暗影で示した9種類の輸送担体は、既に何らかの生物種でそのcDNAがクローニングされ、一次構造が推定されている [3, 4]。図1-2ではそのうちの代表的な5種類の輸送担体のアミノ酸配列を比較した [5]。これらを含め既に配列が推定された全ての溶質輸送担体は、1) 300前後のアミノ酸残基からなり、その配列中に約100残基毎の繰り返し配列を有することや、2) 各繰り返し配列毎に2カ所の膜貫通領域と推定される疎水性領域を有すること、3) 各繰り返し配列の1番目の疎水領域のC末端側付近に P-x-(D, E)-x-x-(K, R) (xは任意のアミノ酸残基を示す) という共通配列を有することなどの構造的な共通点が報告されている [3]。以上のことから、これらは共通の遺伝子から進化したと考えられ、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーと呼ばれている [2]。

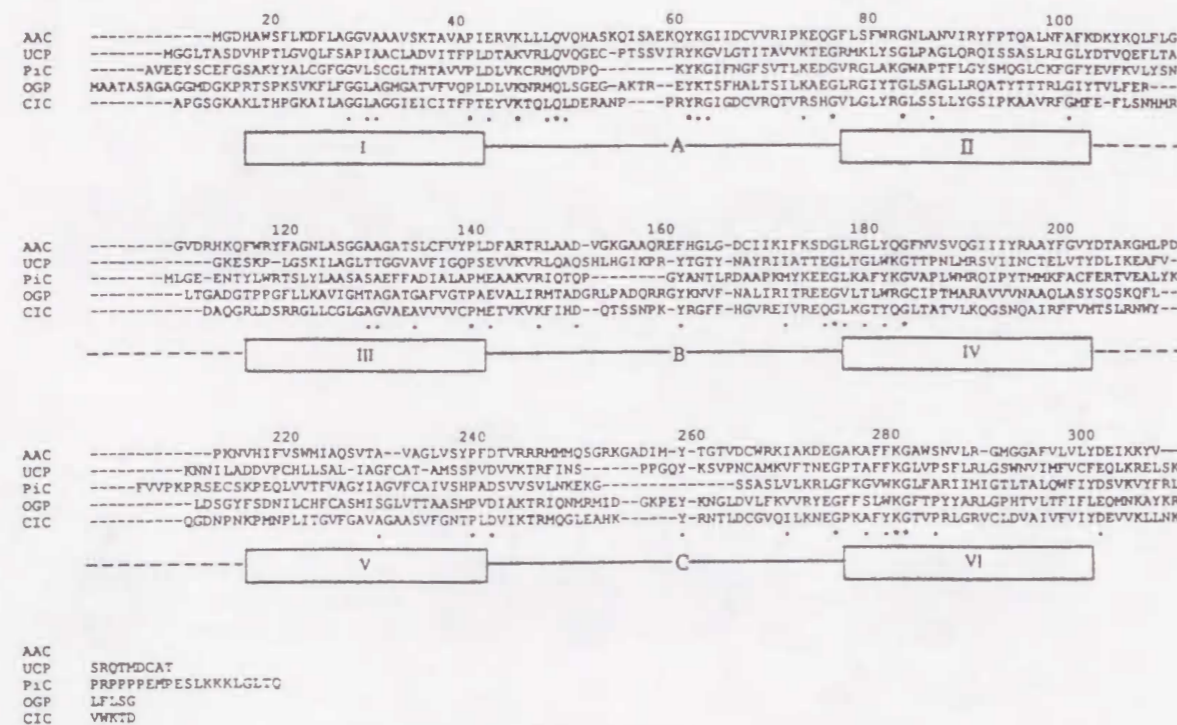


図1-2ミトコンドリア溶質輸送担体間のアミノ酸配列比較 [2]

AAC:ヒト1型ADP/ATP透過担体, UCP:ヒト1型脱共役タンパク質, PiC:ヒトリン酸輸送担体A型, OGP:ヒト2-オキソグルタル酸輸送担体, CIC:ラットクエン酸輸送担体を示す。アスタリスクは全てで保存されていた配列、ドットは性質が保存された配列を示す。

1998年までに各輸送担体のアイソフォームや機能的に未知のタンパク質を含め、実に250を超えるミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーと思われる遺伝子又はcDNAがクローニングされている [6]。特に、1996年に出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*のゲノムの全塩基配列が公開されて以後 [7]、共通配列をモチーフとした遺伝子検索から酵母ゲノム中から35のミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーと思われる遺伝子が同定された [3, 4]。更に、遺伝子破壊法や発現クローニング解析の結果、このうち少なくとも28の遺伝子は何らかの物質の溶質輸送担体であることが確認されている [3, 4]。これらの知見は、更にファミリーに属する未知の輸送担体が酵母内に存在すること意味し、ミトコンドリアにおける複雑な物質輸送のほとんどが、共通の特徴を有したこのファミリーに属するタンパク質群によって担われていることを強く示唆した。また、これらのうちのひとつの輸送担体についてその構造と機能を解析することは、他の輸送担体に対しても有用な知見となり、ミトコンドリアの物質輸送様式の全容を解明することに繋がると考えられる。

1.3 ADP/ATP透過担体

ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーのひとつであるADP/ATP透過担体 (ADP/ATP carrier, adenine nucleotide translocator) は、酸化リン酸化によって生成したATPを細胞質側へ、ATP合成の基質となるADPをマトリックス側へと交換輸送を行う輸送担体である [8]。ADP/ATP透過担体のアミノ酸配列は、1982年にAquilaらによりウシ心筋ミトコンドリアで初めて決定され、297個のアミノ酸からなることが明らかとなった [9]。以後、アカバシカビ [10]、酵母 [11-13]、ヒト [14]、ラット [15] 等でも、次々とcDNAがクローニングされており、1998年12月までにアイソフォームを含め36種のADP/ATP透過担体がクローニングされている [6]。これらはいずれも約300個のアミノ酸からなり、各アイソフォーム間でのホモロジーも非常に高い [16]。この輸送担体は、ウシ心筋ミトコンドリア中の全タンパク質に対して10% (w/w) と、他の輸送担体と比較しても極めて多量に含まれており [17,18]、現在、最も機能及び構造の研究が進んでいる溶質輸送担体である。

1.3.1 機能的特徴

ADP/ATP透過担体は、高い基質特異性を有しADP, ATP以外のヌクレオチドは輸送しない [8]。更に特徴的なことに、各種ATPaseの加水分解にはMg²⁺イオンが必要であるのに対し、ADP/ATP透過担体の基質輸送に際してはMg²⁺イオンを必要としない [18]。また、ミトコンドリアが膜電位を生じているとき、ADPがマトリックス側へ、ATPが細胞質側へと選択的に交換輸送されるのに対し、脱共役剤等によりミトコンドリアが膜電位

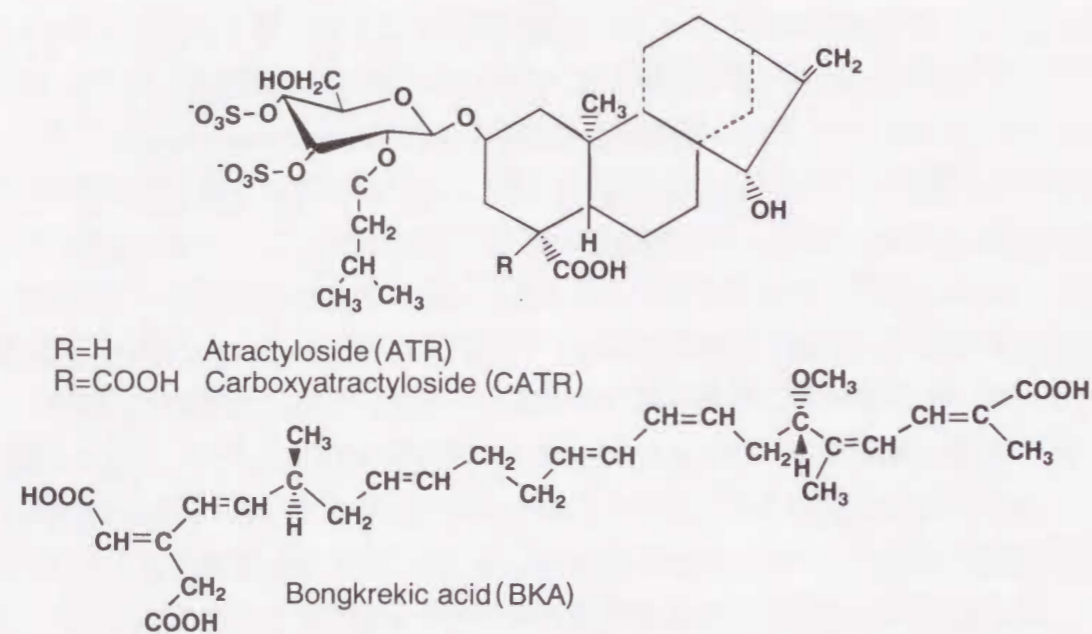


図1-3 ATR, CATR, BKAの構造

を失ったときには、ADP, ATPの輸送は等価になり、ADP/ADP, ATP/ATPの交換輸送も生じる [19]。以上のことから、ADP/ATP透過担体は基本的にはADPとATPを等しく輸送すると結論されている [19]。膜電位消失状態におけるADP, ATPの輸送については K_m 値も明らかになっており、その値はともに約 10^{-6} Mである [20]。

ADP/ATP透過担体には、特異的な2種類の阻害剤があることが知られている。これらの構造式を図1-3に示す。アトラクチロシド *atractyloside* (ATR) は膜不透過性で、細胞質側から透過担体に作用し、その K_i は約 10^{-7} Mである。ATRにカルボキシ基を付加したカルボキシアトラクチロシド *carboxyatractyloside* (CATR) は更に阻害活性が強く、その K_i は約 10^{-9} Mである。一方、ボンクレキン酸 *bongkreic acid* (BKA) は膜透過性で、マトリックス側から透過担体に作用し、その K_i はADP/ATP存在下で約 10^{-8} Mである [20]。

この特異的阻害剤の発見より、その後のADP/ATP透過担体の機能と構造の研究は飛躍的に前進した。Klingenbergらは、ADP/ATP透過担体の基質及び阻害剤の結合部位が、それぞれ細胞質側、マトリックス側に1ヶ所ずつ存在し、それぞれが両側から同時に結合できずどちらか一方からだけ結合でき、かつ結合にアロステリックな効果は見られないことを示した [8]。このことからKlingenbergらは、ADP/ATP透過担体では、基質が基質結合部位に結合し輸送されると基質結合部位も反対側を向き、その結果、反対側からの基質の結合が可能となり、この連続により交換輸送が行われるという、“single-binding center-gated pore model”を提唱した(図1-4) [8]。更に、ミトコンドリアを超音波処理し調製した反転膜小胞にはATRが結合しないこと [21]、各阻害剤結合後にミトコ

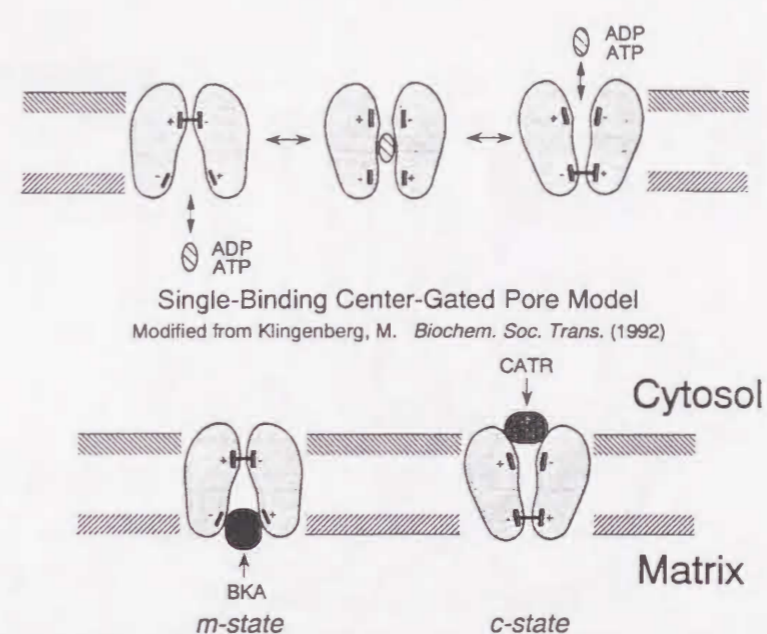


図1-4 ADP/ATP透過担体の輸送様式モデルと阻害剤の結合様式

ンドリアよりトリトン X-100で可溶化、精製したADP/ATP透過担体では、トリプシンに対する反応性が異なること [22] などから、基質結合部位が細胞質側を向いた状態 (c-state) とマトリックス側を向いた状態 (m-state) では透過担体のコンホメーションが非対称であるとし、基質輸送に伴ってこの両コンホメーション間の構造転移が起こると考えた(図1-4) [22, 23]。それ以後、特異的抗体 [24]、ピリドキサーリン酸 [25]、基質の蛍光性アナログ [26, 27]、プロテアーゼ [28, 29]、SH試薬 [30, 31] に対する反応性の違いからもこのような機構が確認されている。

1.3.2 構造的特徴

ADP/ATP透過担体の膜内構造は、ハイドロパシー解析の結果その一次構造中に5もしくは6ヶ所の疎水性領域を有することから、5または6回膜を貫通した構造であると推測された [9]。その後、膜貫通構造については化学修飾 [25] やフォトアフィニティラベリング [32-34]、プロテアーゼ [28, 29] などを用いた様々なアプローチにより解析が行われてきたが、はっきりとした結論は得られていなかった。しかし、1993年に真島らにより、ウシ心筋ADP/ATP透過担体の親水性領域に存在する3つのシステイン残基がすべてマトリックス側に位置することが明らかにされて以後、ADP/ATP透過担体は6回膜貫通構造であると結論されている(図1-5) [35]。

ADP/ATP透過担体の機能単位は、沈降平衡法より求めた分子量が約65,000とSDS-PAGEから求めた32,000のおよそ2倍であったことや [36]、特異的阻害剤CATRの結合量が透過担体当たり0.5分子であったこと [37] から2量体であると考えられているが、他に

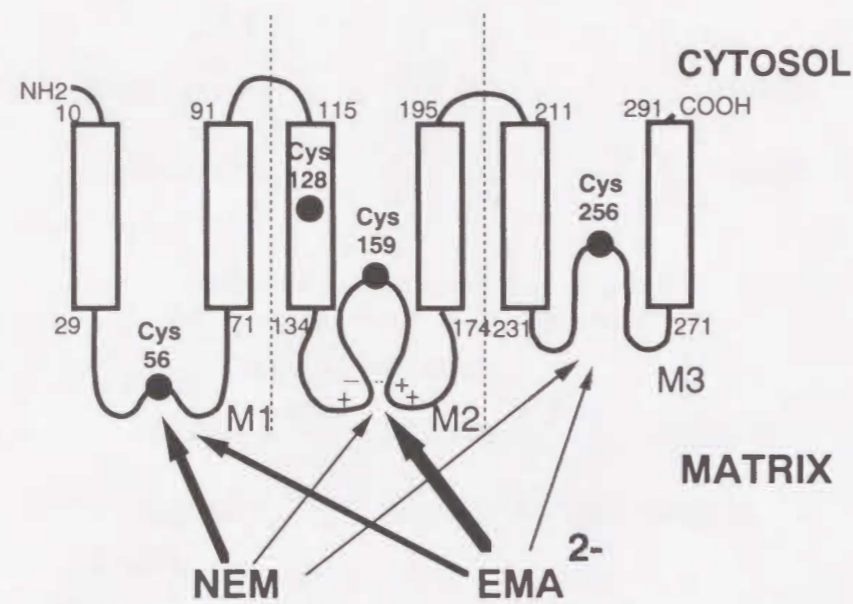


図1-5ウシ心筋ADP/ATP透過担体の6回貫通構造モデル [35]

も単量体 [38] もしくは4量体 [39] という説もあり詳細は定かではない。

1.3.3 機能構造と基質結合部位

タンパク質中のシステイン残基は修飾試薬による選択的修飾が可能であり、反応様式や性質の違うSH基修飾試薬が多数存在することから、化学修飾の格好の標的となる。ウシ心筋ミトコンドリアのADP/ATP透過担体には4個のシステイン残基 (Cys⁵⁶, Cys¹²⁸, Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶) が存在する。図1-5にはADP/ATP透過担体中でのシステイン残基の存在位置を示す。このうちほぼ100残基ごと等間隔で存在するCys⁵⁶, Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶は各親水性領域中に存在し、いままで明らかとなったほ乳動物のすべてのADP/ATP透過担体で完全に保存されている [16]。

真島らはこれらシステイン残基に着目し、図1-6に示す膜不透過性SH試薬エオシン5-マレイミド eosin-5-maleimide (EMA) と膜透過性SH試薬N-エチルマレイミド N-ethylmaleimide (NEM) の反応性の異なるSH試薬のウシ心筋ADP/ATP透過担体に対する標識反応を解析した [35]。その結果、EMAはCys¹⁵⁹をNEMはCys⁵⁶をそれぞれ選択的に標識し、それに伴ってADP/ATP透過担体の透過活性を阻害することが明らかとなった [35]。更にEMA, NEM に対する各システイン残基の反応性の違いから、図1-5に示すような6回貫通モデルを提唱した [35]。これによると、SH試薬の種類と無関係に同様の反応性を示すCys⁵⁶付近がマトリックス側に露出し、他の Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶はともにより膜内部に存在することが示唆された [35]。更にその後、NEM, EMAの各システイン残基に対する反応性がADP/ATP透過担体のコンホメーションに応じて変化することが明らかとなった [40]。つまり、基質輸送に応じて各システイン残基を含む親水性のループ (M1, M2, M3) がその

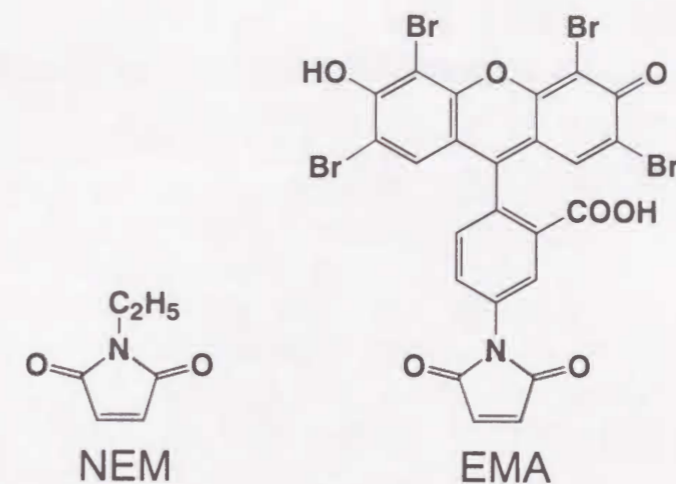


図1-6 NEM及びEMAの構造

立体配置を変化させていると考えられ、これら親水性ループの基質輸送への関与が示唆された [30]。

更に、真島らは最近EMAからマレイミド基を除去したエオシン-Y eosin-Yが、マトリックス側からのADP/ATP透過担体への基質の結合を拮抗的に阻害することを見いだした [40]。この結果より、EMAはそのエオシン部位がADP/ATP透過担体に基質様の認識を受けた後、Cys¹⁵⁹に結合することが明らかとなり、現在、Cys¹⁵⁹を含むループM2がADP/ATP透過担体の主たる基質認識部位ではないかと考えられている [40, 41]。実際、ループM2はアジド化されたADP [32] やATR [34] の結合部位を含むことから、single-binding center-gated pore model [8] に基づけばループM2を基質結合部位と考えるのは妥当である。

1-4 研究の目的

以上記述したように、ADP/ATP透過担体の輸送機能発現に親水性のループが関与することが示唆されている。しかし、ループの具体的な立体配置や機能的役割についてはいまだ不明な点が多く、この点を解明していくことがADP/ATP透過担体の輸送機構を明らかにすることにつながると考えられる。本研究では、まずシステイン残基特異的な化学架橋試薬を用いて、各ループの立体配置及び基質輸送に伴ったループの立体構造変化の機構、ADP/ATP透過担体の機能単位について検討した (第2, 3章)。更に、本研究で初めて確立したウシ心筋ADP/ATP透過担体の酵母ミトコンドリアにおける機能的発現系 (第4章) を用いた部位特異的変異体解析により、基質輸送に伴った大幅な立体配置変化

が認められたループM1 (第5章) 及び基質結合部位であるループM2 (第6章) 中の透過機能に
関与するアミノ酸残基の同定を行った。

以上の結果から、ADP/ATP 透過担体の機能発現におけるこれら親水性ループの構造
と機能的役割について解析した。そして得られた知見をミトコンドリア溶質輸送担体フ
ァミリー全体の機能解明に結びつけて考察する。

1.5 参考文献

- [1] Zalmann, L.S., Nikaido, H., and Kagawa, Y., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1771-1774
- [2] Pederson, P.L., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 431-434
- [3] Nelson, D.R., and Felix, C.M., and Swanson, J.M., (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 285-308
- [4] Mayor, J.A., and Kakhniashvili, D., Gremse, D.A., Campbell, C., Krämer, R., Schoroers, A.,
and Kaplan, R.S., (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 541-547
- [5] Palmieri, F., (1994) *FEBS Lett.* **346**, 48-54
- [6] テネシー大学メンフィス校生化学部門 D.R. Nelson 博士のホームページより引用
(<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>)
- [7] *Saccharomyces* ゲノムデータベース (<http://genome-www.stanford.edu/>)
- [8] Klingenberg, M., (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A.N., Eds),
Plenum Publishing Corp., New York, Vol. 3, pp. 383-438
- [9] Aquia, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M., (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem.* **363**, 345-349
- [10] Arends, H., and Sebald, W., (1984) *EMBO J.* **3**, 377-382
- [11] Adrian, G.S., McCammon, M.T., Montgomery, D.L., and Douglas, M.G., (1986) *Mol. Cell.
Biol.* **6**, 626-634
- [12] Lawson, J.E., and Douglas, M.G., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14812-14818
- [13] Kolarov, J., Kolarova, N., and Nelson, N., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12711-12716
- [14] Battini, R., Ferrali, S., Kaczmarek, L., Calabretta, B., Chen, S., and Baserga, R., (1987) *J.
Biol. Chem.* **262**, 4355-4359
- [15] Shinohara, Y., Kamida, M., Yamazaki, N., and Terada, H., (1993) *Biochim. Biophys. Acta.*
1152, 192-196
- [16] Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin,
G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [17] Brandlin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V., (1993) *J.
Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [18] Klingenberg, M., (1980) *J. Membrane Biol.* **56**, 97-105
- [19] Krämer, R., (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **592**, 615-620
- [20] Stubbs, M., (1981) in *Inhibitors of Mitochondrial Functions* (Erecinska, M., and Wilson, D.F.,
Eds) Pergamon Press, Oxford, pp. 283-304
- [21] Klingenberg, M., (1977) *Eur. J. Biochem.* **76**, 553-565
- [22] Aquia, H., Eiermann, W., Babel, W., and Klingenberg, M., (1978) *Eur. J. Biochem.* **85**,
549-560
- [23] Klingenberg, M., Riccio, P., and Aquila, H., (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **503**, 193-210
- [24] Buchanan, B.B., Eiermann, W., Riccio, P., Aquila, H., and Klingenberg, M., (1976) *Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2280-2284
- [25] Bogner, W., Aquia, H., and Klingenberg, M., (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 611-620
- [26] Block, M.R., Boulay, F., Brandolin, G., Dupont, Y., Lauquin, G. J.-M., and Vignais, P.V.,
(1986) *Methods Enzymol.* **125**, 639-649
- [27] Klingenberg, M. (1986) *Methods Enzymol.* **125**, 618-630
- [28] Brandolin, G., Marty, I., Dalbon, P., and Vignais, P.V., (1989) *Biochemistry* **28**, 1093-1100
- [29] Marty, I., Brandlin, G., Gagnon, J., Brasseur, R., and Vignais, P.V., (1992) *Biochemistry* **31**,
4058-4065

- [30]Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
- [31]Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y. and Terada, H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554
- [32]Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J., and Vignais, P.V., (1988) *Biochemistry* **27**, 5141-5149
- [33]Mayinger, P., Winkler, E., and Klingenberg, M., (1989) *FEBS Lett.* **244**, 421-426
- [34]Boulay, F., Lauquin, G. J. M., Tsugita, A. and Vignais, P.V., (1983) *Biochemistry* **22**, 477-484
- [35]Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Sinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **269**, 22181-22187
- [36]Ricco, P., Aquia, H., and Klingenberg, M., (1975) *FEBS Lett.* **56**, 133-138
- [37]Hackenberg, H., and Klingenberg, M., (1980) *Biochemistry* **19**, 548-55
- [38]Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1171-1182
- [39]Block, M.R., and Vignais, P.V., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 369-376
- [40]Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
- [41]Terada, H., and Majima, E., (1997) *Progr. Colloid Polym. Sci.* **106**, 192-197

第2章

銅オルトフェナンスロリン錯体を用いた ADP/ATP 透過担体の多量体構造の解析

2.1 緒言

ADP/ATP 透過担体は、ミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を司る膜タンパク質である。ADP/ATP 透過担体は、生物種を問わず全て約 300 個のアミノ酸残基から成りなり [1-3]、その一次構造には、約 100 残基毎に相同性の高い領域が 3 回繰り返されているという特徴がある [4, 5]。加えて、ハイドロパシー解析の結果、各繰り返しは 2 カ所の膜貫通領域と思われる疎水領域とそれを結ぶ親水性領域からなることから [4, 5]、ADP/ATP 透過担体の膜内構造として 6 回膜貫通構造モデルが提唱された [5]。真島らはウシ心筋 ADP/ATP 透過担体において各繰り返しの親水性領域にシステイン残基がひとつずつ存在する (Cys⁵⁶, Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶) ことに着目し、これらシステイン残基の SH 試薬に対する反応性を解析した結果、これらシステイン残基が全てマトリックス側に位置することを見出し、6 回膜貫通モデルが妥当であることを証明した (図 2-1) [6]。この膜内構造に於いて、これらシステイン残基はマトリックス側の親水性ループ (M1, M2, M3) のほぼ中央にそれぞれ位置している。更に、これらシステイン残基の SH 試薬に対する反応性が異なることから [6]、各ループの存在状態が各々で異なることが示唆されたがその詳細は不明である。

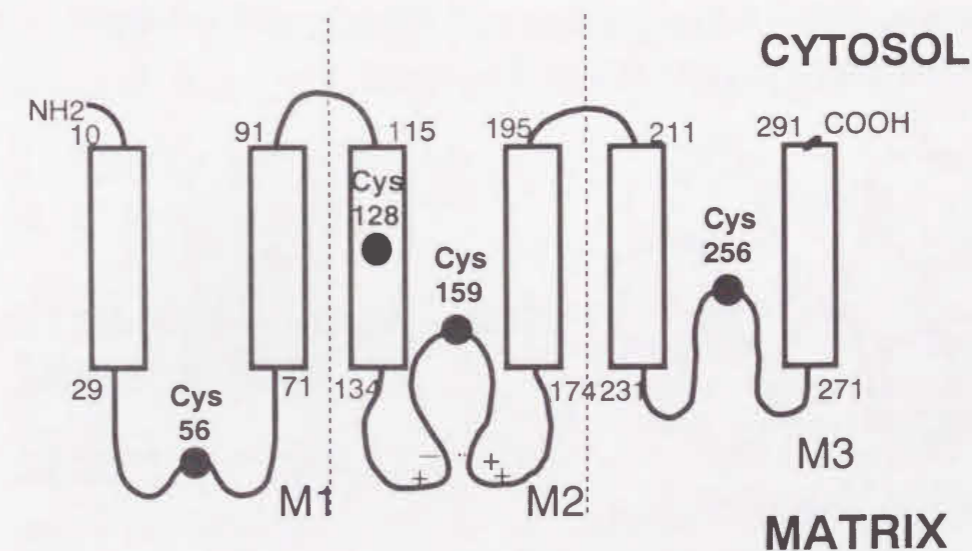


図 2-1 ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の 6 回膜貫通構造モデル [6]

タンパク質の機能構造を解析する上で、そのタンパク質の機能単位を明らかにすることは重要である。ADP/ATP 透過担体の場合、ミトコンドリアより精製した ADP/ATP 透過担体の沈降平衡法による分子量推定 [7] や、特異的阻害剤の結合解析 [8] などの結果から、その機能単位は 2 量体であると考えられている [1, 2]。その一方で、ADP/ATP 透過担体の機能単位については、単量体 [9] や 4 量体 [10] である可能性も報告されており、明確な回答は得られていない。

タンパク質のトポロジーや多量体構造を解析する上で、化学試薬による架橋反応の解析は非常に有効な手段である [11]。図 2-2 に示す銅オルトフェナンスロリン錯体 (Cu(OP)_2) は、酸化触媒反応によって近接した SH 基間でジスルフィド結合を形成させるシステイン残基間特異的な架橋試薬であり、現在まで様々なタンパク質の構造機能解析に使用されている [12-15]。Zimmer らは、ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) から精製したオリゴマイシン感受性 ATPase に対する Cu(OP)_2 の作用を検討したところ、約 31 kDa のタンパク質が顕著に修飾されることを見出した [16, 17]。後に、Joshi と Torok はこのタンパク質が混入した ADP/ATP 透過担体であることと、ADP/ATP 透過担体は Cu(OP)_2 によって分子内架橋と分子間架橋の両方を生じるが、分子内架橋が優位であることを明らかにし [18]、更に後の解析ではその架橋部位が Cys¹⁵⁹ と Cys²⁵⁶ であることを提唱した [19]。

本章では、ADP/ATP 透過担体のトポロジー及び多量体構造を解明する目的で、BHM 及びその反転膜小胞中の ADP/ATP 透過担体に対する Cu(OP)_2 の影響について検討した。その結果、 Cu(OP)_2 をマトリックス側から作用させると、過去の報告 [18, 19] と異なると、ADP/ATP 透過担体分子間の架橋が優位に形成されることが明らかとなった。更にその架橋部位を解析したところ Cys⁵⁶ 同士であった。以上の結果に基づき、ADP/ATP 透過担体の機能構造について考察する [20]。

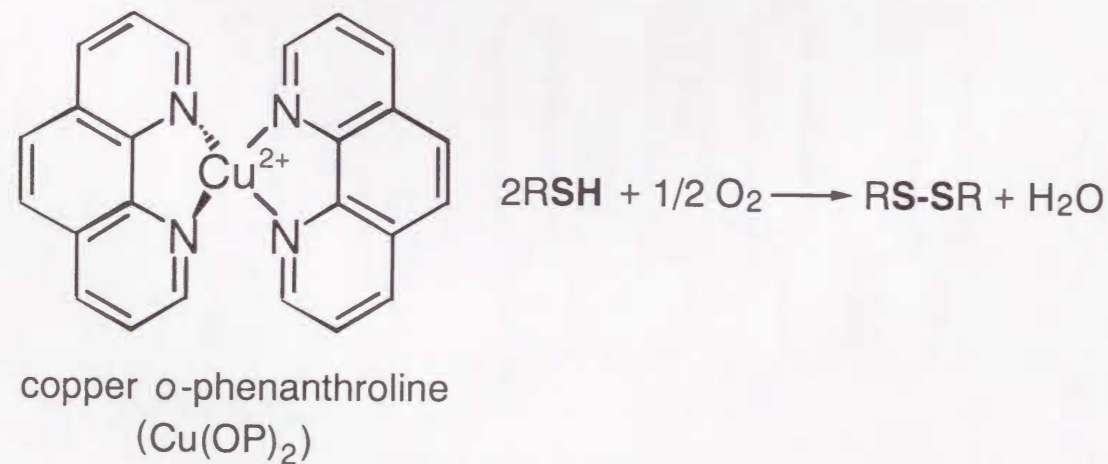


図 2-2 銅オルトフェナンスロリンの構造

2.2 結果

2.2.1 銅オルトフェナンスロリンによる ADP/ATP 透過担体分子間架橋の形成

まず、銅オルトフェナンスロリン (Cu(OP)_2) による ADP/ATP 透過担体のシステイン残基の酸化反応について検討した。ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) から調製した反転膜小胞 (submitochondrial particles : SMP) に種々の濃度の Cu(OP)_2 を 0 °C, pH 7.4 にて 10 分間作用させた後、非還元条件下で SDS-PAGE に供し、タンパク質を分離した。図 2-3 にはそのゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色した結果を示す。ADP/ATP 透過担体のバンドであることが既に同定されている [6] 30 kDa のバンド (AAC で示す) は、 Cu(OP)_2 の濃度依存的に顕著に減少し 400 μM においてはほとんど消失した。その一方で、 Cu(OP)_2 を処理することにより約 60 kDa の位置に新たなバンドが出現し、その量は Cu(OP)_2 処理濃度依存的に増加した。60 kDa のバンドは、AAC バンドと同様に抗 ADP/ATP 透過担体抗体と反応した (図 2-4)。また、還元剤 2-メルカプトエタノール (2-ME) を作用させると、この 60 kDa バンドは消失し、AAC のバンド量が回復した (図 2-6)。以上の結果から、この 60 kDa バンドは、ADP/ATP 透過担体が Cu(OP)_2 により分子間架橋されて生じたバンドであると結論した。更に、SH 試薬である *N*-エチルマレイミド (NEM) を前処理した SMP では Cu(OP)_2 による 60 kDa バンドの形成は完全に阻害されたことから、この架橋にシステイン残基が関与していることが確認された (図 2-6)。また、50 μM 以上の Cu(OP)_2 を作用させた場合、約 28 kDa の位置に抗 ADP/ATP 透過担体抗体により免疫染色される薄いバンドが検出された (図 2-4B)。このバンドも 2-ME 処理により消失することから (データは示さない)、このバンドが過去に報告された [18] 分子内架橋された ADP/ATP 透過担体のバンドではないかと考えられる。なお、以後 60 kDa の分子間架橋された ADP/ATP 透過担体のバンドを (AAC)₂、

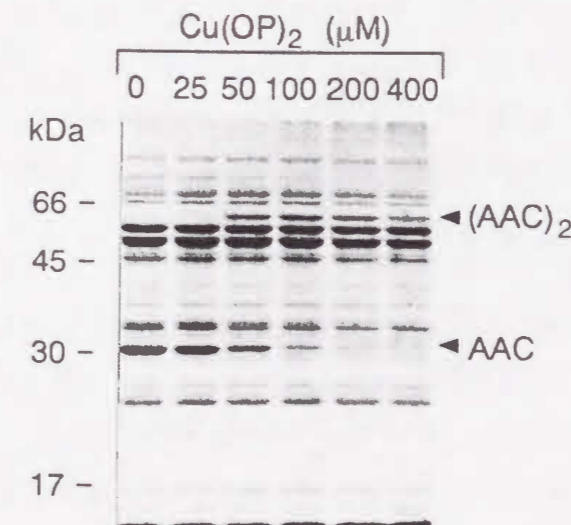


図 2-3 ウシ心筋ミトコンドリア SMP 対する Cu(OP)_2 の影響

ウシ心筋ミトコンドリアの反転膜小胞 (SMP) 4 mg of protein/mL を所定濃度の Cu(OP)_2 と 0 °C, pH7.4 の条件下で 10 分間反応させた。5 mM EDTA 及び 5 mM NEM を添加して反応を停止させた後、10 μg タンパク質を非還元条件下の SDS-PAGE に供した。ゲル中のタンパク質はクマシーブリリアントブルー R-250 を用いて染色した。

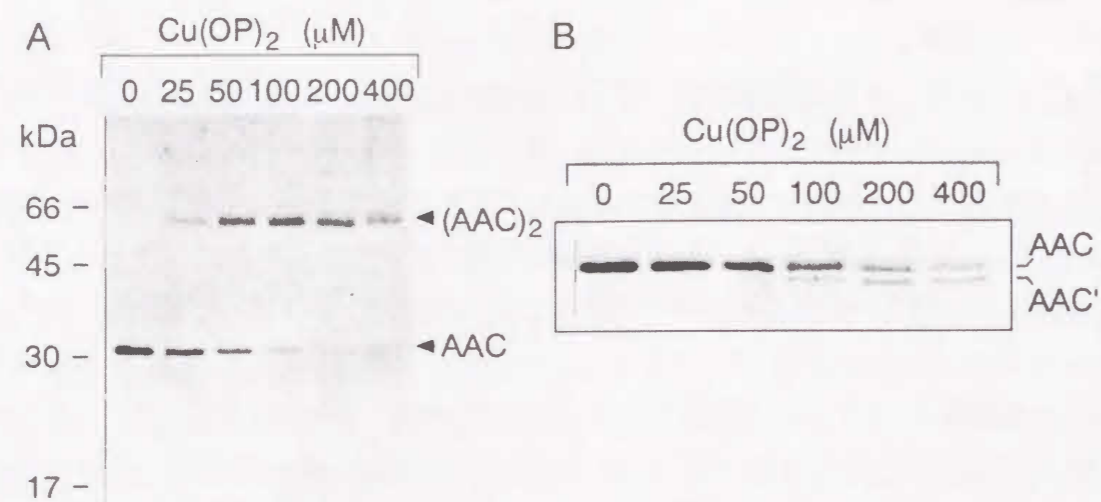


図 2-4 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ で処理した SMP の抗 ADP/ATP 透過担体抗体による免疫染色

図 2-3 の条件で反応させた SMP を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に転写した。その後膜をウサギ抗ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体抗血清(1000 倍希釈)を用いた免疫染色を行った (実験方法の項参照)。

28 kDa の分子内架橋された ADP/ATP 透過担体のバンドを AAC' とそれぞれ表記する。

処理を行った $\text{Cu}(\text{OP})_2$ の濃度変化に伴う各 ADP/ATP 透過担体量の変化を、図 2-4 の結果をもとに各バンドの免疫染色強度を測定することで求めた (図 2-5)。 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ の濃度上昇に伴い、AAC 量は 100 μM までは急激に減少し、更に $\text{Cu}(\text{OP})_2$ が高濃度になるとこの現象は緩やかなものに転じ、400 μM ではその約 90 % が消失していた。一方、100 μM まではこの AAC の減少に応じて、 $(\text{AAC})_2$ は急激に増加し、最大で約 60 % の AAC が $(\text{AAC})_2$ に移行した。しかしながら、100 μM より高濃度になると $(\text{AAC})_2$ の量は緩やかに減少した。100 μM 以上の $\text{Cu}(\text{OP})_2$ を作用させた場合の試料で SDS-PAGE を行うと泳動開始点付近に凝集体が残存することから (図 2-3)、この $(\text{AAC})_2$ の減少は、非特異的な凝集体の形成に起因していると思われる。 $(\text{AAC})_2$ とは対照的に AAC' は、高濃度の $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 濃度を作用させてもほとんど形成されず、400 μM 以上作用させても AAC 量の約 10 % 程度しか生じなかった。これらの結果は、SMP 中ではまず ADP/ATP 透過担体の分子間架橋が形成され、次いで 2 次的に高分子上の多架橋凝集体が形成されることが明らかとなった。また、この間に ADP/ATP 透過担体の分子内架橋も形成されるが、それは非常に微量であることも見いだされた。

なお、ウシ心筋ミトコンドリアを試料として、100 μM $\text{Cu}(\text{OP})_2$ で、0 °C, pH 7.4 の条件下で 60 分間反応させても 30 kDa の AAC バンドに変化は観察されなかった。 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ は低温条件下では膜不透過性であるとされていることから [14, 21]、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ はマトリックス側から ADP/ATP 透過担体に作用していると考えられる。加えて、反応条件を過

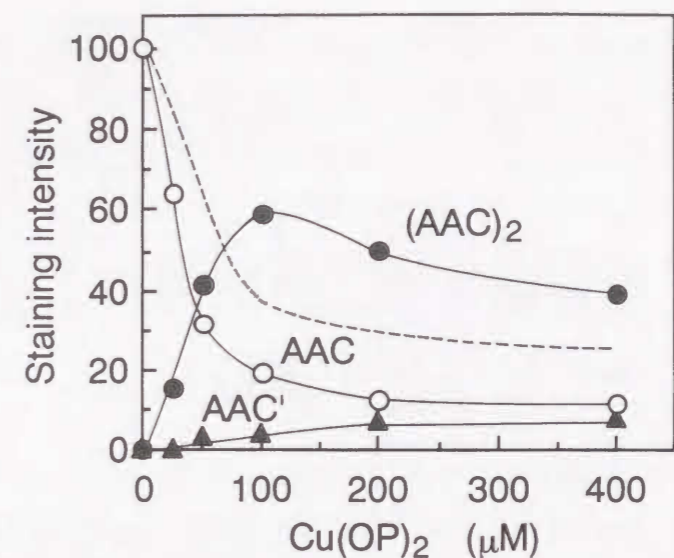


図 2-5 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ で処理による ADP/ATP 透過担体架橋反応の推移

図 2-2 における各バンドの免疫染色強度をデンシトメーターにより 510 nm の吸光度を測定することで求めた。標準として、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 未反応時の 30 kDa AAC バンドの染色強度を 100 とした。点線は、560 nm における CBB 染色強度により求めた AAC バンド量の推移を示している。

去の報告 [16-19] に基づいて、25 °C, pH 8.0 として、SMP に 100 μM $\text{Cu}(\text{OP})_2$ を作用させると 60 kDa バンドの生成は観察されず、高分子凝集体と AAC' の生成が観察されたことから、緩やかな反応条件下においてのみ分子間架橋体 $(\text{AAC})_2$ は形成が観測されることが見いだされた。

2.2.2 ADP/ATP 透過担体の存在状態に応じた $\text{Cu}(\text{OP})_2$ による架橋反応

2.2.1 の結果より、ミトコンドリア膜中に存在する ADP/ATP 透過担体では、マトリックス側から $\text{Cu}(\text{OP})_2$ を処理することにより分子間架橋が形成されることが明らかとなった。このような分子間架橋形成と ADP/ATP 透過担体の膜内構造との関係を解明する目的で、様々な存在状態の ADP/ATP 透過担体に対する $\text{Cu}(\text{OP})_2$ の架橋形成反応について検討した。まず、3 % 非イオン性界面活性剤トリトン X-100 (TX-100) で 0 °C にて SMP を可溶化した後、100 μM $\text{Cu}(\text{OP})_2$ を 10 分間反応させた。TX-100 はミトコンドリアから ADP/ATP 透過担体を精製する際に用いる界面活性剤であり、トリトンミセル中に可溶した ADP/ATP 透過担体をリポソーム膜中に活性型として再構成することができるので [8]、ミセル中の ADP/ATP 透過担体は、膜内構造をほぼ維持していると考えられている [8]。しかし、TX-100 で可溶化された ADP/ATP 透過担体では、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 処理によって 60 kDa のバンドは出現せず、代わりに 30 kDa の AAC バンドの減少に伴って 28 kDa の AAC' のバンドが増加した (図 2-6, TX-100)。更に SMP を 1 % SDS で可溶化した後、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 処理を行った場合 (図 2-6, SDS) では、AAC バンドの減少に伴って AAC' バンドとは明らかに区別できる 29 kDa の位置にバンドがシフトした。これらの結果から、

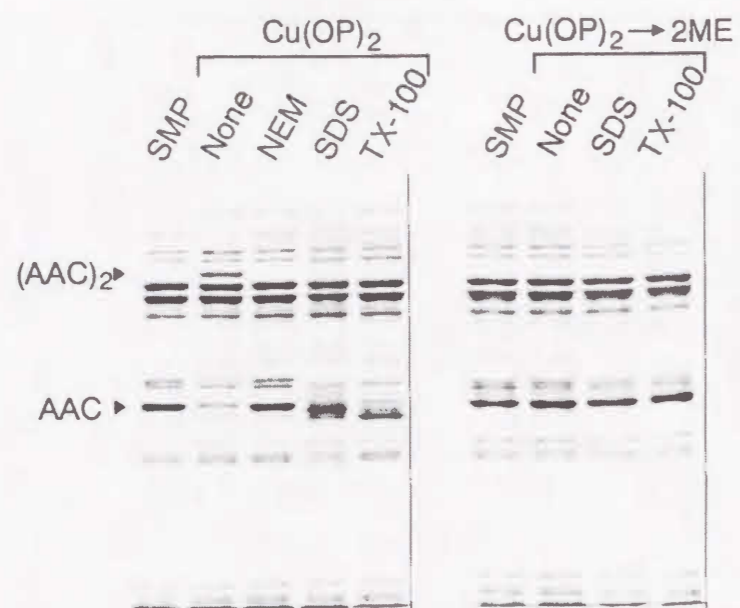


図 2-6 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ による ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応に対する各種試薬の影響

20 mg of protein/mL の SMP を 2 mM NEM で 0°C , pH 7.2 で 10 分間反応させた後、架橋反応を行った。界面活性剤の影響として、1% SDS 又は 3% トリトン X-100 で 0°C , 10 分間処理し可溶化された SMP を用いて架橋解析を行った (それぞれ SDS, TX-100)。左のパネルは非還元条件下で、右のパネルは、試料を 2-ME で処理し還元状態でそれぞれ SDS-PAGE を行った場合の CBB 染色像を示す。

ADP/ATP 透過担体の存在状態の違いにより生じた立体構造の違いによって、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ による架橋部位が全く異なってくるということが明らかとなった。

2.2.3 ADP/ATP 透過担体の分子間架橋形成に關与するシステイン残基の同定

最後に、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ による ADP/ATP 透過担体に關与するシステイン残基の同定を逆相 HPLC を使用して行った (図 2-7)。100 μM $\text{Cu}(\text{OP})_2$ と 20 分間反応させた SMP から、定法 [6, 20] に従って ADP/ATP 透過担体を精製した。この際、AAC 及び $(\text{AAC})_2$ が、共に精製されていることを SDS-PAGE にて確認した。この精製品をグアニジン塩酸で変性させた後、NEM と反応させた。これにより、ジスルフィド結合を形成していないシステイン残基は全て NEM により修飾された。次に、ゲル濾過により AAC と $(\text{AAC})_2$ を分離し、ジチオスレイトール (DTT) にて還元した後、ヨードアセトアミドと反応させた。これにより、ジスルフィド結合を形成していたシステイン残基が還元され、カルボキサミドメチル (CAM) 化された。なお、以上の処理を行った AAC 及び $(\text{AAC})_2$ 試料をそれぞれ RC-AAC, RC- $(\text{AAC})_2$ と称する。最後に、これら処理後の試料をリジルエンドペプチダーゼで断片化し、得られたペプチドを逆相 HPLC にて分離した。

図 2-7 にはその溶出プロファイルを示す。 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 未処理の ADP/ATP 透過担体を精製し、変性及び還元処理をした後、NEM 又はヨードアセトアミドで処理した試料

(RNEM, RCAM) を断片化し、逆相 HPLC にて分離し両者を比較したところ、溶出位置の異なる 4 種のピークが検出された。これら 4 種のピークはシステイン残基を含むペプチドであり、修飾基の違いから溶出位置が変化したと考えられる。真島らは、これらピークに相当するペプチド断片のアミノ酸分析を行い、これらペプチドが溶出順に Gly¹⁴⁷ - Lys¹⁶², Gly²⁴⁵ - Lys²⁵⁹, Gln⁴⁹ - Lys⁶², Gln¹⁰⁷ - Lys¹⁴⁶ に相当する断片であり、それぞれ Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶, Cys⁵⁶, Cys¹²⁸ を含むことを明らかにしている [6]。CAM 化されたこれらペプチドをそれぞれ、C159, C256, C56, C128 と、そして NEM 化されたそれらを N159, N256, N56, N128 と称する。

これに基づき、RC-AAC 及び RC- $(\text{AAC})_2$ のペプチド断片の溶出プロファイルを検討した。その結果、RC-AAC の溶出プロファイルは RNEM と全く同じであった。この結果から、AAC 中にはジスルフィド結合は形成されていないことが明らかとなった。また、ADP/ATP 透過担体のミトコンドリア膜内構造において、ジスルフィド結合が形成されていないことが確認できた。一方、RC- $(\text{AAC})_2$ では、N159, N256, N128 のピークが RNEM とほぼ同じピーク高で検出されたのに対し、N56 のピークは全く検出されず、代わりに C56 のピークが RCAM とほぼ同じピーク高で検出された。また、C159 及び

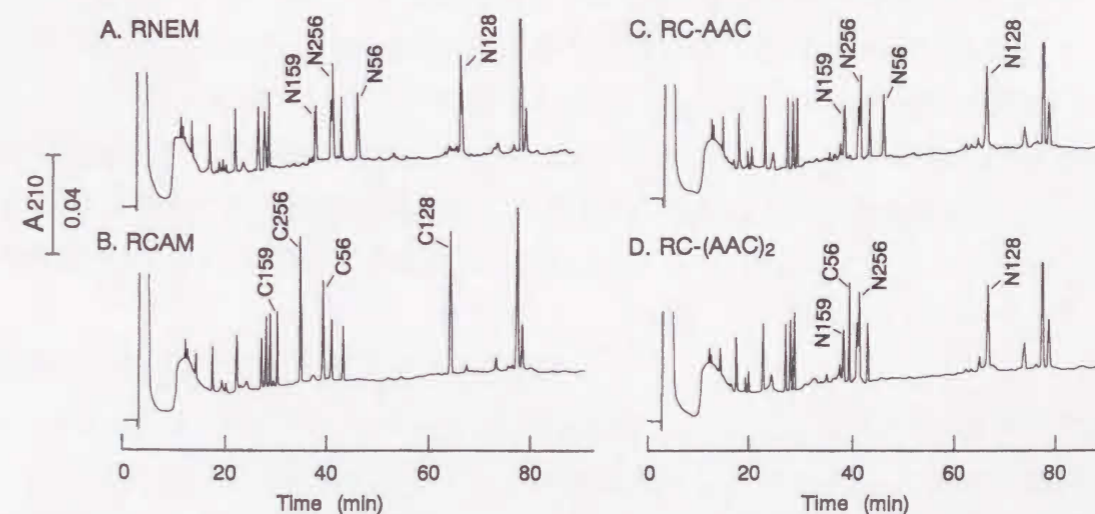


図 2-7 逆相 HPLC による ADP/ATP 透過担体の分子間架橋部位の同定

$\text{Cu}(\text{OP})_2$ 処理後に SMP より単離した 30 kDa AAC 及び 60 kDa $(\text{AAC})_2$ をグアニジン塩酸にて変性した後、非還元条件下で NEM と反応させた。次に、DTT により還元処理した後、ヨードアセトアミドにて還元されたシステイン残基を標識した。これら処理を施したそれぞれの試料 (RC-AAC, RC- $(\text{AAC})_2$) をリジルエンドペプチダーゼにて断片化した後、逆相 HPLC に供した。その溶出プロファイルを波長 210 nm にてモニターした結果を示す。RNEM 及び RCAM は $\text{Cu}(\text{OP})_2$ 未処理の ADP/ATP 透過担体の精製品を還元及び変性処理後、それぞれ NEM 又はヨードアセトアミドと反応させた試料を断片化し、逆相 HPLC に供した結果を示す。N159, N256, N56, N128 は、NEM 化された Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶, Cys⁵⁶, Cys¹²⁸ をそれぞれ含むペプチド断片の溶出ピークを示す。C159, C256, C56, C128 も同様にカルボキサミドメチル化されたシステイン残基を含むペプチド断片の溶出ピークを示す。

C256, C128 は検出されなかった。以上の結果から、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ によって形成された ADP/ATP 透過担体の分子間架橋の架橋部位が Cys^{56} 同士であることが明らかとなった。

2.3 考察

2.3.1 銅オルトフェナンスロリンによるADP/ATP透過担体架橋反応

本章では、ウシ心筋ミトコンドリアSMPを試料として、ADP/ATP透過担体に対する銅オルトフェナンスロリン ($\text{Cu}(\text{OP})_2$) の影響について、 0°C , pH 7.4の条件下で解析した。その結果、 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ を処理することにより、ADP/ATP透過担体分子同士の分子間架橋が進行し、その後2次的に凝集体の生成が起こり、ADP/ATP透過担体の分子内架橋はほとんど生じないことが明らかとなった。過去の報告によると、ウシ心筋ミトコンドリアより精製した H^+ -ATPaseに混入したADP/ATP透過担体を試料とした場合には、分子内架橋のみが優位に生じた [16, 17, 19]。この標品は界面活性剤にて可溶化された状態にあった。図2-6に示すように、ADP/ATP透過担体の膜内構造を保持できると考えられている [8] トリトンX-100にて可溶化した場合でも、分子間架橋の形成は阻害された。この結果から、トリトンX-100に於いて可溶化された状態のADP/ATP透過担体は、不可逆的な変性状態にはないものの、膜内構造とは微妙に異なった構造をとっていることがわかる。また、ウシ心筋ミトコンドリアを細胞破砕機で物理的に断片化し調製する電子伝達系粒子を用いた場合、分子間架橋と分子内架橋が生じた [18]。電子伝達系粒子とSMPは基本的に同じものであると考えられるが [21]、論文18の反応条件は、 23°C , pH 8.0と本研究の条件よりも $\text{Cu}(\text{OP})_2$ の反応性が高い条件で架橋反応が検討されていた。2.2.1にて記述したようにこのような条件では、SMPにおいても分子間架橋よりも非特異的な凝集や分子間架橋の方が進行した。これらの知見から、反応条件を緩和することで $\text{Cu}(\text{OP})_2$ の非特異的な反応性を抑制した本研究の結果の方がよりADP/ATP透過担体の膜内構造を反映していると考えられる。

2.3.2 ADP/ATP透過担体のループの配置

$\text{Cu}(\text{OP})_2$ はウシ心筋ミトコンドリアを試料とした場合、架橋形成を起こさなかった (2.2.1)。 $\text{Cu}(\text{OP})_2$ は膜表面のシステイン残基を酸化し、本研究のような低温条件下では膜透過もしないと考えられていることから [14, 21]、ADP/ATP 透過担体の全てのシステイン残基は細胞質側には露出していないことになる。この知見は過去の報告 [6] と一致する。一方、ミトコンドリア反転膜を試料とした場合、ADP/ATP 透過担体の分子間架橋反応が優位に進行し、その架橋部位は、推定2次構造のマトリックス側第1ループ (M1) 中に存在する Cys^{56} 同士であることが明らかとなった (図2-7)。この結果は、ADP/ATP 透過担体のシステイン残基のなかで Cys^{56} が最もマトリックス側に露出していることを意味している。更に、他の親水性ループ (M2, M3) 中に存在するシステイン残基 Cys^{159} , Cys^{256} がより膜内部に位置していることを示している。しかしながら、微

量の分子内架橋体が形成されたことで、Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶ に対してもマトリックス側から SH 試薬がアクセスできる状態にあると考えられる。以上の結果は、ADP/ATP 透過担体が N, C 両末端を細胞質側に露出させた 6 回膜貫通構造 (図 2-1) であること強く支持した。

2.3.3 ADP/ATP 透過担体の機能単位

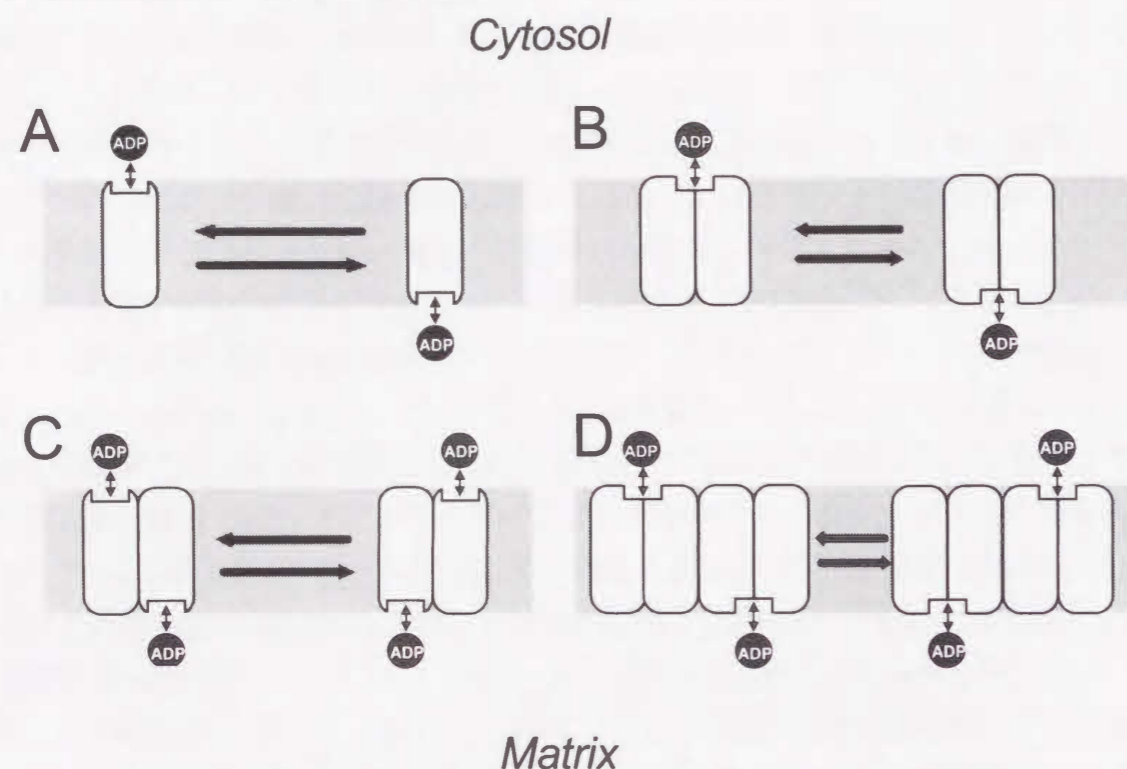


図 2-8 現在までに提唱されている ADP/ATP 透過担体の機能構造モデル

A は単量体モデル [9], B は 2 量体 Ping-Pong 型輸送モデル [24], C は 2 量体 sequential 型輸送モデル, D は 4 量体モデル [10] を示す。丸角の四角形が、ADP/ATP 透過担体 1 分子を示し、その角型のくぼみが基質結合部位を示す。

図 2-8 には、現在までの知見で考えられている ADP/ATP 透過担体の機能単位とその輸送モデルを示す。緒言にて記述したように、ADP/ATP 透過担体の機能単位は、特異的阻害剤カルボキシアトラクチロシド (CATR) の結合量が ADP/ATP 透過担体 1 分子当たり 0.5 分子であったこと [8] やトリトン X-100 で精製した ADP/ATP 透過担体の分子量を沈降平衡法により解析した結果約 65,000 で、SDS-PAGE における移動度から求めた約 32,000 の 2 倍であったこと [7] などから、この透過担体は 2 量体で機能していると考えられている [1, 2]。更に、CATR の結合量やもう一種の特異的阻害剤であるボンクレニン酸 (BKA) の結合量 [22] 及び基質類似物質の結合量 [23] はどれもほぼ同じ値を示すことから、機能単位中の基質結合部位はひとつであると考えられており、Klingenberg らの single-binding center-gated pore model [24] に代表される図 2-8B のよう

な Ping-Pong 型の基質輸送様式 [25] が、現在最も支持されている。その一方で、Vignais らはアジド化 ADP の結合実験 [10] から ADP/ATP 透過担体の基質結合部位には高親和性部位と低親和性部位が存在するとして図 2-8B の 2 量体を 2 つ結合させた sequential 型の基質輸送 [25] を行う 4 量体モデルを提唱した (図 2-8D) [10]。また、Nelson らは、基質のサイズと膜貫通領域で形成される基質の通過路 (pore) のサイズの比較から、6 本の膜貫通ヘリックスに囲まれてできる pore が最も基質サイズに適合するとして図 2-8A のような Ping-Pong 型輸送をする単量体モデル又は 8C の様な sequential 型の輸送を行う 2 量体モデルを提唱した [9]。

本章の結果より、分子間架橋が速やかに進行したことから、ADP/ATP 透過担体 2 分子が常に隣接した状態にあると考えられ、単量体 (8A) では機能しないと考えられる。また、Cys⁵⁶ 同士で分子間架橋形成が生じたことは、両 Cys⁵⁶ が隣接した位置を取り、隣接する ADP/ATP 透過担体 2 分子が共に同じ立体構造をとっていると考えられる。また、Cys⁵⁶ を含むループ M1 は基質輸送に伴ってその立体配置を変化させると考えられていることから [論文 26,27 及び本論文第 3 章参照]、図 2-8C のような 2 量体の sequential 型輸送モデルは成立しないと考えられる。更に、今回微量でも 3 量体ないし 4 量体間での分子間架橋のバンドを検出できなかったことから、2 量体同士が常時隣接した 4 量体モデル (8D) も考えにくい。以上の考察と本章の研究結果から、ADP/ATP 透過担体の機能単位は、図 2-9 に示すような 2 分子の ADP/ATP 透過担体が対称に向かい合い、12 本の膜貫通領域でひとつの pore を形成する 2 量体構造が妥当であると考えられる。加えて、2.3.2 の考察より、Cys⁵⁶ を含むループ M1 のみがマトリックス側に露出し、両分子の Cys⁵⁶ は非常に近接した状態になりうると考えられる。更に、架橋され

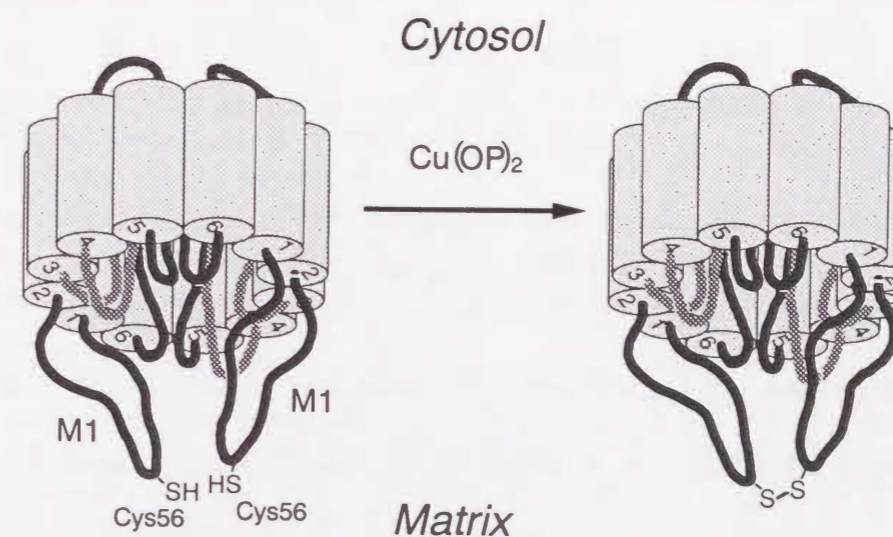


図 2-9 ADP/ATP 透過担体の膜内構造モデル

灰色の円筒が膜貫通領域それを結ぶ線が親水性のループを示している。

なかった Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶ をそれぞれ含むループ M2, M3 は、ループ M1 とは対照的に、それらの位置を pore 内部へ挿入されていると考えられる。特に、ループ M2 は基質の主たる結合部位であることが提唱されており [23, 26]、この考察は妥当であると考えられる。本章の解析結果は、ADP/ATP 透過担体の機能単位を明確にし、更にその機能構造に関しても有用な知見を与えたという点で、非常に意義深いものであると考える。

2.4 参考文献

- [1] Klingenberg, M., (1989) in: *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (A. Azzi, et al. Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 169-181
- [2] Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [3] Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [4] Saraste, M., and Walker, J.E., (1982) *FEBS Lett.* **144**, 250-254
- [5] Walker, J.E., (1982) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 519-526
- [6] Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181-22187
- [7] Riccio, P., Aquia, H., and Klingenberg, M., (1975) *FEBS Lett.* **56**, 129-132
- [8] Hackenberg, M., and Klingenberg, M., (1980) *Biochemistry* **19**, 548-555
- [9] Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1171-1182
- [10] Block, M.R., and Vignais, P.V., (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 369-376
- [11] Kobashi, K., (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 239-245
- [12] Steck, T.L., (1972) *J. Mol. Biol.* **66**, 295-305
- [13] Takeguchi, M., Joshima, R., Inoue, Y., Kashiwagura, T., and Mori, T., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3094-309
- [14] Klingenberg, M., and Appel, M., (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 122-131
- [15] Zhang, Y., and Fillingame, R.H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24609-2461
- [16] Baumert, H.G., Mainka, L., and Zimmer, G., (1981) *FEBS Lett.* **132**, 308-312
- [17] Zimmer, G., Mainka, L., and Heil, B.M., (1982) *FEBS Lett.* **150**, 207-210
- [18] Joshi, S., and Torok, K., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12742-12748
- [19] Torok, K., and Joshi, S., (1985) *FEBS Lett.* **182**, 340-344
- [20] Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554
- [21] 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕造, (1971)ミトコンドリア, 南江堂
- [22] Klingenberg, M., Mayer, I., and Dahms, A.T., (1984) *Biochemistry* **23**, 2442-2449
- [23] Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
- [24] Klingenberg, M., (1976) in : *The Enzymes of Biological Membrane* (Martonosi, A.N., Eds.) Vol. 3, pp 345-349, Plenum, Publishing Corp., New York
- [25] Palmioli, F., Indiveri, C., Bisaccia, F., and Krämer, R., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 525-535
- [26] Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
- [27] Hashimoto, M., Majima, E., Goto, S., Shinohara, Y., and Terada, H., (1999) *Biochemistry* **38**, 1050-1056
- [28] Smith, A. L. (1967) *Methods Enzymol.* **10**, 81-86
- [29] Hansen, M., and Smith, A.L. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 214-222.
- [30] Laemmli, U.K., (1970) *Nature* **227**, 680-685

2.5 実験方法

試薬

CuSO₄ : 和光純薬

o-phenanthroline : 和光純薬

NEM : ナカライテスク

CATR : Sigma

BKA : Delft University of Technology, Prof. Duineより恵与

ウサギ抗ADP/ATP透過担体抗血清 : University of München, Prof. Klingenbergより恵与

ヒドロキシアパタイト : Bio-Rad

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) と垂ミトコンドリア粒子 (SMP) の調製

BHMは摘出直後の新鮮なウシ心臓から、ミトコンドリア調製用溶液 (250 mMショ糖, 1 mMトリスーコハク酸, 0.2 mM EDTA-2Na, 10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.8)) を用いてSmithの方法 [28] に従い単離した。SMPは、HansenとSmithの方法 [29] に従って調製した。凍結保存していたBHMをSMP調製用溶液 (250 mMショ糖, 5 mM ATP, 10 mM塩化マグネシウム, 5 mM塩化マンガン, 10 mM HEPES-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)) で20 mg of protein /mLのタンパク質濃度となるように懸濁した。次に、この懸濁液を超音波処理することでBHMを破碎した。その後、未破碎ミトコンドリアを遠心分離 (35,000 xg, 8分間, 4 °C) することで除去した。その上清を超遠心分離 (100,000 xg, 30分間, 4 °C) し、得られた沈殿をST溶液 (250 mMショ糖, 10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)) に懸濁し、これをSMP標本として実験に用いた。なお、標本液のCATR感受性のADP透過活性を測定することで、SMP標本中に含まれるright-side-out小胞の含量を求めたところ、10% 未満であることを確認した。

BHM標本及びそのSMP標本のタンパク質濃度は、1% SDS存在下において2 mg/ mLのウシ血清アルブミン (BSA) を標準物質とし、bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce) を用いて決定した。

銅オルトフェナンスロリンによるADP/ATP透過担体架橋反応

銅オルトフェナンスロリン錯体 (Cu(OP)₂) は、CuSO₄と*o*-phenanthrolineを1:2のモル比でST溶液に溶解することで用時調製した。なお、Cu(OP)₂の濃度は銅 (II) イオンの濃度で表示した。架橋反応は所定濃度のCu(OP)₂をSMP懸濁液 (4 mg of protein/mL) に添加した後、0 °C, pH 7.4の条件下でインキュベーションした。所定時間後、5 mM EDTA-

2Naと5 mM NEMを添加することで架橋反応を停止した。試料懸濁液に還元剤を含まない試料処理溶液 (2% SDS, 20% グリセリン, 5 mM EDTA-2Na, 5 mM NEM, 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 6.8))を同容量添加した後、25 °C, 30分間放置することで試料を可溶化し、タンパク質10 µg分をSDS-PAGEに供した。

SDS-PAGE

SDS-PAGEはLaemmliの方法 [30] に従って、12% アクリルアミドゲルを用いて行った。泳動後のゲルを0.1% クマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) にて染色し、CBB染色強度を島津クロマトスキャナーモデルCS-9000を用いて 波長560 nmにて測定した。

ADP/ATP透過担体の免疫染色

まず、SDS-PAGE後のゲル中のタンパク質をポリフッ化ビニレン膜 (Bio-Rad) にセミドライプロットング装置 (Sartorius) を用いて転写した。転写は、プロットング用緩衝液として第1陰極側溶液(0.3 Mトリス, 20% メタノール)、第2陰極側溶液 (25 mMトリス, 20% メタノール)、陽極側溶液 (25 mMトリス, 40 mM 6-アミノ-n-カプロン酸, 20% メタノール, 0.2% SDS) の3種の溶液を用い、3 mA/cm²で1時間行った。転写後の膜を10% BSA中で室温下1時間放置することで、膜上のタンパク質非吸着部分をブロッキングした。その後、膜を0.1% BSA及びウサギ抗ウシ心筋ADP/ATP透過担体抗血清 (1000倍希釈) を含むTBS溶液 (25 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.15 M塩化ナトリウム) に浸し、4 °Cで一晩放置した。更に、膜をTBS溶液で3回洗浄後、0.1% BSAと西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗ウサギIgG抗体 (Cappel製, 2000倍希釈) を含むTBS溶液に浸し、室温で1時間放置した。更に膜をTBS溶液で3回洗浄した後、0.17 mg/mL 3-アミノ-9-エチルカルバゾールと0.015% 過酸化水素水を含むTBS溶液に浸し発色させた。適当な発色を呈した時点で膜を蒸留水で洗浄した後に乾燥させることで発色反応を停止させた。

架橋部位の同定

単量体 30 kDa AAC及び分子間架橋された 60 kDa (AAC)₂タンパク質のSMPからの精製は、nativeな30 kDaのADP/ATP透過担体を精製した過去の報告 [6] をもとに行った。Cu(OP)₂処理 (100 µM, 20分間, 0 °C) 後のSMPを、5% トリトンX-100, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA-2Na, 10 mM MOPS-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁した後、0 °Cにて10分間放置することで可溶化した。この可溶性試料をヒドロキシアパタイトカラムに通し、その非吸着画分を回収した。この画分に5倍容量の冷アセトンを加え、-20 °Cにて一晩放置した後、遠心操作し沈殿を回収した。回収した沈殿を冷アセトンと冷エチル

エーテルで洗浄後、減圧下で乾燥した。乾燥品を6 M グアニジン塩酸, 2 mM EDTA, 1 mM NEM, 100 mM MOPS-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) に溶解させ、25 °Cにて1時間放置した。これにより、変性状態で可溶化された試料タンパク質の未反応SH基 (SS架橋されていないSH基) が全てアルキル化 (NEM化) した。それから、AACと(AAC)₂をゲル濾過用G4000SW_{XL}カラム (0.78 x 30 cm : 東ソー) で63 %アセトニトリル- 0.5 % TFA溶液を用いて0.5 mL/分の流速で分離精製した。AAC (10 nmol)と(AAC)₂ (5 nmol)の各画分は、それぞれに濃縮遠心された後、10倍容量の6 M グアニジン塩酸, 1 mM EDTA, 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)を添加された。この溶液に2 μmolのDTTを添加し、37 °Cで2時間窒素置換下で放置することで、架橋反応により生じたジスルフィド結合を解離させた。その結果、還元され生じたSH基は4.2 μmolのヨードアセトアミドを遮光下で25 °C, 30分間反応させることでカルボキサミドメチルcarboxamidomethyl (CAM) 化させた。AACと (AAC)₂のCAM化までさせた試料はそれぞれRC-AAC, RC-(AAC)₂と名付けた。CAM化反応後の溶液は再びG4000SW_{XL}カラムに供され、そのRC-AAC又はRC-(AAC)₂画分を採取したことで、それらの試料の溶媒は63 %アセトニトリル- 0.5 % TFA溶液に置換された。RC-AAC又はRC-(AAC)₂を含む画分は再び50 μLまで遠心濃縮した後、200 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で4倍希釈した。この試料を2 %リジレンドペプチダーゼで37 °C, 24時間処理することにより断片化した。断片化した試料は、7 M グアニジン塩酸溶液で6倍希釈した後、TSK gel ODS-120Tカラム (0.46 x 15 cm : 東ソー) を用いて逆相HPLCを行い、断片化されたペプチドを分離した。溶出は1.0 mL/分の流速で、0.05 % TFAを含むアセトニトリル濃度 12-52 % 間を 0.9 % /分の直線濃度勾配で80分間溶出した。その溶出液を1 mL毎に分取した。その溶出プロファイルは、波長210 nmの吸収を測定することでモニターした。

また、参照用試料として未修飾の状態に精製し変性状態のADP/ATP透過担体をNEM又はヨードアセトアミドで処理した試料 (それぞれRNEMとRCAM) を調製し同様に断片化した後、そのペプチドの溶出プロファイルをモニターした。

第3章

2 価性架橋試薬を用いた ADP/ATP 透過担体の 2 量体構造と透過機能発現機構の解析

3.1 緒言

ADP/ATP 透過担体は、ミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を司る膜タンパク質である。第 2 章の銅オルトフェナンスロリン (Cu(OP)₂) を用いた ADP/ATP 透過担体のシステイン残基間架橋解析の結果から、ADP/ATP 透過担体が 12 回膜貫通型の 2 量体として機能していることと、マトリックス側第 1 ループ (M1) 中に存在する Cys⁵⁶ がマトリックス側に露出し、2 量体構造中の 2 つの Cys⁵⁶ は非常に近接していることが見いだされた。また、ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の 6 回膜貫通構造 [2, 3] によると、他の 2 つのマトリックス側ループにもそれぞれシステイン残基が 1 残基 (Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶) ずつ存在するにも関わらず、これらシステイン残基は Cu(OP)₂ による架橋反応に関与しなかったことから、ループ M1 のみがマトリックス側に露出し、他のループは膜内部に挿入されていることが強く示唆された [1]。しかしながら、Cu(OP)₂ による架橋反応は、2 つのシステイン残基中の硫黄原子が近接し得る位置に存在しないと架橋は形成されないと考えられる。そのため、近傍にいないシステイン残基間の詳細な位置関係に関する情報を得ることはできなかった。

また、ADP/ATP 透過担体はその基質輸送に伴って大幅な立体構造変化を伴うことが明らかとなっている [4-7]。この立体構造変化とは、基質結合部位を細胞質側に向けた c-state とマトリックス側に向けた m-state の 2 つのコンホメーション間の相互構造転移であるとされている (図 3-1) [4-7]。ADP/ATP 透過担体の特異的阻害剤であるカルボキシアトラクロシド (CATR) とボンクレキン酸 (BKA) は、それぞれ細胞質側とマトリ

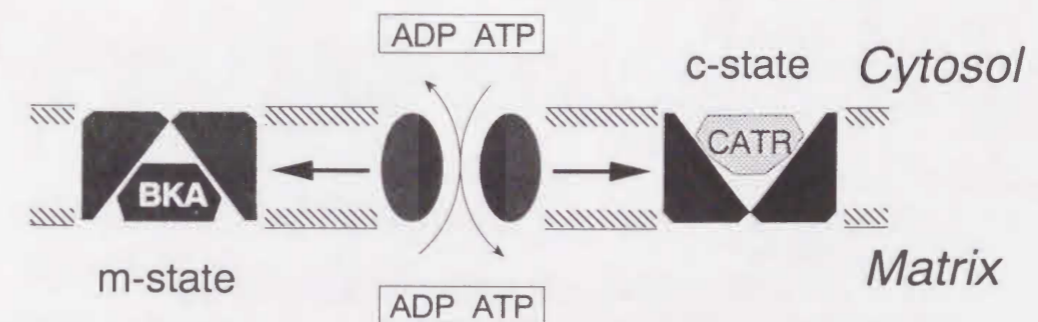


図 3-1 ADP/ATP 透過担体のコンホメーション変化

ックス側から作用し、ADP/ATP 透過担体のコンホメーションをそれぞれ c-state と m-state に固定することで輸送活性を阻害することが知られている (図 3-1) [4-8]。真島らは、この 2 種のコンホメーション間で各システイン残基の SH 試薬に対する反応性が異なることを見だし、この 2 つのコンホメーション間の構造転移に伴って、マトリックス側のループの立体配置が変化すると結論した [9]。この結果は、基質輸送にこれら親水性ループが深く関与していることを示唆しており、非常に興味深い知見である。

本章では、ADP/ATP 透過担体の機能構造中における各ループの空間的配置及び輸送機能発現時におけるループの立体配置変化の詳細を解明することを目的として、SH 基に特異的な 2 価性架橋試薬ジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体の架橋形成反応の解析を行った。図 3-2 には本研究に用いた 6 種の架橋試薬の名称と構造及びコンピューター構造解析により算出した架橋距離を示す。算出された架橋距離は過去の報告 [9-12] とも良く一致しており、本研究ではこの値を使用した (詳細は結果の項に記述)。解析の結果、7.7 ~ 16.8 Å と架橋距離の異なる 6 種のジマレイミド誘導体全てが、Cu(OP)₂ 同様に Cys⁵⁶ 同士の分子間架橋を形成しそれ以外の架橋は生じなかった。加えて、各誘導体の架橋形成速度を比較した結果、12 Å の架橋距離を中心として架橋形成が起きやすくなることを明らかとなった。以上の結果から、Cys⁵⁶ 及びループ M1 の存在状態について考察した。更に、ADP/ATP 透過担体の各コンホメーションでの架橋反応も解析し、その結果から基質輸送に伴うループ M1 の立体配置変化の機構について考察した [13]。

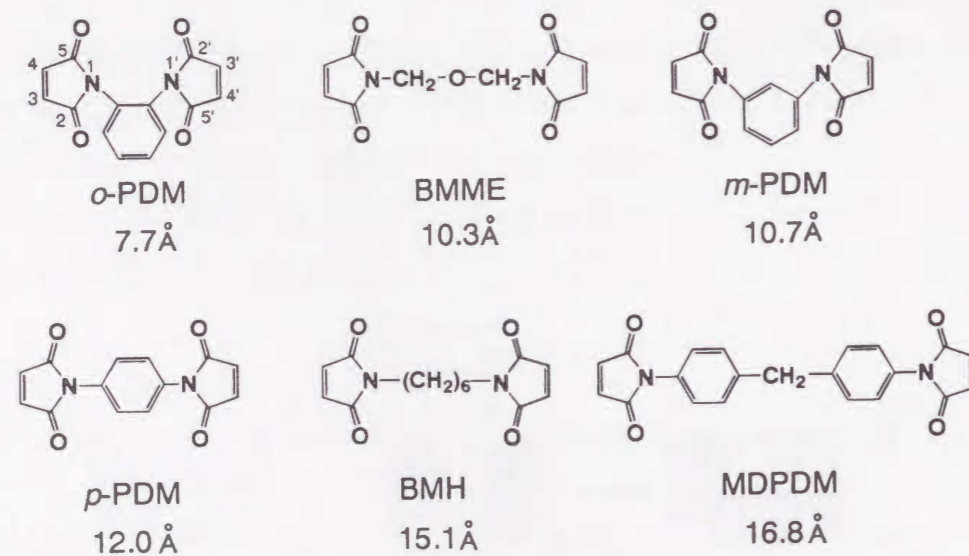


図 3-2 ジマレイミド誘導体の構造と架橋距離

各誘導体の構造解析は、徳島大学薬学部ワークステーション SG I Indy X にて分子解析プログラム Insight II/Discover (Biosym) を用いて行った。構造安定化は分子力場計算プログラム Discover の CVFF 力場を用いた。得られた最安定構造より架橋距離を算出した。

3.2 結果

3.2.1 コンピューター解析によるジマレイミド誘導体の架橋距離の決定

同一の条件下で架橋試薬を比較できるように、各ジマレイミド誘導体の架橋距離は、Unix の分子力場計算プログラム Insight II/Discover を用いて CVFF 力場における最安定構造を決定した後、架橋距離を算出した。更に、得られた最安定構造とその可能な構造変化について検討したところ、BMME 及び BMH を除く他の 4 種は、芳香環を含むスパーサー部位が非常に安定であり、構造的変化はマレイミド環が回転するだけであるため、架橋距離は算出した値からほとんど変動しなかった。これらと比較すると、エーテル鎖又はアルキル鎖をスパーサーとする BMME, BMH は立体構造が柔軟に変化する。しかし、その変化もアルキル鎖の cis-trans 変換が主な変化であるため、架橋距離は変動しても 2 - 3 Å 程度であった。それ故、今回算出した架橋距離は、水溶液中における最も可能性のある値であると言える。また、これらの値は、過去の報告ともよく一致した [9-12]。

3.2.2 ジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋の形成

まず、各誘導体 50 μM をウシ心筋ミトコンドリアの反転膜小胞 (5 mg of protein/mL) に添加し、0 °C, pH 7.2 にて 60 分間反応させた。この反応を過剰量のジチオスレイトール (DTT) を添加することで終了させた後、その試料を SDS-PAGE に供した。図 3-3 はその CBB 染色像を示す。全ての誘導体で、ADP/ATP 透過担体である 30 kDa バンド (AAC) の明らかな減少と 60 kDa バンドの出現が観察された。この出現した 60 kDa バンドは、抗 ADP/ATP 透過担体抗体により免疫染色されたこ

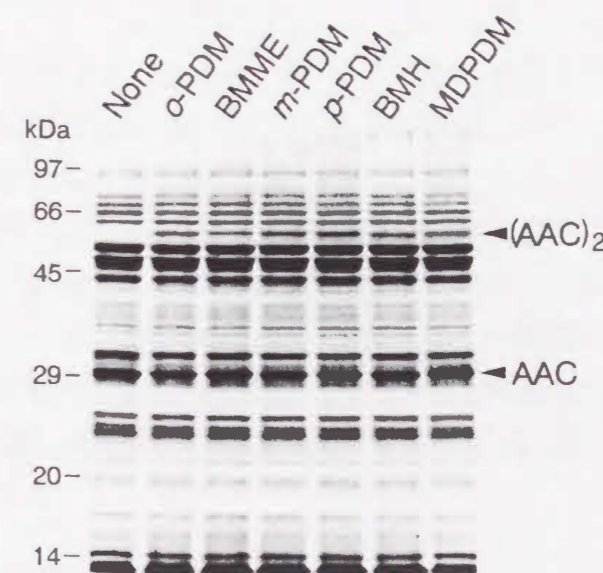


図 3-3 ウシ心筋反転膜小胞タンパク質に対するジマレイミド誘導体の影響

ウシ心筋ミトコンドリアの反転膜小胞 (SMP) 5mg of protein/mL に各ジマレイミド誘導体 50 μM を 0 °C, 60 分間作用させた後、そのタンパク質 12.5 μg を 12 %アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離し、CBB にて染色した。

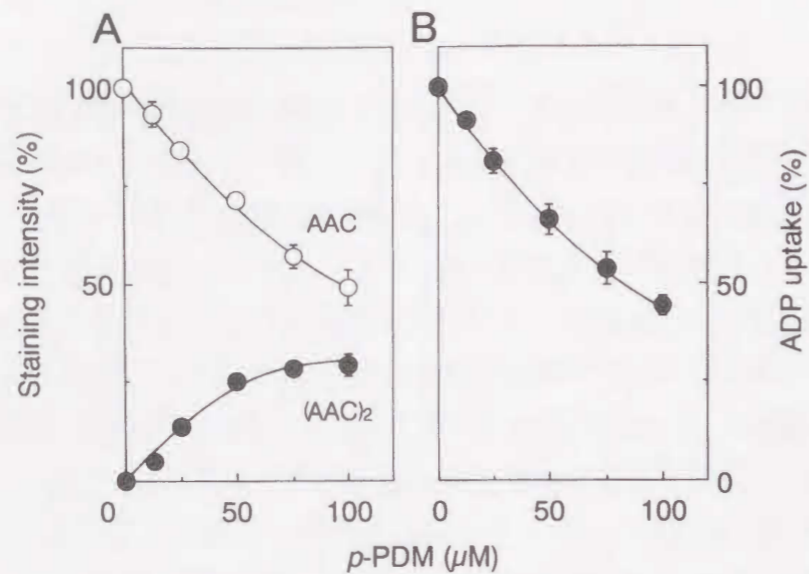


図 3-4 *p*-PDM による ADP/ATP 透過担体の分子間架橋形成 (A) とその ADP 透過活性 (B) に対する影響

所定濃度の *p*-PDM で 0 °C にて 10 分間処理した SMP における 30 kDa AAC バンド及び 60 kDa (AAC)₂ バンドの相対 CBB 染色強度測定した (A)。また、その *p*-PDM 処理した SMP の ADP 透過活性を、100 μM [³H]ADP の 0 °C, 10 秒間の取込量から、*p*-PDM 未処理の SMP の値を 100 % として求めた。結果は、3 回の試験における平均値 ± 標準偏差で示す。

とから、Cu(OP)₂ の場合と同じく ADP/ATP 透過担体の分子間架橋されたバンド ((AAC)₂) であることが明らかとなった (データは示さない)。第 2 章での Cu(OP)₂ による架橋反応の場合では、免疫染色を行うことで分子内架橋形成によって形成されたと考えられる 28 kDa のバンドが観察された。しかしながら、これら誘導体に於いては 28 kDa バンドのような低分子質量側に移動した ADP/ATP 透過担体のバンドは検出されなかった (データは示さない)。以上の結果は、これらの誘導体全てが ADP/ATP 透過担体の分子間架橋を特異的に行うことを示した。

次に、誘導体のひとつである *p*-PDM を種々の濃度で 0 °C, pH 7.2 の条件下で 10 分間反応させた時の AAC 及び (AAC)₂ バンドの形成量を各バンドの CBB 染色強度から求めた。その結果を図 3-4A に示す。AAC バンドは *p*-PDM の濃度依存的に減少した。一方 (AAC)₂ バンドは、50 μM まで濃度依存的に増加したが、それ以上高濃度側ではほとんどプラトーに達した。また、50 μM を越える濃度を用いた場合、濃縮ゲルに残存するような凝集物の形成が観察された。また 50 μM の濃度で用いた場合でも、反応時間が 10 分間を越えると凝集が観察された。なお、他の誘導体でも同様な減少が観察されたが、50 μM, 10 分間の反応条件では全ての試薬で凝集物は観察されなかった (データは示さない)。

3.2.3 ジマレイミド誘導体の分子間架橋反応に対する各種試薬の影響

各誘導体の架橋形成反応に対する ADP/ATP 透過担体の阻害剤の影響を検討した。各種試薬で前処理した SMP を 50 μM *p*-PDM で 0 °C, pH 7.2 で 60 分間処理した後、SDS-PAGE を行った。図 3-5 にはその CBB 染色像を示す。まず、2 mM *N*-エチルマレイミド (NEM) で 0 °C, pH 7.2 で 10 分間前処理した後 SMP に *p*-PDM を作用させた場合、(AAC)₂ の形成は完全に阻害された (図 3-5, NEM)。NEM は、*m*-state における Cys⁵⁶ を優位に標識する SH 試薬であることから [3]、*p*-PDM の架橋部位の少なくとも一方は Cys⁵⁶ であることが明らかとなった。次に ADP/ATP 透過担体を *m*-state に固定する特異的阻害剤 200 μM BKA を同様に前処理した SMP を試料とした場合 (BKA)、*p*-PDM による (AAC)₂ の形成量は未処理のそれとほぼ同量であった。過去の報告 [14] によると、BKA が ADP/ATP 透過担体に結合すると、Cys⁵⁶ 以外のシステイン残基に対する SH 試薬の結合が阻害されることから、*p*-PDM による ADP/ATP 透過担体の分子間架橋反応の架橋部位は、Cu(OP)₂ と同様に Cys⁵⁶ 同士であることが明らかとなった。更に、ADP/ATP 透過担体を *c*-state に固定する特異的阻害剤である 200 μM CATR で同様に前処理した場合 (CATR (m))、架橋は全く阻害されなかった。CATR は膜不透過性の試薬であり [14]、細胞質側からしか ADP/ATP 透過担体に作用しないことが知られている。そこで、BHM に CATR を前処理した後に調製した SMP に *p*-PDM を作用させたところ (CATR (c))、(AAC)₂ の形成は完全に阻害された。以上の結果から、*p*-PDM は ADP/ATP 透過担体が *m*-state の状態に於いて Cys⁵⁶ 同士を分子間架橋することが明らかとなった。なお、NEM, BKA, CATR は Cu(OP)₂ による分子間架橋反応に対しても *p*-PDM と同一の結果を与えた [1]。

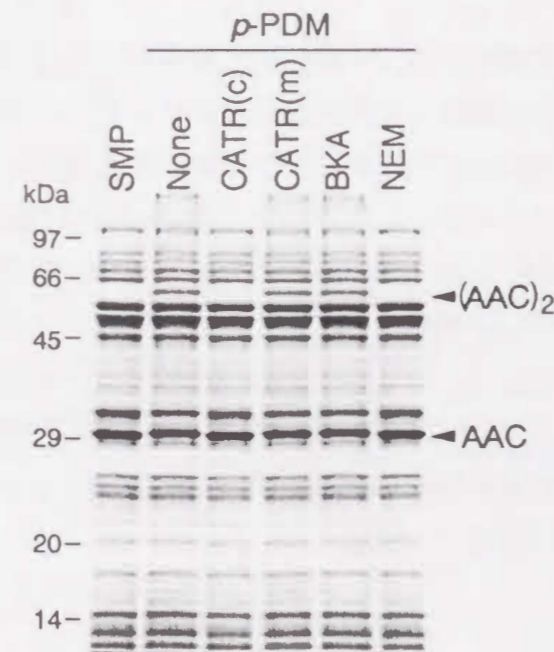


図 3-5 *p*-PDM による ADP/ATP 透過担体分子間架橋形成に対する各種試薬の影響

SMP (20 mg of protein/mL) を 200 μM CATR (CATR(m)) 又は 200 μM BKA (BKA), 2 mM NEM (NEM) で 0 °C, pH 7.2 にて 10 分間反応させた後、SMP を 5 mg of protein/mL 希釈し、50 μM *p*-PDM で 0 °C にて 60 分間処理した。このタンパク質 12.5 μg を 12 % ゲル SDS-PAGE に供した後、CBB 染色した。SMP は、*p*-PDM 未処理の SMP、None は前処理をせず *p*-PDM を処理した SMP、CATR(c) は、CATR 処理したミトコンドリアから調製した後に *p*-PDM 処理を行った SMP の結果を示す。

他のジマレイミド誘導体を用いて同様の解析を行った。その結果、全ての誘導体で *p*-PDM と同様の結果を得た (データは示さない)。この結果から、架橋距離が異なるにも関わらず、全ての誘導体が Cys⁵⁶ 同士の分子間架橋反応を特異的に行っていることが明らかになった。

3.2.4 ADP/ATP 透過担体の ADP 透過活性に対する架橋反応の影響

SMP における ADP/ATP 透過担体を介した ADP 取り込み活性に対する架橋反応の影響を検討した。種々の濃度の *p*-PDM で 0 °C, pH 7.2 の条件下で 10 分間処理した SMP (2 mg of protein/mL) に 20 μM [³H]ADP を添加し、0 °C, pH 7.2 で 10 秒間インキュベーションして SMP 内に取り込まれた [³H]ADP 量を測定することで透過担体の ADP 透過活性を求めた。その結果、図 3-4B に示すように、*p*-PDM の反応濃度の増加に伴って、SMP の ADP 取り込み活性は阻害された。

1 価のマレイミド化合物である NEM が Cys⁵⁶ を標識することで、ADP/ATP 透過担体の ADP 透過活性は阻害されることが既に報告されていることから [3]、*p*-PDM も、一方のマレイミド基が Cys⁵⁶ を標識すると ADP/ATP 透過担体の活性は阻害されると予想された。つまり、ADP/ATP 透過担体 1 分子当たり、1 分子の *p*-PDM が結合すれば阻害されると考えられた。しかし本結果では、*p*-PDM による ADP/ATP 透過担体の活性阻害は、30 kDa AAC バンドの減少 (図 3-4A) とよく対応していた。つまり、残存する 30 kDa AAC バンド中には、*p*-PDM が結合した ADP/ATP 透過担体は含まれないことが強く示唆された。この知見から、*p*-PDM は 2 量体構造中の片方の Cys⁵⁶ に結合すると、すぐに他方の Cys⁵⁶ に結合して架橋を形成することが明らかとなった。

3.2.5 ジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋形成反応の比較

各誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応の経時変化を比較した。各誘導体 50 μM を 0 °C, pH 7.2 にて所定時間反応させた後、分子間架橋形成量を各反応時間における (AAC)₂ バンドの CBB 染色強度を測定することで算出した。図 3-6 にはその結果を示す。全ての誘導体の架橋反応は、最初速くその後徐々に緩やかとなり、反応時間 60 分後には、全ての試薬がほぼ同量でプラトーに達した。全ての誘導体の最大分子間架橋形成量はほぼ同じであったが、各誘導体の分子間架橋形成の初速度 ($v(\text{AAC})_2$) は異なっていた。そこで、図 3-6 から $v(\text{AAC})_2$ 算出し比較した (表 3-1)。 $v(\text{AAC})_2$ 値は、*p*-PDM > *m*-PDM > *o*-PDM > MDPDM > BMME > BMH の順で速く、最も速い *p*-PDM の $v(\text{AAC})_2$ は、最も遅い BMH のそれより 7.5 倍も速かった。

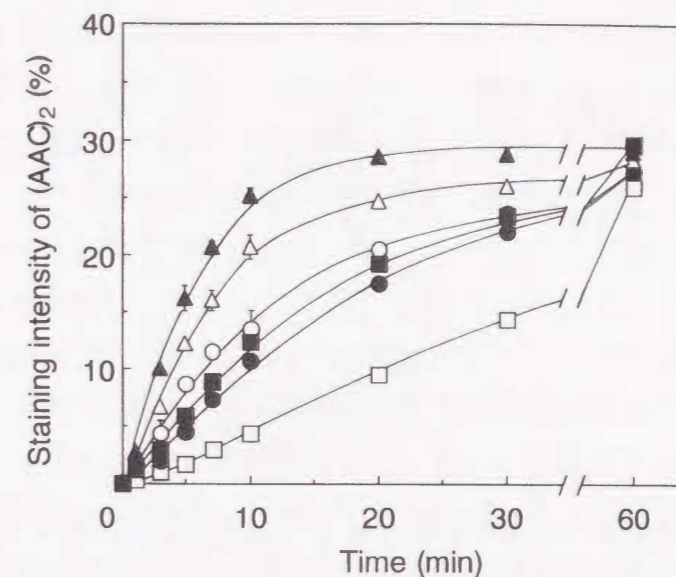


図 3-6 ジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応の経時変化

各ジマレイミド誘導体 50 μM で所定時間反応させた (他の反応条件は図 3-3 に従う)。形成された (AAC)₂ バンド量を CBB 染色強度から測定した。各プロットは 3 回の測定の平均値であり、エラーバーはその標準偏差を示す。各誘導体は (○) *o*-PDM, (●) BMME, (△) *m*-PDM, (▲) *p*-PDM, (□) BMH, (■) MDPDM でそれぞれ示す。

表 3-1 各ジマレイミド誘導体の ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応の初速度と GSH 付加反応における最終付加物 (DSI) 形成初速度。

架橋試薬	架橋距離 (Å) ^a	$v(\text{AAC})_2$ ^b	$v(\text{DSI})$ ^c	$v(\text{AAC})_2/v(\text{DSI})$
<i>o</i> -PDM	7.7	78±12	152±13	0.51
BMME	10.3	38±3	68±8	0.56
<i>m</i> -PDM	10.7	86±8	104±5	0.83
<i>p</i> -PDM	12.0	100±9	100±9	1
BMH	15.1	13±3	19±4	0.68
MDPDM	16.8	50±2	84±19	0.60

^a 分子力学 (MM) 計算により算出した架橋距離 (2.2.1 参照)。

^b 図 3-6 の SDS-PAGE 上の (AAC)₂ 量の経時変化より、反応開始 1 分間の CBB 染色強度の変化量として算出した初速度を、*p*-PDM を 100 とした相対値に変換した。値は 3 回の試験の平均値 ± 標準偏差として示す。

^c 図 3-8 における DSI 生成量の経時変化より、反応開始 1 秒当たりの DSI 生成量として算出した初速度を、*p*-PDM を 100 とした相対値に変換した。値は 3 回の試験の平均値 ± 標準偏差として示す。

3.2.6 ジマレイミド誘導体の SH 基反応性の比較

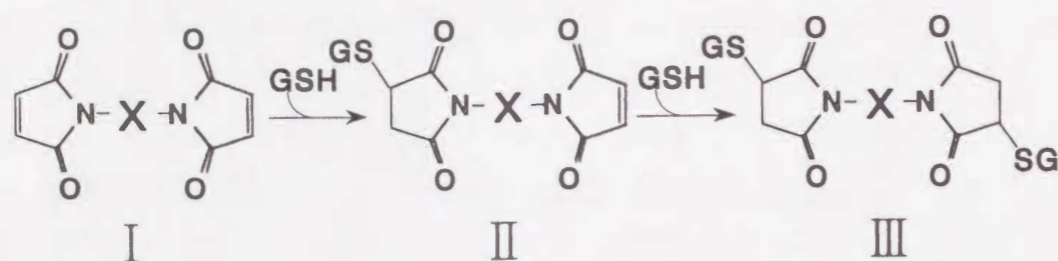


図 3-7 ジマレイミド誘導体とグルタチオン (GSH) の反応式
X はスペーサー部位を示す。

各誘導体の $\nu(\text{AAC})_2$ を支配する主な要因として、(1) 各誘導体のマレイミド基の SH 基に対する反応性と、(2) 各誘導体の架橋距離と ADP/ATP 透過担体の 2 量体構造における Cys⁵⁶ 間の距離の適合性の 2 つが考えられた。本研究の目的に照合すると、Cys⁵⁶ 及びループ M1 の正確な立体配置を明らかにする必要がある。そこで、各誘導体の SH 基に対する反応性を、誘導体と還元型グルタチオン (GSH) の結合反応の解析から検討した。図 3-7 にはその反応式を示す。誘導体 (I) が GSH と 1 分子結合することで、一方のマレイミド基がスクシンイミド化した中間反応物 II (monosuccinimide-type adduct : MSI) が生成される。更に、これに GSH 1 分子が結合することで、最終生成物 III (disuccinimide-type adduct : DSI) が生成される。各誘導体 50 μM と GSH 100 μM をリ

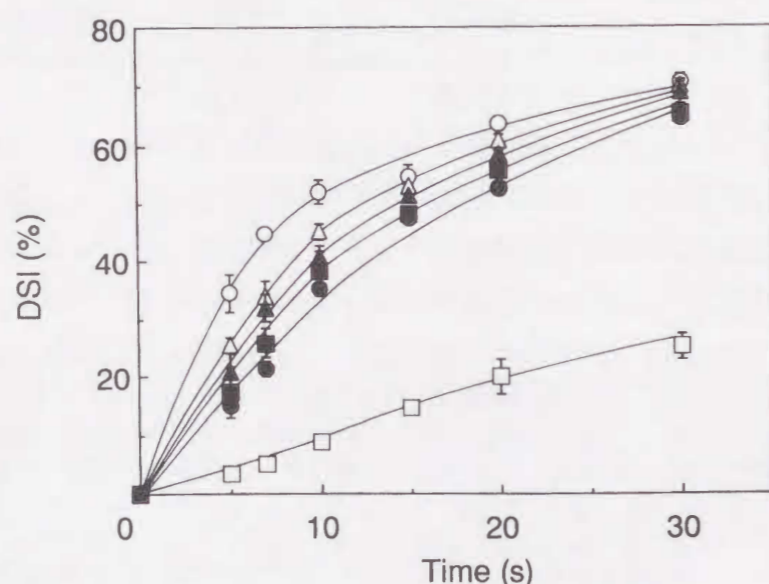


図 3-8 各ジマレイミド誘導体と GSH との最終反応生成物の生成量の経時変化
ジマレイミド誘導体と GSH の最終生成物である disuccinimide-type adduct (DSI) 生成量の経時変化を測定した (詳細は本文中にて記述)。各プロットは 3 回の測定の平均値であり、エラーバーはその標準偏差を示す。各誘導体は、図 3-6 と同様に表示した。

ン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 0 °C にて所定時間反応させた後、逆相 HPLC に供することで未反応の誘導体及び各種生成物を分離し、そのプロファイルを波長 210 nm における吸光度で測定した。更に、それぞれの生成物のピーク面積から、試料中の化合物 I ~ III の量を決定した。詳細なデータは示さないが、全ての誘導体の反応は典型的な逐次反応であり、各誘導体の MSI の形成速度は速すぎて測定できなかった。しかし、DSI (化合物 III) の形成速度は、MSI のそれよりも遅く、MSI から DSI への変換がこの逐次反応の律速段階であると考えられた。

図 3-8 には各誘導体の DSI 生成量の経時変化を示す。全ての誘導体において DSI の生成量は、最初速く後に緩やかに増加した。データとして示していないが、反応開始 5 分後には全ての誘導体が DSI に変換されていた。この結果における各生成曲線の初期の直線部を利用して、各誘導体の DSI 生成速度 ($\nu(\text{DSI})$) を算出した。その結果を表 3-1 に示す。この $\nu(\text{DSI})$ 値がこれら誘導体の SH 基反応性の指標となるが、各誘導体のこの値は異なっており、最大の *o*-PDM と最低の BMH では実に 12 倍の違いがあった。このような反応性の違いは、主にスペーサー部の電子構造の差異に起因していると考えられ、芳香環を有する誘導体の方が電子共鳴によりマレイミド基の求電子性を上昇させると考えられる [15]。また、この結果から、各誘導体の ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応速度 ($\nu(\text{AAC})_2$) の差異は、各誘導体の SH 基反応性の差異が影響を与えていると強く示唆された。しかしながら、各誘導体の $\nu(\text{DSI})$ 値は、 $\nu(\text{AAC})_2$ 値に対応していなかった (表 3-1)。この結果から、Cys⁵⁶ 間の距離も各誘導体による分子間架橋反応に影響を与えていることがわかった。

3.2.7 Cys⁵⁶ 間架橋形成反応における架橋距離依存性

最後に、各誘導体の ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応速度 ($\nu(\text{AAC})_2$) を、3.2.6 にて求めた各誘導体の GSH 付加物形成速度 ($\nu(\text{DSI})$) で除して補正することで、SH 基反応性が同一である条件下で、各誘導体の Cys⁵⁶ 間架橋形成能を比較した。その値 $\nu(\text{AAC})_2/\nu(\text{DSI})$ を表 3-1 に示した。更に、各誘導体の架橋距離に依存した $\nu(\text{AAC})_2/\nu(\text{DSI})$ 値の変化を図 3-9 に示した。 $\nu(\text{AAC})_2/\nu(\text{DSI})$ は、架橋距離が 11 Å を越えると顕著に上昇し、架橋距離 12 Å の *p*-PDM で最大となり、12 Å を越えると緩やかに減少した。第 2 章にて、Cu(OP)₂ に (架橋距離 0 Å) よっても同様に Cys⁵⁶ 間の架橋が形成されることが明らかとなっており、この結果も考慮に入れると、Cys⁵⁶ 間の距離は 12 Å を中心として、少なくとも 0 ~ 17 Å の範囲で変化していると言える。

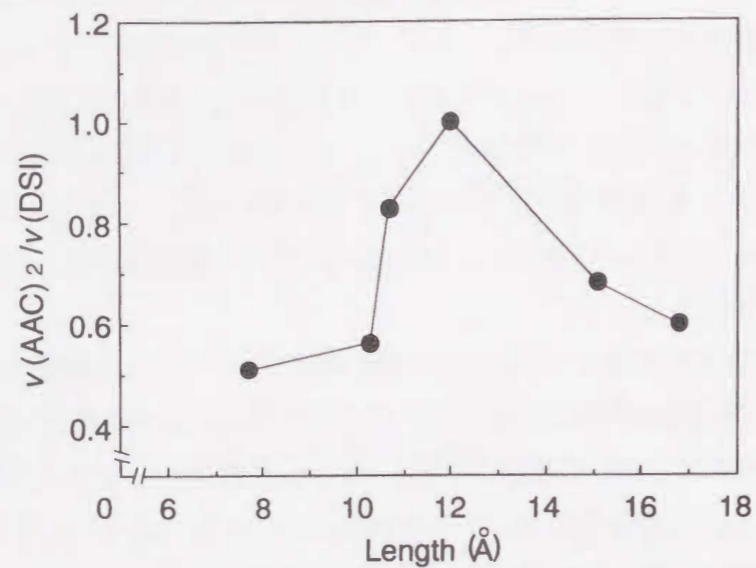


図 3-9 ジマレイミド誘導体の ADP/ATP 透過担体分子間架橋形成速度の架橋距離依存性
各誘導体の架橋距離は図 3-2 の値を、 $v(\text{AAC})_2/v(\text{DSI})$ 値、表 3-1 の値をそれぞれ用いた。

3.3 考察

3.3.1 ADP/ATP 透過担体の膜内構造におけるシステイン残基の存在位置

本研究では、架橋距離が 7.7~16.8 Å と異なる 6 種のジマレイミド誘導体全てで ADP/ATP 透過担体の分子間架橋反応が起こり、しかも、その架橋部位が全ての誘導体で Cys⁵⁶ 同士であったことを明らかにした (図 3-5)。このことから、まず 2 章でも述べたように、Cys⁵⁶ がマトリックス側から最も反応しやすいシステイン残基であることが確認された。第 2 章の Cu(OP)₂ による架橋反応の解析 [1] によると、分子間架橋と比較してごくわずかではあるが分子内架橋が形成され、ADP/ATP 透過担体よりも低分子質量側の 28 kDa の位置にそのバンドが検出された [1]。今回、MDPDM のような非常に長い架橋距離の誘導体でも、この分子内架橋のバンドは出現しなかった (図 3-3)。このことから、Cys⁵⁶ と他のシステイン残基 (Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶) はかなり離れた位置に存在しているか、これを含む各ループの高次構造によって架橋試薬が簡単に反応できなくなっているかどちらかであると考えられる。NEM の ADP/ATP 透過担体標識反応の解析によると Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶ も緩やかに標識されており [3]、前者の説のほうが可能性は高いと考えられる。

更に、各誘導体のダイマー形成反応の速度は異なっていた (図 3-6)。このような架橋形成速度の違いは、試薬自体の SH 基に対する反応性と、標的となる SH 基間の距離と試薬の架橋距離の相性によるものであると考えられた。そこで、各誘導体の SH 基に対する反応性の違いを明らかにする目的で、GSH との反応性について検討した (図 3-8, 表 3-1)。その結果、SH 基に対する反応性と ADP/ATP 透過担体に対する分子間架橋形成能は必ずしも一致するものではなく、この架橋形成が Cys⁵⁶ 間の距離にも依存していることが強く示唆された。つまり、各誘導体の架橋形成能から SH 基に対する反応性を補正した値 ($v(\text{AAC})_2/v(\text{DSI})$) を算出し、Cys⁵⁶ 間距離の変動の振る舞いを明らかにできると考えた (図 3-9)。その結果、*o*-PDM から架橋距離の長い誘導体になるにつれ $v(\text{AAC})_2/v(\text{DSI})$ 値は高くなり、架橋距離が 12 Å の *p*-PDM で最大となり、それより長い BMH, MDPDM では順次低下した。この結果は、ADP/ATP 透過担体の膜内 2 量体構造において 2 つの Cys⁵⁶ 間の距離が 12 Å を中心にして変化していることを示した。

3.3.2 ADP/ATP 透過担体の立体構造とループ M1 の存在状態

3.3.1 の考察から Cys⁵⁶ は、他のシステイン残基と離れた位置に存在すると考えられる。このことから Cys⁵⁶ を含む親水性ループ M1 (Glu²⁹ ~ Arg⁷¹) は、第 2 章にて膜中に存在すると考えられた他のマトリックス側のループ M2 (Asp¹³⁴ ~ Gln¹⁷⁴), M3 (Asp²³¹ ~ Lys²⁷¹) とはかなり離れて、マトリックス側に大幅に露出していると考えられる。更に、

架橋距離が変化しても Cys⁵⁶ 間の架橋が形成されたことから、Cys⁵⁶ 付近の領域は、柔軟にその構造を変化させていることが見いだされた。Cys⁵⁶ はループ M1 中ではほぼ中間に位置する。このことから、Cys⁵⁶ 間距離の変動はマトリックス側に露出した M1 が揺動するためであると考えられる。ループが揺動しているということはループ (少なくとも Cys⁵⁶ 周辺の領域) の立体配置がなんらの規制を受けていない動的構造であることを意味する。言い換えれば、ループ M1 はマトリックス側に露出し、他のループとの相互作用のない自由な状態にあると考えられる。

今回の結果から、全てのジマレイミド誘導体の架橋形成速度が BKA によって影響を受けないことが明らかとなった (図 3-5)。この結果から、SMP における ADP/ATP 透過担体が m-state であることがわかった。その一方で、CATR を細胞質側から作用させた場合、全てのジマレイミド誘導体による ADP/ATP 透過担体の架橋形成は完全に阻害された (図 3-5)。以上の結果は、Cu(OP)₂ による架橋反応においても同様であった [1]。これらの結果から、ループ M1 は c-state において Cys⁵⁶ に SH 試薬がアクセスできないよう膜内部へと入り込んでいることが強く示唆された。事実、NEM などの SH 試薬による Cys⁵⁶ の標識は、CATR によって阻害されることが報告されている [3, 16]。以上のことをもとに、ADP/ATP 透過担体の立体構造変化に伴うループ M1 の変化を模式図として図 3-10 に示す。ループ M1 は m-state においてマトリックス側にかなり露出し、自由度の高い '開いた' 構造で揺動している。しかし、コンホメーション変化に伴って一転して規制され、c-state においては膜内へと配置転換し '閉じた' 構造をとると考えら

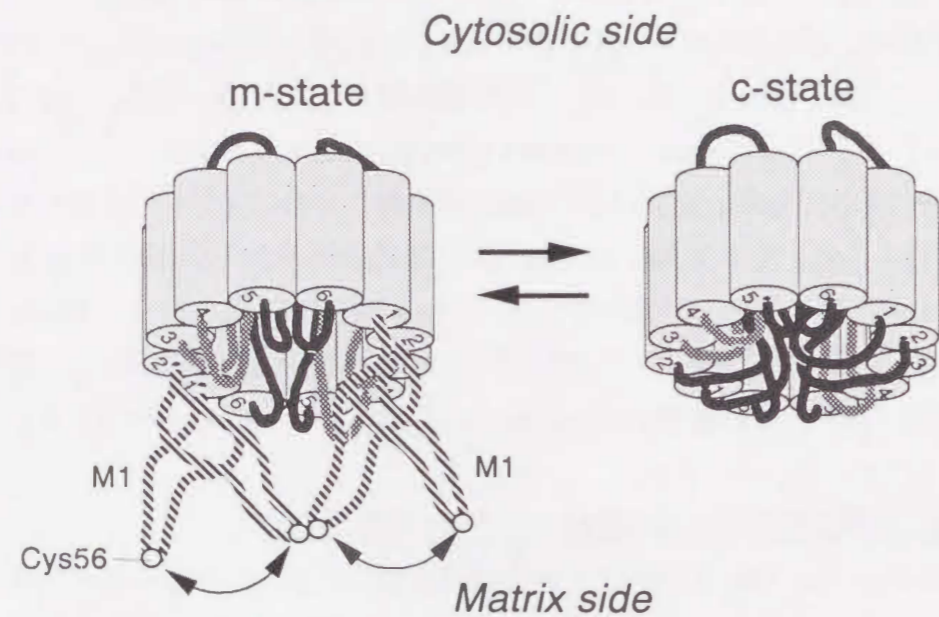


図 3-10 ADP/ATP 透過担体のコンホメーションとループ M1 の存在状態
灰色の円筒は膜貫通領域を示し、それを結ぶ線がループを示している。

れる。ループのこのような配置変化については、各種プロテアーゼのループ M1 に対する感受性が ADP/ATP 透過担体のコンホメーションに依存して変化することからも支持されている [17, 18]。

3.3.3 基質輸送におけるループ M1 の機能的役割

このようなループ M1 の立体配置変化はマトリックス側からの基質の流入に密接に関係していると考えられる。すなわち、m-state の時には、ループ M1 が開くことで、マトリックス側から基質は流入できる。その一方で、c-state の時には M1 が閉じることで基質は流入できない。この開閉が、基質が基質結合部位であるループ M2 [14, 19] に近づくことを規制し、基質結合の方向性を決定しているのではないかと考えられる。つまり、M1 は基質輸送のゲート的な役割を担っており、ループ M1 によってマトリックス側の基質の流入は規制されると考えられる。実際、今回得られた Cys⁵⁶ 間の距離である 12 Å は、基質である ADP や ATP の分子サイズとほぼ同じである [20-22]。またループ M1 には、比較的正荷電のアミノ酸残基も多い [23]。以上の知見からも、ループ M1 が物理的な基質の透過路としての役目を果たしているのではないかと考えられる。今回得た知見は、基質輸送におけるループ M1 の重要性を明確にするものであり、ADP/ATP 透過担体の構造と機能を論じる上で重要な知見となると考えている。

3.4 参考文献

- [1] Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554
- [2] Walker, J.E., (1982) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 519-526
- [3] Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181-22187
- [4] Klingenberg, M., (1989) in: *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (A. Azzi, et al. Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 169-181
- [5] Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [6] Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [7] Klingenberg, M., (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 1-14
- [8] Stubb, M., (1981) in: *Inhibitors of Mitochondrial Functions* (Erecinska, M., and Wilson, D.F., Eds.) Pergamon press, Oxford, pp.283-304
- [9] Chang, F.N., and Flaks, J.G., (1972) *J. Mol. Biol.* **68**, 177-180
- [10] Walleczek, J., Martin, T., Redl, B., Stöffler-Meilicke, M., and Stöffler, G., (1989) *Biochemistry* **28**, 4099-4105
- [11] Wells, J.A., Knoeber, C., Sheldon, M.C., Werber, M.M., and Yount, R.G., (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11135-11140
- [12] Nadeau, O.W., Sacks, D.B., and Carlson, G.M., (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29196-29201
- [13] Hashimoto, M., Majima, E., Goto, S., Shinohara, Y., and Terada, H., (1999) *Biochemistry* **38**, 1050-1056
- [14] Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
- [15] Knight, P., (1979) *Biochem. J.* **179**, 191-197
- [16] Boulay, F., and Vignais, P.V., (1984) *Biochemistry* **23**, 4807-4812
- [17] Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P., and Vignais, P.V., (1989) *Biochemistry* **28**, 1093-1100
- [18] Marty, I., Brandolin, G., Gagnon, J., Brasseur, R., and Vignais, P.V., (1992) *Biochemistry* **31**, 4058-4065
- [19] Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432.
- [20] Cini, R., Burla, M.C., Nunzi, A., Polidori, G.P., and Zanazzi, P.F., (1984) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2467-2476
- [21] Sabat, M., Cini, R., Haromy, T., and Sundaralingam, M., (1985) *Biochemistry* **24**, 7827-7833
- [22] Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York
- [23] Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M., (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 345-349

3.5 実験方法

試薬

o-, *m*-, *p*-PDM : 和光純薬

MDPDM : 和光純薬

BMME : Research Organics Inc.

BMH : Pierce

GSH : 和光純薬

NEM : ナカライテスク

CATR : Sigma

BKA : Delft University of Technology, Prof. Duineより恵与

[³H]ADP : Du-pont New England Nuclear

AG1-X8樹脂 : Bio-Rad

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) と垂ミトコンドリア粒子 (SMP) の調製

BHM及びそのSMPは、第2章に記述した方法に従って調製した。CATRを前処理したSMPを調製する際は、最初、BHMを懸濁するSMP調製用溶液に、4 nmol/mg of proteinの濃度でCATRを添加し、25 °C, 10分間インキュベーションした後、超音波処理にて膜を反転させた。なお、このCATR前処理SMPがADP取り込み活性を有さないことを確認している。

ジマレイミド誘導体によるADP/ATP透過担体架橋反応

BHMまたはSMPを5 mg of protein/mLの濃度でSTE溶液 (250 mMショ糖, 0.2 mM EDTA-2Na, 10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.2)) に懸濁した。ジマレイミド誘導体は、使用直前に使用濃度の100倍の濃度でジメチルホルムアミドに溶解した。そして、試料懸濁液100 μLに対して1 μLのジマレイミド誘導体溶液を添加し、0 °C, pH 7.2の条件下でインキュベーションした。所定時間後、25 mM DTTを添加することで架橋反応を停止した。種々の試薬を処理する場合は、まず、SMPを20 mg of protein/mLの濃度に懸濁して試薬を前処理した後、5 mg of protein/mLに希釈して架橋反応を行った。

SDS-PAGE

架橋反応後の試料は、同容量の試料処理溶液 (2 % SDS, 20 % グリセリン, 2 % DTT, 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)) を添加し、25 °C, 30分間放置することで可溶化された。このうちタンパク質12.5 μ gを12 % アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに供した。分離したタンパク質のCBB染色法及びタンパク質バンドのCBB染色強度の測定法は第2章の記述に従った。抗ADP/ATP透過担体抗体による免疫染色も第2章の方法に従った。

ADP透過活性の測定

架橋試薬を処理した後のSMPを2 μ g/mLのオリゴマイシンを含むSTE溶液に2 mg of protein/mLのタンパク質濃度になるよう懸濁した。懸濁液を0 °Cにて放置した後、20 μ M [3 H]ADP (比放射活性200 μ Ci/ μ mol) を添加し、0 °Cにて10秒間放置した。20 μ M BKAを添加することで取り込み反応を停止させた後、速やかに試料を陰イオン交換樹脂であるAG1-X8のミニカラムに通して未透過の 3 H]ADPを除去した。そのSMPを含む画分の放射活性をアロカ液体シンチレーションカウンター LSC-3500で測定することで、SMP試料のADP透過活性を求めた。

ジマレイミド誘導体のグルタチオン (GSH) 付加物生成反応の解析

還元型グルタチオン (GSH) は、0.2 mM EDTAを含む100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に100 μ Mの濃度で溶解した。この溶液300 μ Lに5 mMジマレイミド誘導体DMF溶液を3 μ L添加し、0 °Cにて所定時間反応させた。500 mMリン酸溶液200 μ Lを添加して、溶液のpHを2付近に移行させることで反応を停止させた。この反応液を0.45 μ mのシリンジフィルターで濾過した後、その内100 μ L分をTSK gel ODS-120Tカラム (0.46 x 15 cm : 東ソー) を用いた逆相HPLCに供した。溶出は1.0 mL/分の流速で、0.05 % TFAを含むアセトニトリルに0.9 %/分の直線濃度勾配下にて行った。各架橋試薬におけるアセトニトリル濃度勾配と溶出時間はそれぞれ、*o*-, *m*-, *p*-PDMが18.0 ~ 31.5 %, 15分間、BMMEが13.5 ~ 22.5 %, 10分間、BMHは18.5 ~ 40.5 %, 25分間、MDPDMが22.5 ~ 49.5 %, 30分間で行った。その溶出プロファイルは、波長210 nmの吸収度でモニターした。

第4章

ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の酵母細胞における機能的発現系の確立

4.1 緒言

ADP/ATP 透過担体 (AAC, ANT) は、ミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を司る膜タンパク質である。ウシ心筋の AAC (bhAAC) は、1975 年に初めてミトコンドリアから精製された AAC である [1, 2]。ウシには2種類の AAC アイソフォームが存在するが、bhAAC は、*bANTI* と称された遺伝子にコードされる 1 型アイソフォーム (*bANTI*) のみで構成されている [3]。加えて bhAAC はウシ心筋ミトコンドリア全タンパク質の約 10 % (w/w) を占め [4, 5]、この存在比率はラット肝臓におけるそれと比較すると 10 倍以上高い [5]。これらの理由から、bhAAC はウシ心筋ミトコンドリアやその反転膜小胞中での種々の解析や大量精製が非常に容易である。そのため、今日までに行われてきた ADP/ATP 透過担体の機能構造解析のほとんどは、bhAAC を標品として行われてきた [4-9]。

第2, 3章では、筆者も bhAAC を標品として化学修飾などのタンパク質化学的手法を用いて AAC の機能構造解析を行ってきた。その結果、bhAAC のマトリックス側親水性ループ (M1, M2, M3) の立体配置を明らかにし、特に基質輸送に伴ってループ M1 の立体配置が大きく変化することを見いだした [10-12]。また当研究室におけるこれまでの解析結果から、ループ M2 領域が bhAAC の主たる基質認識部位であることが強く示唆されている [13-15]。今後、bhAAC の透過機能発現機構を更に詳細に解明するには、このような親水性ループ領域中の各アミノ酸残基の機能的役割を解析する必要がある。部位特異的変異やカセット変異といった人為的変異導入による機能解析は、前述のような目的には非常に有効である。しかしながら、bhAAC においてはこのような遺伝子工学的的手法による解析の報告はなく、人為的な発現系の確立すら為されていない。そこで、本章では bhAAC 及び変異タンパク質の機能解析可能な発現系の確立を試みた。

4.1.1 宿主細胞の選択

宿主細胞の選択は、タンパク質の発現系を構築するうえで非常に重要である。まず、一般的に考えられるのが大腸菌 *E. coli* である。大腸菌は大量培養が可能であるため、タンパク質の大量取得を目的とした場合には非常に有効である。しかしながら、大腸菌にはミトコンドリアが存在しないため、ミトコンドリア膜タンパク質の多くは大腸菌で不溶性の封入体 (inclusion body) となることが報告されている [16-18]。この封入体を

大腸菌より精製し、サルコシルなどの可溶化剤で可溶化した後、リポソームに活性型として再構成することで、発現させた膜タンパク質の機能解析を行うことは可能である [17, 18]。しかしながら bhAAC の場合、大腸菌にその cDNA を導入し発現を誘導しても、その発現量は非常に微量であり、加えて発現誘導後に大腸菌の生育が完全に抑制されることが既に報告されている [16]。なお、筆者自身も同様の結果を得ている。従って、大腸菌は bhAAC 発現のための宿主細胞として不適である。

次に、高等生物由来の培養細胞が挙げられる。この場合、細胞内環境が生体内と同様であり、bhAAC は確実に機能体として発現すると考えられる。しかしながら、大量培養が困難であるため、ミトコンドリアやタンパク質の大量単離は困難である。また、実際に活性測定を行った場合、宿主細胞に内在する ADP/ATP 透過担体の活性を考慮に入れ補正する必要がある。従って、高等生物の培養細胞も宿主としては適切ではない。

大腸菌と高等生物の培養細胞の両者の利点を有し、かつそれぞれの欠点を補える宿主細胞として、現在高等生物のタンパク質の発現系に頻用されるのが、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である (以下、単に「酵母」と記す)。酵母はミトコンドリアを有する真核細胞であり、増殖速度も速くかつ大量培養も可能である。加えて 1 倍体細胞としても生育可能であることから、内在性の遺伝子破壊も簡単に行える。これらの点を考慮して、本研究では酵母細胞を bhAAC 発現用の宿主細胞として選択した。

4.1.2 酵母細胞の ADP/ATP 透過担体

酵母には *yAAC1* [19], *yAAC2* [20], *yAAC3* [21] と称される 3 つの異なる遺伝子にコードされた 3 種の AAC アイソフォーム (*yAAC1*, *yAAC2*, *yAAC3*) が存在し、それぞれ異なる発現調節を受けている [20-25]。酵母 AAC アイソフォームのうち、*yAAC2* は通常の好氣的条件下においてミトコンドリアに発現している AAC の大部分を占めており、この *yAAC2* のみが酸化的リン酸化反応に必須である [21, 26]。事実、*S. cerevisiae* の酸化的リン酸化能を欠損させる自然変異として有名な *op1* (*pet9*) 変異は、*yAAC2* の 96 番目のアルギニンがヒスチジンに変異することに起因している [21]。*yAAC1* は通常の好氣的条件下で発現しているが、その発現量はタンパク質レベルでの検出が困難なほど低く [26]、その分子活性も *yAAC2* の約 40 % 程度である [27]。このため *yAAC1* は、*yAAC2* 遺伝子欠損による酸化的リン酸化能の欠落を回復させることはできない [26]。*yAAC3* は通常の好氣的条件下では発現せず、無酸素条件下において発現することが報告されている [22]。

これら 3 種の酵母 AAC は、グルコースやガラクトースといった解糖反応による ATP 産生系を亢進する炭素源を含有する培地中での生育には必須ではないので [20]、これら AAC 遺伝子的人為的破壊株の調製は非常に容易である。既に各種 AAC 欠損株が調製

され、その性状が詳細に解析されている [20-22]。また、近年この AAC 欠損酵母細胞を宿主として、*yAAC2* の部位特異的変異体の機能解析が盛んに行われている [28-33]。しかしながら、*yAAC2* は bhAAC などの高等生物の AAC との相同性は 50 % 未満と比較的低く [7]、これらの解析結果が果たして高等生物の AAC に応用できるのか、また過去の bhAAC を用いた解析結果が酵母 AAC に応用できるのかという点については疑問が残る。

以上の知見をもとに、本章では内在性の AAC 遺伝子を破壊された酵母細胞を宿主とした bhAAC の発現系の構築を試みた。その結果、酵母細胞では bhAAC は非常に発現しにくいことが明らかとなった。しかしながら、bhAAC の推定 2 次構造上における細胞質側に突出した N 末端領域 11 残基分を *yAAC2* (26 残基) 及び *yAAC1* (16 残基) の相当領域と置換したキメラ bhAAC では、native な bhAAC と比較して、その発現量が飛躍的に高いことを見出した。また、これらキメラ bhAAC は、native な bhAAC の分子活性を保持していたことから、これらキメラ bhAAC の発現系を用いることで bhAAC の遺伝子工学的な解析が可能になった [34]。なお、本章における「機能発現」とは、「タンパク質として翻訳された AAC が、ADP/ATP 輸送活性を発現できるように正常な立体構造でミトコンドリア内膜中に局在すること」と定義する。

4.2 結果

4.2.1 ADP/ATP 透過担体欠損酵母細胞での bhAAC 及び yAAC2 の機能的発現

図 4-1 には、今回構築した酵母細胞における bhAAC の発現系の概略図を示す。まず、宿主固有の AAC の影響を除去する目的で、野生型酵母 1 倍体株 W303-1B (以下、Wild-type と記す) の *yAAC1* 及び *yAAC2* 遺伝子を人為的に破壊することで AAC 欠損株 WB-12 を調製し、これを宿主細胞として用いた (詳細は実験方法の項参照)。緒言にて記述したように、酵母細胞には固有の AAC 遺伝子が 3 種存在するが、このうち *yAAC3* は通常の好氣的条件下では発現しないので [22]、今回の遺伝子破壊の対象からは除外した。なお、WB-12 細胞では、通常の培養条件下で *yAAC3* が mRNA レベルでも発現していないことをノザンプロット解析により確認した (データは示さない)。次に、導入する AAC の発現が酵母固有の AAC と同じ転写調節を受ける様にする目的で、*yAAC2* 遺伝子の 5'側上流プロモーター領域約 1 kbp [24] が挿入された発現ベクター pRS314-YA2P (低コピー (YCp) 型) と pYO326-YA2P (高コピー (YEp) 型) の 2 つのプラスミドを構築し (実験方法の項参照)、これらを発現ベクターとして使用した。発現させる AAC の cDNA は PCR によって調製し、この際プライマーにより、その 5'及び 3'末端にそれぞれ *Nde* I 及び *Bam* H I の切断部位を導入した。この cDNA の *Nde* I - *Bam* H I 断片を発現ベクターの *yAAC2* プロモーターの 3'末端に挿入することで構築した発現プラスミドを用いて、WB-12 を形質転換させた。なお本章では、得られた形質転換体を、導入した発現プラスミド名つまり“ベクター型/AAC 名”で記す。例えば、YCp/bhAAC は

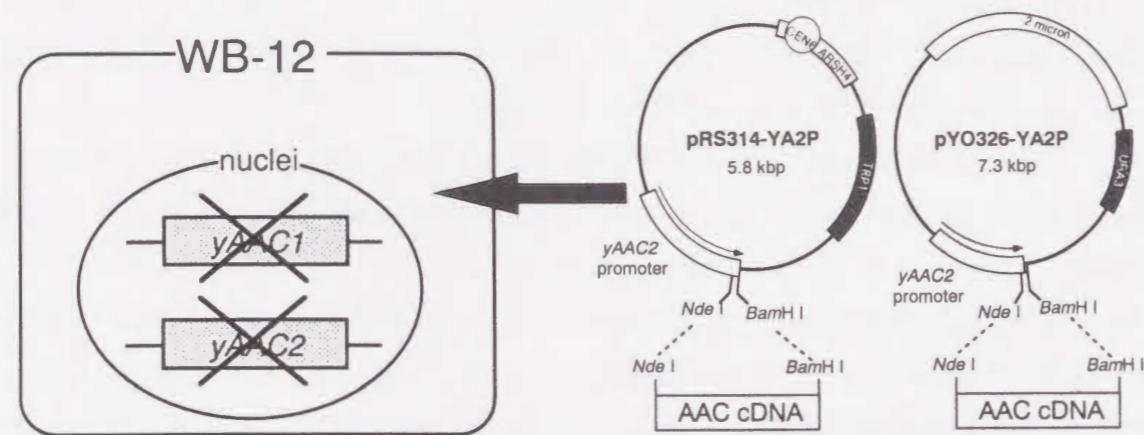


図 4-1 今回構築した酵母細胞における AAC 発現系の概略

発現ベクターとして *yAAC2* 遺伝子のプロモーター領域を有する低コピー型 (細胞内コピー数 1, 2 個) ベクターである pRS314-YA2P もしくは高コピー型 (細胞内コピー数 20 ~ 50 個) ベクターである pYO326-YA2P を調製した。各 AAC の cDNA は *yAAC2* プロモーター領域下流の *Nde* I - *Bam* H I サイトに挿入した。こうして構築した発現プラスミドで、*yAAC1*, *yAAC2* 遺伝子が破壊された 1 倍体酵母細胞 WB-12 を形質転換した。得られた形質転換体で各 AAC の機能発現を解析した。

bhAAC の cDNA が挿入された低コピー型の発現プラスミドで形質転換された WB-12 細胞又はその発現プラスミド自身を意味する。

まず、この発現系の有効性を確認する目的で、酵母細胞で排他的に発現している *yAAC2* をこの発現系により人為的に発現させることを試みた。*yAAC2* の cDNA を YCp 型及び YEp 型の発現ベクターにサブクロニングし、これらを用いて WB-12 を形質転換させた。WB-12 細胞は、AAC 遺伝子が破壊されたことにより、酸化的リン酸化能が完全に欠落しているため、グリセリン寒天培地のような非発酵炭素源培地上では生育することができない (図 4-2)。ところが、YCp/*yAAC2* 又は YEp/*yAAC2* により形質転換された WB-12 細胞は、wild-type である W303-1B と同様にグリセリン寒天培地上で生育した (図 4-2)。また、グリセリン液体培地中では、W303-1B 及び YCp/*yAAC2*, YEp/*yAAC2* が約 4 時間の倍加時間で増殖したのに対し、WB-12 では増殖が観察されなかった。これらの結果から、今回構築した発現ベクターを用いて WB-12 細胞に導入された *yAAC2* が、十分にタンパク質として機能を有した状態で発現し、WB-12 において欠落していた酸化的リン酸化能を回復させたことが示され、今回構築した発現系が利用可能なものであることが確認された。

以上の結果を踏まえ、次に bhAAC の cDNA を WB-12 に導入し、同様にその形質転換体のグリセリン寒天培地上での生育を観察した (図 4-2)。その結果、YCp/bhAAC は全く生育が観察されなかった。更に、bhAAC の細胞内コピー数を増加させた

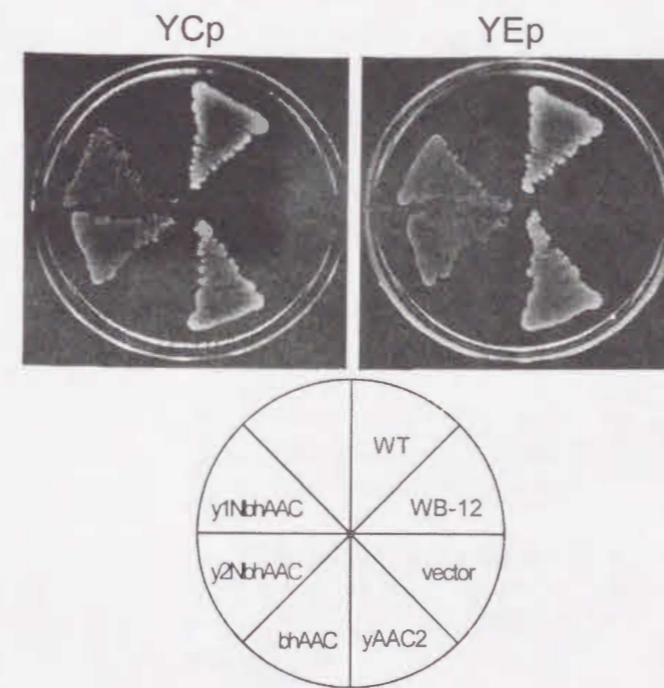


図 4-2 各酵母株の Glycerol 寒天培地上での生育

各 AAC の cDNA を低コピー (YCp) 型及び高コピー型 (YEp) 型ベクターによって AAC 欠損酵母細胞 WB-12 に導入し得た各形質転換体の培養液を YPGly 寒天培地に線書きし、30 °C 定温条件下で 5 日間放置した。WT は、野生型 (wild-type) W303-1B 細胞を、WB-12 は *yAAC1*, *yAAC2* 両遺伝子が欠損した酵母細胞 WB-12 をそれぞれ示す。vector は、AAC の cDNA を挿入していない発現ベクターのみで形質転換された WB-12 細胞を示す。*yAAC2* 及び bhAAC, *y2NbhAAC*, *y1NbhAAC* は、それぞれの AAC の発現プラスミドによって形質転換された WB-12 細胞を示す。

YEp/bhAAC でも液体培地中での倍加時間が 50 時間以上かかる非常に遅い増殖しか観察されなかった。以上の結果から、bhAAC がこの酵母細胞内でほとんど機能発現していないことが明らかとなった。

YCp/bhAAC 及び YEp/bhAAC 形質転換体から単離したミトコンドリア中の bhAAC を、bhAAC タンパク質全長 (図 4-3B) 又は bhAAC に特異的な配列のペプチド (His³⁹ - Ile⁶⁰) (図 4-3C) を認識する特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出することを試みた。前者の抗体の場合、既に yAAC2 とも交差結合することが報告されているが (図 4-3B, lane WT)、後者は bhAAC に特異的で yAAC2 とは反応しない (図 4-3C, lane WT)。図 4-3 にて示すように、Wild-type (WT) 及び YCp/yAAC2, YEp/yAAC2 では、発現した yAAC2 のバンドが 34 kDa の位置に CBB 染色 (図 4-3A) と免疫染色 (図 4-3B) の両方で観察された。しかしながら、ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) 中で検出されたような 30 kDa の bhAAC のバンドは、YEp/bhAAC では抗 bhAAC 抗体を用いた免疫染色では非常に弱い染色強度で検出された (図 4-3B)。なお、より特異的な抗ペプチド抗体を用いると、この YEp/bhAAC の bhAAC バンドはより可視的に検出できた (図 4-3C)。一方、YCp/bhAAC ではどちらの抗体を用いても bhAAC のバンドを検出できなかった。これらの結果は、bhAAC が、低コピー型ベクターを用いた形質転換体では全くミトコ

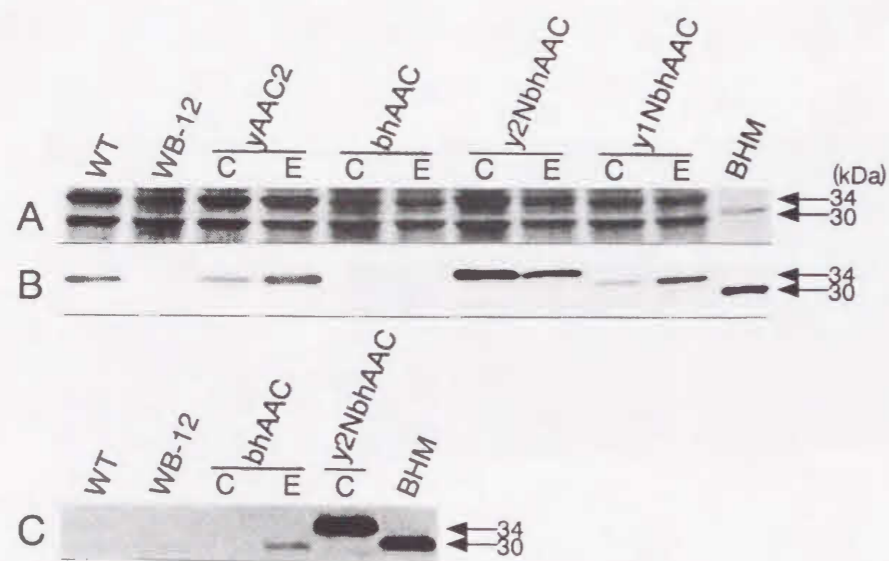


図 4-3 酵母ミトコンドリアに発現した各 AAC の検出

各酵母細胞から単離したミトコンドリアのタンパク質 20 μ g を 10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した。分離後のタンパク質を CBB 染色 (A)、抗 bhAAC 抗体 (B) 又は抗 bhAAC ペプチド (His³⁹-Ile⁶⁰) 抗体を用いた免疫染色により検出した。各レーンの表示は図 4-3 と同じであり、C と E は形質転換に用いた発現ベクターが、それぞれ低コピー型と高コピー型であることを示す。BHM はウシ心筋ミトコンドリアタンパク質 2.5 μ g を泳動した結果を示す。

ンドリア中に機能発現しなかったことと、高コピー型ベクターを用いた形質転換体でも非常にわずかにしか発現しなかったことを示しており、このため WB-12 の酸化的リン酸化を回復できなかったことが明らかとなった。

4.2.2 ADP/ATP 透過担体欠損細胞におけるキメラ bhAAC の機能的発現

緒言にて言及したように、酵母細胞は高等生物のタンパク質、特にオルガネラの膜タンパク質を機能発現させるには非常に適した細胞であるにもかかわらず、bhAAC はなぜ発現しにくいのであろうか。外来遺伝子にコードされたタンパク質の発現レベルは、多くの場合その遺伝子の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列に依存している。つまり、これらの配列が宿主細胞に適さない場合、目的のタンパク質が正しく機能を有した状態で発現できない。その代表的な例として、コドン利用率の問題がある。すなわち、外来遺伝子中で使用されているコドンの tRNA が、その宿主細胞において極端に存在比の低いものである場合、そのタンパク質の合成が抑制される現象である。この問題は主として大腸菌にて真核生物のタンパク質の発現を試みる際に生じ、酵母と高等生物でもこのコドン利用率には違いがある [35]。しかしながら、今回発現させようとした bhAAC の cDNA で使用されたコドンの酵母細胞中での利用率 [35] を検討したところ、特に利用頻度の低いコドンは見られなかった。この結果から、少なくとも bhAAC の cDNA において利用されているコドンに問題はないことが明らかとなった。

次に、図 4-4 に示すように、bhAAC のアミノ酸配列 [6, 9] を酵母固有の yAAC2 [6, 28] 及び yAAC1 [7] のそれと比較検討した。いずれの AAC も 300 個程度のアミノ酸か

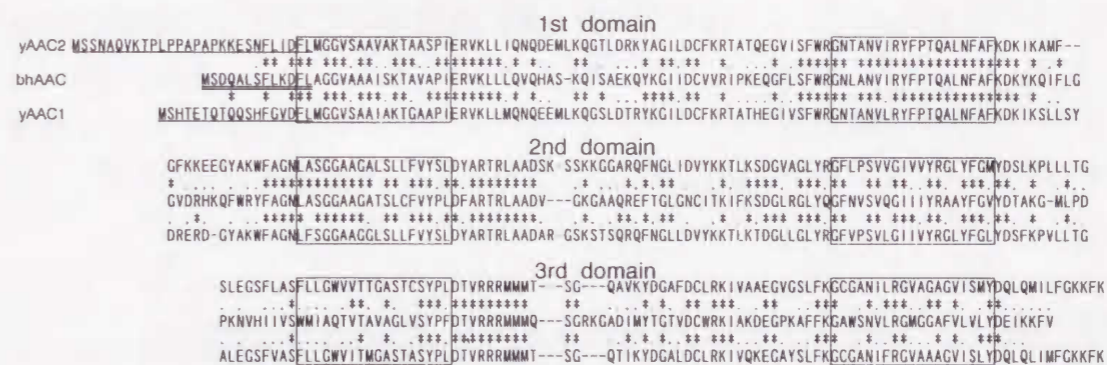


図 4-4 yAAC1, yAAC2 と bhAAC のアミノ酸配列の比較

bhAAC 及び yAAC2, yAAC1 のアミノ酸配列と推定 2 次構造は文献 [6,7,9,28] を参考にした。アスタリスクは、bhAAC と各酵母 AAC 間で保存されているアミノ酸残基を、ドットは同性質のアミノ酸残基をそれぞれ示している。四角で囲まれた領域は推定 2 次構造上の膜貫通領域を示す。キメラ bhAAC を調製する際には、2 重下線で示した bhAAC の N 末端領域が、下線で示した yAAC1 及び yAAC2 の相当領域と置換された。

らなり、約 100 残基ごとの 3 回繰り返し配列であるというミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー共通の特徴を保有している [7]。また、yAAC1 及び yAAC2 と bhAAC のアミノ酸配列を比較すると、その相同性は約 50 %程度であり、加えてその配列全体を通して高い残基類似性を示した (図 4-4)。しかしながら興味深いことに、これら AAC の細胞質側に突出した N 末端領域は、その残基数及び配列が全く異なっていた。この点に着目し、次に bhAAC の細胞質側に突出した N 末端領域 11 残基を、これに相当する yAAC2 (26 残基) 又は yAAC1 (16 残基) の N 末端領域と置換したキメラ bhAAC である y2NbhAAC と y1NbhAAC の酵母 WB-12 細胞における機能発現を検討した。

まず、y2NbhAAC をコードする cDNA を YCp 型又は YEp 型の 2 種類の発現ベクターに組み込み、これを WB-12 に導入した。その結果、図 4-2 に示すように、その形質転換体である YCp/y2NbhAAC 及び YEp/y2NbhAAC は、共にグリセリン寒天培地上で顕著に生育した。また、これらのグリセリン液体培地中での倍加時間は共に約 8 時間であり、これは同一培養条件下における wild-type (WT) や YCp/yAAC2, YEp/yAAC2 と比較しても約 2 倍程度であった。また、図 4-3 に示すように、CBB 染色 (A)、抗 bhAAC 抗体を用いた免疫染色 (B) のいずれにおいても、約 34 kDa の y2NbhAAC バンドが明らかに検出されたことから、y2NbhAAC が両形質転換体のミトコンドリア膜中に十分量機能的に発現していることが明らかとなった。

同様に、y1NbhAAC についても検討した。その結果、YCp/y1NbhAAC 及び YEp/y1NbhAAC いずれも、y2NbhAAC の場合と同様にグリセリン寒天培地上で顕著に生育し (図 4-2)、それぞれの液体培地中での倍加時間は、24 時間と 8 時間であった。また、いずれの形質転換体でも 32.5 kDa の y1NbhAAC が酵母ミトコンドリア中に十分量発現していた (図 4-3A,B)。以上結果より、WB-12 細胞の酸化的リン酸化能の欠落は、y2NbhAAC もしくは y1NbhAAC を導入することにより、顕著に機能補填されたことが明らかとなり、bhAAC の N 末端領域をこれに相当する yAAC2 又は yAAC1 の N 末端領域と置換することにより、酵母細胞における bhAAC の機能的発現が亢進されたといえる。

4.2.3 酵母ミトコンドリアにおける各種 ADP/ATP 透過担体発現量の定量

次に、各種酵母細胞のミトコンドリア膜中に発現した AAC 量を抗 bhAAC 抗体による免疫染色強度から算出した (詳細は実験方法の項参照)。まず、各種形質転換体から単離したミトコンドリアをトリトン X-100 で可溶化した後、ヒドロキシアパタイトゲルに対する非吸着画分を回収することで、各種 AAC を部分精製した。この画分を用いて、各 AAC における単位量当たりの抗 bhAAC 抗体による相対免疫染色強度 (relative

immunoreactivity : RIR) を算出した。bhAAC を除く他の AAC はそれぞれの形質転換体から単離したミトコンドリアを試料として用いた。bhAAC は酵母細胞では発現しにくいので、ウシ心筋ミトコンドリアを試料として用いた。その結果、各 AAC の RIR は bhAAC のそれを 100 %とすると、yAAC2 が 22 % (± 2 % S.D.)、y2NbhAAC 及び y1NbhAAC がそれぞれ 96 % (± 4 % S.D.) と 97 % (± 4 % S.D.) であった。この結果から、両キメラ bhAAC の抗 bhAAC 抗体に対する反応性は、native な bhAAC のそれとほとんど同一であることと、yAAC2 の反応性は bhAAC のその約 20 %程度しかないことが明らかとなった。

更に、各形質転換体のミトコンドリア中の AAC を抗 bhAAC 抗体を用いて免疫染色し (図 4-3B)、その染色強度を各 AAC の RIR と標準物質とした精製 bhAAC の単位量 (mol) 当たりの免疫染色強度から各 AAC 量を求めた。表 4-1 にその結果を記す。まず、この方法で算出されたウシ心筋ミトコンドリア中の bhAAC 量 (2.65 nmol/mg of protein)

表4-1 各種ミトコンドリアのAAC含量と発現したADP/ATP透過担体のADP透過活性

Source of AAC	AAC ^a (nmol AAC/mg of protein)	V _{ADP} ^b (mol ADP/mol of AAC/min)
W303-1B	0.79 \pm 0.08 ^c	90.0 \pm 14.3 ^c
WB-12	n.d. ^d	n.d. ^d
YCp/yAAC2	0.72 \pm 0.05 ^c	86.7 \pm 16.7 ^c
YEp/yAAC2	3.08 \pm 0.45 ^e	n.d. ^e
YCp/bhAAC	n.d. ^d	n.d. ^d
YEp/bhAAC	0.008 \pm 0.004 ^f	18.8 \pm 10.1 ^f
YCp/y2NbhAAC	0.60 \pm 0.12	22.4 \pm 5.5
YEp/y2NbhAAC	0.44 \pm 0.06 ^g	25.9 \pm 9.6 ^g
YCp/y1NbhAAC	0.09 \pm 0.02 ^h	31.7 \pm 5.7 ^h
YEp/y1NbhAAC	0.40 \pm 0.07	27.1 \pm 5.4
Bovine heart	2.65 \pm 0.47	28.4 \pm 5.2

a:各細胞から単離したミトコンドリアタンパク質当たりの発現したAACの含量。測定方法は実験方法の項参照。値は3回の試験の平均値 \pm 標準偏差で示す。

b:ミトコンドリア中の各AACの分子活性。各細胞から単離したミトコンドリアのADP取り込み反応の初速度をミトコンドリアのAAC含量により除することで算出した。測定方法は実験方法の項参照。値は3回の試験の平均値 \pm 標準偏差で示す。

c: YEp/yAAC2に発現したyAAC2のRIR値を用いた。

d:ミトコンドリアのAAC含量が低すぎて算出できなかった。

e: ADP取り込み活性が速すぎて初速度を測定できなかった。

f:ウシ心筋ミトコンドリア中のbhAACのRIR値を用いた。

g: YCp/y2NbhAACに発現したy2NbhAACのRIR値を用いた。

h: YEp/y1NbhAACに発現したy1NbhAACのRIR値を用いた。

と W303-1B のミトコンドリア中の AAC 量 (0.79 nmol/mg of protein) は過去に報告された特異的阻害剤 CATR のミトコンドリア結合量より算出した値 (それぞれ 2.0 ~ 2.5 nmol/mg of protein [5] と 0.64 nmol/mg of protein [29]) とほぼ同じ値であったことから、この定量法が妥当であることを確認した。加えて、YCp/yAAC2 のミトコンドリアにおける yAAC2 量と W303-1B における AAC 量はほぼ同じ値を示し、YEp/yAAC2 ではこれらの約 4 倍量発現していた。この結果から、発現ベクター上の yAAC2 プロモーターが酵母固有の同プロモーターと同様の転写を行っていることと、YEp 型の発現ベクターの方が YCp 型よりも高い細胞内コピー数を維持していることが強く示唆された。

酵母細胞中の bhAAC の発現量は高コピー型ベクターを用いた YEp/bhAAC でも非常に低く、同じベクターを用いた YEp/yAAC2 の 1/380 に過ぎなかった。y2NbhAAC の発現量は、低コピー型ベクターを用いた YCp/y2NbhAAC でも YCp/yAAC2 における yAAC2 のそれとほぼ同じ値を示した。しかしながら、高コピー型ベクターを用いた場合の発現量は、予想に反して低コピー型ベクターを用いたそれよりも低かった。また、YCp/y1NbhAAC のミトコンドリア中の y1NbhAAC は、YCp/y2NbhAAC における y2NbhAAC の約 15 %程度の発現量であった。一方、高コピー型ベクターを用いた場合 (YEp/y1NbhAAC) の y1NbhAAC のミトコンドリア発現量は、同型のベクターを用いた場合の y2NbhAAC の発現量とほぼ同量まで増加した。

4.2.4 酵母ミトコンドリアにおける各種 ADP/ATP 透過担体の ADP 透過活性

次に各酵母細胞から単離したミトコンドリアの ADP 取り込み活性を測定した。どの形質転換体のミトコンドリアの ADP 透過反応も、AAC の特異的阻害剤 CATR 及び BKA を前処理することで完全に阻害されたことから、これらミトコンドリアでの ADP 透過反応は、全面的に発現した AAC を介したものであると結論づけることができる。表 4-1 には 0 °C, pH 7.2 における各酵母細胞ミトコンドリアの AAC 分子当たりの ADP 取り込み反応の初速度 (v_{ADP}) を示した。つまり、この値はこの測定条件下における各 AAC の分子活性を示す値である。なお、YEp/yAAC2 は、取り込み活性が高すぎて v_{ADP} 値を決定できなかった。YCp/yAAC2 における yAAC2 の v_{ADP} 値は、wild-type における AAC のそれとほとんど変わらなかった。また、各形質転換株の bhAAC 及び y2NbhAAC, y1NbhAAC の v_{ADP} 値はウシ心筋ミトコンドリアにおける bhAAC のそれとほぼ同じ値を示した。これらの結果から、酵母細胞において発現させたキメラ bhAAC (y2NbhAAC, y1NbhAAC) は、ウシ心筋ミトコンドリアにおける bhAAC に匹敵する分子活性を有していることから、bhAAC の細胞質側に突出した N 末端領域を他の配列に置換しても、bhAAC の分子活性は保持されることがわかった。

4.2.5 各種 ADP/ATP 透過担体の酵母細胞における転写レベル

最後に、酵母細胞に導入した各 AAC の転写レベルを検討した。図 4-5 では各酵母細胞から単離した全 RNA をノザンプロット解析した結果を示す。各 AAC 間の転写レベルを比較できるようにする目的で、プローブには y2NbhAAC の yAAC2 由来配列に相当する Nde I - Nae I 断片 (yAAC2) と bhAAC 由来配列に相当する Nae I - BamH I 断片 (bhAAC) を使用した。yAAC2 のプローブを用いた場合、yAAC2 及び y2NbhAAC のシグナルが検出され、bhAAC 及び y1NbhAAC のシグナルは検出できなかった。一方 bhAAC のプローブを用いた場合、bhAAC 及び y2NbhAAC, y1NbhAAC のシグナルが検出され、yAAC2 のシグナルは検出できなかった。このとき、両プローブにハイブリダイズする y2NbhAAC (YCp/y2NbhAAC) のそれぞれのシグナル強度を標準として、各酵母細胞の mRNA 試料から検出されたそれぞれのプローブに対する相対シグナル強度を算出することで、全ての AAC の各酵母細胞における定常的な mRNA 量を相対値として比較した。その値を各レーンの下に記す。yAAC2 及び bhAAC, y2NbhAAC, y1NbhAAC の低コピー (YCp) 型形質転換体における mRNA 量はほとんど同じであった。また

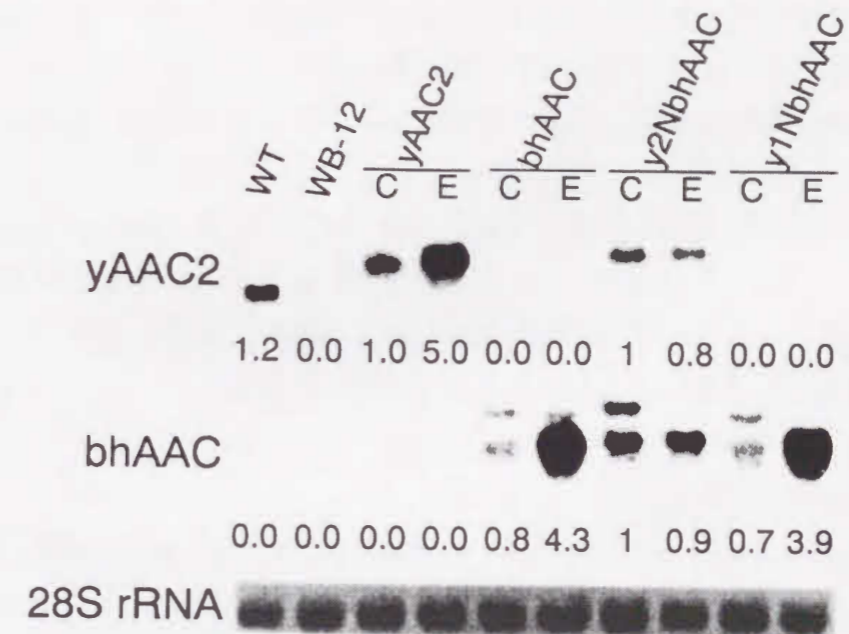


図 4-5 各酵母細胞の定常状態における各 AAC の転写レベル

各酵母細胞より単離した全 RNA 5 μ g をノザンプロット解析に供した。yAAC2 のパネルでは yAAC2 の cDNA の 87 bp Nde I-Nae I 断片を、bhAAC のパネルでは bhAAC の cDNA の 880 bp Nae I - BamH I 断片をそれぞれプローブとした結果を示す。28S rRNA のパネルはニトロセルロース膜のメチレンブルー染色により検出した 28S rRNA のバンドを示す。各レーンは、図 4-4 と同様に表記した。各レーン下の値は、YCp/y2NbhAAC のバンドのシグナル強度を標準とした各バンドの相対シグナル強度を示す。

y2NbhAAC を除く他の AAC の高コピー (YEp) 型形質転換体の mRNA 量は、同じ AAC の YCp 型形質転換体のそれと比較すると約 5 倍程度高かった。更に、YEp/y2NbhAAC の mRNA 量は、YCp/y2NbhAAC のそれよりも低く、これは図 4-3 及び表 4-1 における y2NbhAAC タンパク質のミトコンドリアでの発現量の結果に対応した。この結果から、cDNA の細胞内コピー数の増加に伴ったミトコンドリア中の y2NbhAAC タンパク質量の低下は、cDNA コピー数の増加が y2NbhAAC の mRNA 量の低下を引く起こすことに起因していることが明らかとなった。しかしながら、その原因については不明である。

この解析での最も重要な知見として、bhAAC を酵母細胞に導入した形質転換体から、yAAC2 や y2NbhAAC の場合とほぼ同量の mRNA が検出されたことから、bhAAC が酵母細胞で機能発現し難い原因は、転写レベルが低いためではないことが明らかとなった。

4.3 考察

4.3.1 構築した発現系の特徴と利点

ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー (第 1 章参照) に属する高等生物由来のミトコンドリア膜タンパク質 (AAC やリン酸透過担体など) のうち、現在までに酵母細胞にて機能発現に成功した例は、唯一ラットの脱共役タンパク質のみである [36-38]。しかしながら、この場合脱共役タンパク質の発現は、ガラクトース存在下で発現を誘導する誘導型の高発現プロモーターである *gal10-cyc1* に制御されていた [36]。このような誘導型のプロモーターを用いた場合、高発現が期待される一方で、培地や温度、pH といった培養条件が制限されるため、細胞レベル及びミトコンドリアレベルでの機能解析を考慮すると有効性に乏しい。特に AAC のように酸化的リン酸化反応という生体エネルギー産生反応に必須なタンパク質の場合、細胞レベルでの酸化的リン酸化能を解析することで、簡単に導入タンパク質の機能解析を行うことができる。この点を考慮して本研究にて構築した発現系では、内在性 AAC 遺伝子を破壊し、酸化的リン酸化能を欠落させた酵母細胞 WB-12 を宿主細胞として用いた。また、yAAC2 遺伝子のプロモーター領域を発現プロモーターとして使用し、導入した AAC が酵母固有の yAAC2 と同じ転写調節を受けるようにした。これにより、形質転換体の非発酵炭素源培地上での生育という細胞レベルの簡易な解析から、導入したタンパク質の機能発現を簡易に予測できるようになった。

加えて、y2NbhAAC は、細胞内コピー数が 1 個となる低コピー型の発現ベクターを用いて、酵母固有の yAAC2 の同等量で機能発現した (表 4-1)。このことから、今後、y2NbhAAC を用いて部位特異的変異タンパク質の機能解析を行う場合、この低コピー型ベクターを用いることで、復帰変異体解析 [39] が容易に行えるという点も利点のひとつである。

4.3.2 bhAAC の酵母細胞における機能発現

本章では、bhAAC を酵母細胞で機能的に発現させることを試みた。その結果、native な bhAAC は、酵母ミトコンドリア膜上にはほとんど発現しないことを見出した (図 4-4)。しかしながら、その発現は、bhAAC の推定 2 次構造において細胞質側に突出した N 末端領域 11 残基を、酵母 AAC (yAAC2, yAAC1) の相当領域と置換することにより顕著に亢進した (図 4-3)。更に、これらキメラ bhAAC (y2NbhAAC, y1NbhAAC) の発現は、AAC 遺伝子欠損酵母細胞である WB-12 の酸化的リン酸化能を十分回復させた (図 4-2)。S. cerevisiae の AAC 欠損細胞の機能補填を外来 AAC で成功させた例は、Schizosaccharomyces pombe [40] や Kluyveromyces lactis [41] といった他属の酵母株から

のみであり、高等生物由来のAACを酵母にて十分機能を保持した状態で発現させたのは本研究が初めてである [34]。

yAAC2を含めWB-12に導入したAACのミトコンドリアにおける発現量は、y2NbhAACを除いて、コードするcDNAの細胞内コピー数に依存して増加した (図4-3)。これは、細胞内コピー数の増加に伴った転写レベル (定常的なmRNA量) の増加によるものであることが、ノザンプロット解析の結果から明らかとなった (図4-5)。しかしながら、y2NbhAACの場合、逆にコピー数を増加させると、転写レベルが低下し (図4-5)、その結果ミトコンドリアでの発現量も低下した (図4-3, 表4-1)。現時点で、このような発現抑制の原因は不明であるが、おそらくy2NbhAACは酵母細胞中でのその発現量が一定量を越えると、酵母細胞に異物として認識されてしまい、酵母細胞内のRNaseやプロテアーゼが活性化され、その結果発現抑制が起こるものと考えられる。

4.3.3 ADP/ATP透過担体の機能発現におけるN末端領域の役割

y2NbhAAC及びy1NbhAACの酵母ミトコンドリア膜中でのADP透過活性を測定したところ、これらキメラbhAACの分子活性 (v_{ADP}) は、酵母ミトコンドリアやウシ心筋ミトコンドリアにおけるbhAACの分子活性とほぼ同じであった (表4-1)。この結果から、bhAAC及びyAAC2, yAAC1のN末端領域が、鎖長も構成アミノ酸組成及び配列もそれぞれで全く異なっているにも関わらず (図4-4)、キメラbhAACはnativeなbhAACと同様な透過機能を有していることが明らかになった。従って、細胞質側に突出したN末端領域

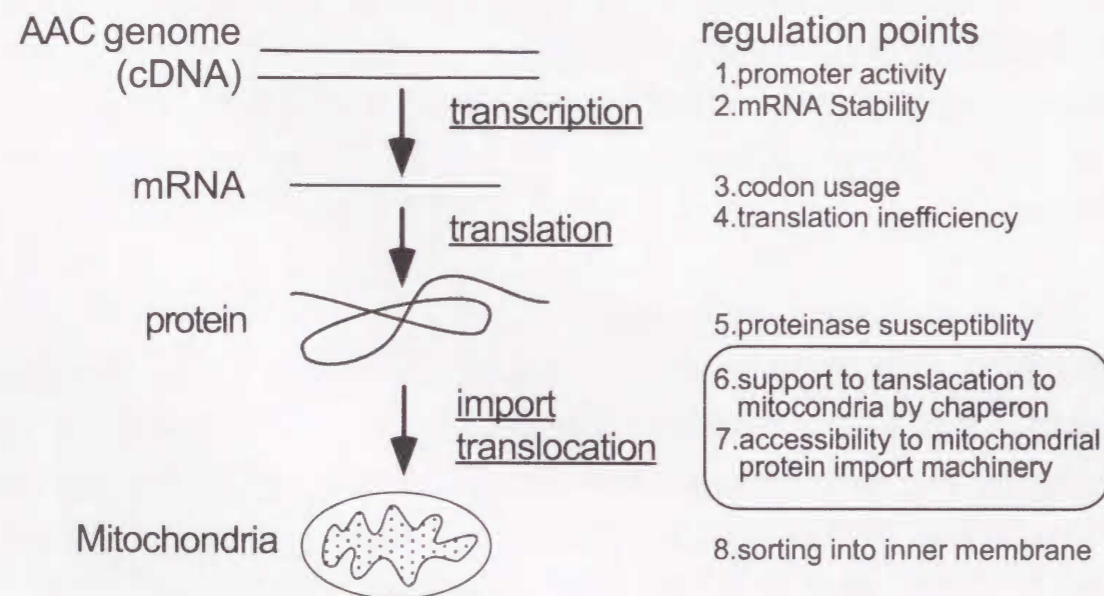


図4-6 ADP/ATP透過担体のミトコンドリアへの発現過程
yAAC2の細胞質側に突出したN末端領域は、網掛けで示した過程に関与すると考えられる。

は、AACの基質輸送機能に関与しないことが強く示唆された。

なぜ、bhAACは酵母細胞では機能発現しにくく、そのN末端領域を置換すると機能発現が亢進されたのであろうか。ノザンプロット解析の結果より、bhAACのmRNAは、酵母細胞中に同様に導入したyAAC2やキメラbhAACとほぼ同程度発現していることが見いだされた。この結果から、bhAACの酵母細胞中における転写レベルやmRNAの安定性に問題がないことが明らかとなった。ミトコンドリア膜タンパク質の発現機構において、転写以後に起こりうる問題として、(1) 翻訳段階が非効率であること、(2) bhAACのプロテアーゼ感受性が高いこと、(3) 酵母ミトコンドリア膜へのbhAACの移行局在化段階が非効率であることが考えられる (図4-6)。y2NbhAACやy1NbhAACが十分機能発現したことと、y2NbhAAC, y1NbhAACを調製する際、置換された領域はbhAAC全アミノ酸配列のわずか3%に過ぎないことを考慮すると、bhAACとキメラbhAACの間でプロテアーゼ感受性が大きく異なるとは考えにくい。また、翻訳が非効率化する原因としては、まず、結果にて記述したコドン利用率の問題があるが、前述の通りbhAACが利用するコドンの中で、酵母でのtRNAの発現率が低いコドンは存在しなかった。従って、bhAACの利用したコドンに問題はない。また、酵母細胞では、翻訳開始直後の初期ポリペプチド鎖が高次構造を取ることに伴い、その後のポリペプチド鎖の伸長反応が阻害される場合がある [42]。しかし、置換されたbhAACの11残基分のペプチド鎖の2次構造予測を行ったところ、ヘリックス構造などの特定の2次構造を取らないランダム構造であったことからこの可能性も否定される。従って、bhAACが酵母細胞中で翻訳の非効率を起こすとは考えにくい。以上のことから、酵母細胞におけるbhAACの発現抑制は、翻訳されたbhAACのミトコンドリアへの移行局在化の非効率であることに起因していると考えられる。

AACタンパク質のミトコンドリア移行局在化機構については、無細胞系で合成されたyAAC1と単離した酵母ミトコンドリアを用いた*in vitro*での解析が広く研究されている [43-45]。これらの報告では、yAAC1のGly⁷² - Arg¹¹¹の領域がミトコンドリアへの移行に重要であると結論づけられている [44]。実際、この領域は全生物種のAAC間を通じて最も相同性の高い第2膜貫通領域を含んでいる (図4-4)。しかしながら、今回の結果から、yAAC1やyAAC2のN末端領域が酵母におけるAACの発現に重要であることが示唆された。更に、我々はyAAC2をN末端側から5-6残基ずつ欠失させた欠失yAAC2の酵母ミトコンドリアにおける発現量を解析した結果、N末端領域の短縮化に依存して、yAAC2のミトコンドリアへの発現量は低下し、細胞質側への突出領域全てを欠失させたyAAC2はミトコンドリアに発現しないことを見いだしている [46]。これらの結果から、酵母AACのN末端領域特にyAAC2のN末端領域の配列が、ミトコンドリアへのyAAC2 (及びy2NbhAAC) の移行局在化を促進している可能性があるが、この点につい

ては今後更に詳細な解析が必要であると考え。

本研究で、筆者は、bhAACを固有のAAC遺伝子が破壊された酵母細胞中で、細胞質側に突出したN末端領域を酵母AACの相当領域と組み換えたキメラbhAACとして、機能的かつ多量にミトコンドリアに発現させることに世界で初めて成功した。bhAACは全てのAACアイソフォームの中で最も多角的に研究されているAACアイソフォームである。今後、この発現系を用いて変異bhAACの機能解析を行うことは、蓄積されている過去のデータと照合できるという点で、酵母AACを用いた同様の解析と比較すると非常に有効であり、今後のAACの構造機能解析の発展のためには、非常に重要な実験系を構築できたとと言える。

4.4 参考文献

- [1]Ricchio, P., Aquia, H., and Klingenberg, M., (1975) *FEBS Lett.* **56**, 129-132
- [2]Ricchio, P., Aquia, H., and Klingenberg, M., (1975) *FEBS Lett.* **56**, 133-138
- [3]Powell, S.J., Medd, S.M., Runswick, M.J., and Walker, J.E., (1989) *Biochemistry* **28**, 866-873
- [4]Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [5]Klingenberg, M., (1980) *J. Membrane Biol.* **56**, 97-105
- [6]Klingenberg, M., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 447-457
- [7]Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [8]Terada, H., and Majima, E., (1997) *Progr. Colloid Polym. Sci.* **106**, 192-197
- [9]Klingenberg, M., (1989) in: *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (A. Azzi, et al. Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 169-181
- [10]Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554
- [11]Hashimoto, M., Majima, E., Goto, S., Shinohara, Y., and Terada, H., (1999) *Biochemistry* **38**, 1050-1056
- [12]Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y., Onishi, M., and Terada, H., submitted for publication
- [13]Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181-22187
- [14]Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
- [15]Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
- [16]Fiermonte, G., Walker, J.E., and Palmieri, F., (1993) *Biochem. J.* **294**, 293-299
- [17]Xu, Y., Mayor, J.A., Gremse, D.A., Wood, D.O., and Kaplan, R.S., (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 783-789
- [18]Fiermonte, G., Dolce, V., and Palmieri, F., (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22782-22787
- [19]Adrian, G.S., McCammon, Montgomery, D.L., and Douglas, M.G., (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 626-634
- [20]Lawson, J.E., and Douglas, M.G., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14812-14818
- [21]Kolarov, J., Kolarova, N., and Nelson, N., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12711-12716
- [22]Drgon, T., Šabová, L., Nelson, N., and Kolarov, J., (1991) *FEBS Lett.* **289**, 159-162
- [23]Gavurníková, G., Šabová, L., Kiššová, I., Havierník, P., and Kolarov, J., (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 759-763
- [24]Betina, S., Gavurníková, G., Havierník, P., Šabová, L., and Kolarov, J., (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 651-657
- [25]Šabová, L., Zeman, I., Supek, F., and Kolarov, J., (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 547-553
- [26]Lawson, J.E., Gawaz, M., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14195-14201
- [27]Gawaz, M., Douglas, M.G., and Klingenberg, M., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14202-14208
- [28]Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1159-1170

- [29]Klingenberg, M., Gawaz, M., Douglas M.G., and Lawson, J.E., (1992) in: *Molecular Mechanisms of Transport* (Quagliariello, E., and Palmieri, F., Eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 187-195
- [30]Le Saux, A., Roux, P., Trézéguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A.-C., Vignais, P.V., Brandolin, G., and Lauquin, G.J.-M., (1996) *Biochemistry* **35**, 16116-16124
- [31]Roux, P., Le Saux, A., Trézéguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A.-C., Vignais, P.V., Lauquin, G.J.-M., and Brandolin, G., (1996) *Biochemistry* **35**, 16125-16131
- [32]Müller, V., Basset, G., Nelson, D.R., and Klingenberg, M., (1996) *Biochemistry* **35**, 16132-16143
- [33]Heidkämper, D., Müller, V., Nelson, D.R., and Klingenberg, M., (1996) *Biochemistry* **35**, 16144-16152
- [34]Hashimoto, M., Shinohara, Y., Majima, E., Hatanaka, T., Yamazaki, N., and Terada, H., (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1409**, 113-124
- [35]Bennetzen, J.L., and Hall, B.D., (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3026-3031
- [36]Murdza-Inglis, D.L., Patel, H.V., Freeman, K.B., Jezek, P., Orosz, D.E., and Garlid, K.D., (1991) **266**, 11871-11875
- [37]Bathgate, B., Freebairn, E.M., Greenland, A.J., and Reid, G.A., (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 363-370
- [38]Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meryrueis, C., Zaragoza, P., Miroux, B., Ricquier, D., Bouillaud, F., and Rial, E., (1993) *Biochem. J.* **296**, 693-700
- [39]Nelson, D.R., Felix, C.M., and Swanson, J.M., (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 285-308
- [40]Couzin, N., Trezeguet, V., Le Saux, A., and Lauquin, G.J., (1996) *Gene* **171**, 113-117
- [41]Viola, A.M., Galeotti, C.L., Goffrini, P., Ficarella, A., and Ferrero, I., (1995) *Curr. Genet.* **27**, 229-233
- [42]Clements, J.M., Laz, T., and Sherman, F., (1989) in *Yeast Genetic Engineering* (Barr, P.J., Brake, A.J., and Valenzuela, P., Eds.), Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing, Stoneham, MA, Chapt. 5
- [43]Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M., and Neupert, W., (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14851-14854
- [44]Smagula, C.S., and Douglas, M.G., (1988) *J. Cell. Biochem.* **36**, 323-327
- [45]Smagula, C.S., and Douglas, M.G., (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6783-6790
- [46]畑中貴, 橋本満, 真島英司, 篠原康雄, 寺田弘 (1998) 第20回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (於 富山) 講演要旨集 pp. 151-154
- [47]Treco, D.A., and Lundblad, V., (1993) in: *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, F.M., et al. Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapt. 13.1
- [48]Sikorski, R.S., and Hieter, P., (1989) *Genetics* **122**, 19-27
- [49]Schiestl, R.H., and Gietz, R.D., (1989) *Curr. Genet.* **16**, 339-346
- [50]Southern, E.M., (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- [51]Abe K., Shinohara, Y., and Terada, H., (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1398**, 347-352
- [52]Qadota, H., Ishii, I., Fujiyama, A., Ohya, Y., and Anraku, Y., (1992) *Yeast* **8**, 735-741
- [53]Laemmli, U.K., (1970) *Nature* **227**, 680-685
- [54]Knirsch, M., Gawaz, M.P., and Klingenberg, M., (1989) *FEBS Lett.* **244**, 427-432
- [55]Collart, M.A., and Oliviero S., (1993) in: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., et al. Eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapt. 13.12
- [56]Shinohara, Y., Shima, A., Kamida, M., and Terada, H., (1991) *FEBS Lett.* **293**, 173-174
- [57]Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989) *Molecular Cloning*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Chapt. 10.13

4.5 実験方法

材料と試薬

酵母シャトルベクターpRS305 (integrate type), pRS314 (single-copy type), pYO326 (multi-copy type) : 理化学研究所 中野 明彦博士より恵与

出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae* 1倍体株 W303-1B (MAT α *ade2-1 leu2-3, 112 his3-22, 15 trp1-1 ura3-1 can1-100*) [20] : 大阪大学医学部 清水 重臣博士より恵与

ウサギ抗bhAAC抗血清 : University of München, Prof. M. Klingenbergより恵与

BKA : Delft University of Technology, Prof. Duineより恵与

Ex Taq Polymerase : 宝酒造 (株)

[¹⁴C]ADP : Du-pont New England Nuclear

[α -³²P]dCTP : Du-pont New England Nuclear

CATR : Sigma

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

培養条件

出芽酵母*S. cerevisiae*は、特に記されていない限り、YP培地 (1 % yeast extract, 2 % bacto-peptone及び炭素源として2 % グルコース(YPD), 2 % ガラクトース(YPGal)又は3 % グリセリン(YPGly)のいずれかを含む) 中で30 °C定温条件下で振盪培養した。形質転換体の選択を行う場合には、最小培地 (0.67 % yeast nitrogen base w/o amino acid, 2 % グルコース) に必要な栄養源を所定濃度 [47] 添加した培地を用いた。これらを寒天培地として使用する際は、液体培地に2 % Bacto-Agar (Difco Laboratories) を添加して固形化したものを使用した。

酵母AAC遺伝子破壊株の調製

酵母のAAC遺伝子欠損株WB-12 (*aac1::LEU2, aac2::HIS3*, その他の遺伝型はW303-1Bと同型) は、過去の報告 [26, 28] に従って線状DNAを用いた相同組み換えによる遺伝子破壊法を用いて野生型酵母1倍体株 W303-1Bより調製した。

第1に*yAAC1*遺伝子の破壊を行った (図4-7A)。まず、W303-1Bより単離した染色体DNAを鋳型とし、HT513 (5'-GGATCCAAAAGTACTGCGAA, 5'側コード鎖 -1262 ~ -1243 [23]) とHT426 (5'-TAGCTTGGCGTACGTAAACG, 3'側アンチセンス鎖1117 ~ 1098 [19]) を増幅用プライマーを用いたPCRにより、*yAAC1*遺伝子 (1 ~ 939) 全長を含む2.48 kbpのDNA断片を調製し、サブクローニングした。次に、この断片から1.08 kbpの5'側非翻訳領域 (-1261 ~ -185) と0.48 kbpの3'側翻訳領域 (639 ~ 1117) の2つのDNA断

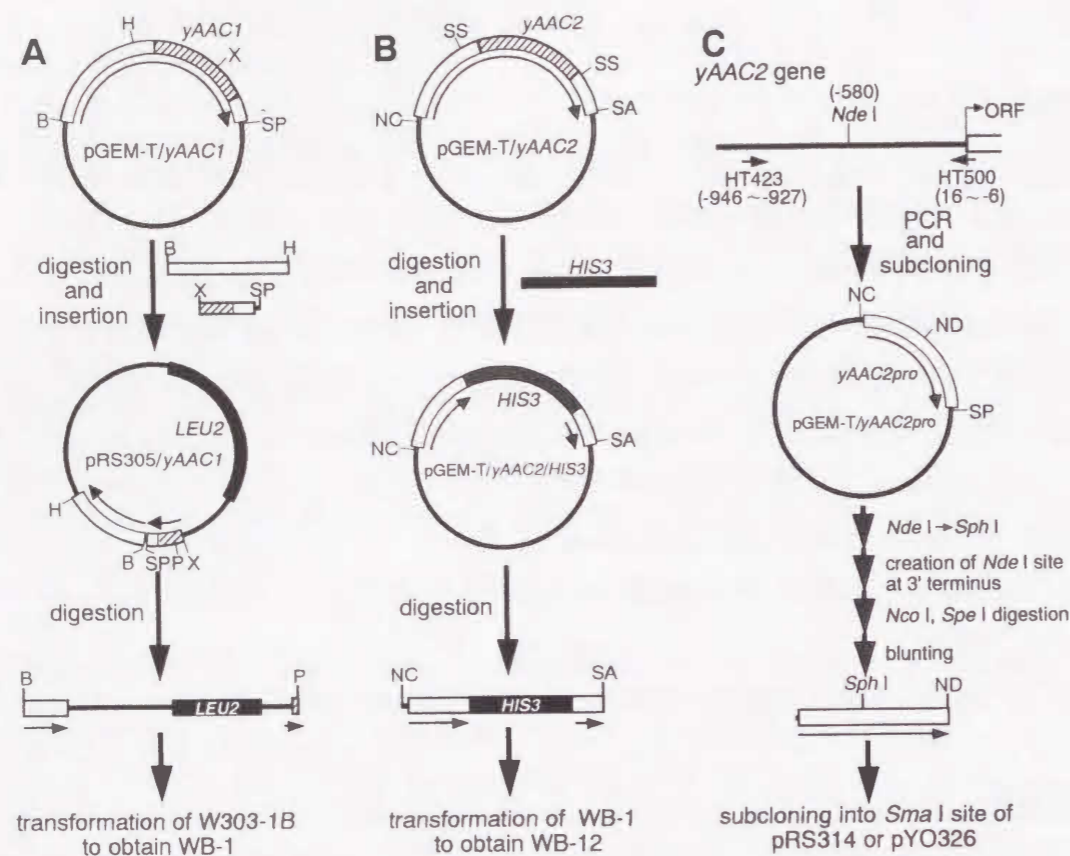


図 4-7 酵母細胞における *yAAC1* (A), *yAAC2* (B) 両遺伝子の破壊法及び発現ベクター用の *yAAC2* プロモーターの調製法 (C)

プラスミド上の白抜き及び斜線部は、それぞれの遺伝子の非コード領域とコード領域を示す。矢印は遺伝子の向きを示す。各制限酵素の切断部位は、それぞれ B: *Bam*HI, H: *Hind*III, X: *Xba*I, SP: *Spe*I, NC: *Nco*I, SS: *Ssp*I, ND: *Nde*I を示す。

片を調製し、これらを酵母細胞内での複製起点を有さない integrate type のプラスミドである *pRS305* [48] にサブクローニングした (*pRS305/yAAC1*)。このプラスミドを制限酵素にて線状化した 2 本鎖 DNA を用いて、W303-1B を酢酸リチウム法 [49] にて形質転換した。これにより得られた形質転換体 WB-1 の染色体では、*yAAC1* 遺伝子が開始コドンからおよそ 2/3 (1 ~ 638) 欠落していた。このことは、WB-1 の染色体 DNA のサザンプロット解析 [50] により確認した。

第 2 に、その WB-1 細胞の *yAAC2* 遺伝子を完全破壊した (図 4-7B)。まず、W303-1B の染色体 DNA を鋳型とし、HT423 (5'-ATTAGCCACGTCATCCCTT, 5'側コード鎖 -946 ~ 927 [24]) と HT424 (5'-GTTCTCTAGGTCGACGTCTA, 3'側アンチセンス鎖 1455 ~ 1436 [20]) を増幅用プライマーとして用いた PCR により、*yAAC2* 遺伝子 (1 ~ 957) 全長を含む 2.39 kbp の DNA 断片を調製し、サブクローニングした。次に、調製した DNA 断片中の

yAAC2 遺伝子全長を含む領域をマーカー遺伝子である *HIS3* と組み換えた DNA 断片を調製し (*pGEM-T/yAAC2/HIS3*)、これを用いて WB-1 を形質転換した。これにより得られた形質転換体 WB-12 が、*yAAC1*, *yAAC2* 両遺伝子を破壊された細胞であることは、染色体 DNA のサザンプロット解析により確認した。

各 AAC をコードする DNA の構築

本章で解析した bhAAC, *yAAC2* 及びこれらの組み換え体をコードする DNA の調製は、PCR により調製した。このとき、発現ベクターへの組み込みを容易にする目的で、上流と下流の各プライマーの DNA 配列を一部改変し、それぞれ *Nde*I と *Bam*HI の制限酵素の切断部位を導入した。bhAAC の cDNA は、ウシ心筋から単離した RNA (Clontech 27288) の逆転写産物を調製し [51]、これを鋳型とし、HT431 (5'-CCGCTGTCcatATGAGCGA-TCA, 5'側コード鎖, -11 ~ 11 [3], 小文字は変異として導入された塩基を下線部は創成された制限酵素の切断部位を示す) と HT432 (5'-CAATGGATCTGGAtCCAATG, 3'側アンチセンス鎖, 936 ~ 917 [3]) をプライマーとして PCR を行った。*yAAC2* の cDNA は、W303-1B の染色体 DNA を鋳型として、HT499 (5'-ATAcatATGTCTTCTAACGCC, 5'側コード鎖, -6 ~ 16 [20]) と HT501 (5'-AAGgATCcAGCCAGATTAGAC, 3'側アンチセンス鎖, 978 ~ 958 [20]) をプライマーとして PCR を行った。*y2NbhAAC* や *y1NbhAAC* の cDNA を調製するために、まずは、*yAAC2* 及び *yAAC1* の N 末端領域を W303-1B の染色体 DNA を鋳型とした PCR により調製した。この際、bhAAC の N 末端領域との組み換えを容易にするために 5' 側に *Nde*I, 3' 側に *Nae*I の切断部位を導入した。*yAAC2* の N 末端領域 (*Met*¹ ~ *Leu*²⁸) をコードする DNA は、5' 側プライマーに HT499, 3' 側に HT544 (5'-GCACTGACA-CCgCCggcTAAGAA, 101 ~ 79 [20],) を用いた PCR により調製した。この産物の 87 bp *Nde*I-*Nae*I 断片で、bhAAC の N 末端領域 (*Met*¹ ~ *Leu*¹⁴) に相当する 42 bp *Nde*I-*Nae*I 領域を組み換えることで、*y2NbhAAC* を調製した。*yAAC1* の N 末端領域 (*Met*¹ ~ *Leu*¹⁸) をコードする DNA は、HT809 (5'-ACAGCAcatATGTCTCACACAGA, 5'側コード鎖, -9 ~ 14 [19]) と HT811 (5'-AGAAACGCCGCCggcAAGGAAGT, 3'側アンチセンス鎖, 71 ~ 49 [19]) を用いた PCR により調製した。この産物の 48 bp *Nde*I-*Nae*I 断片で、bhAAC の相当領域を組み換えることで、*y1NbhAAC* を調製した。

発現ベクターの構築

酵母における複製起点を有するプラスミドである *pRS314* (single-copy (YCp) type [49]) と *pYO326* (mluti-copy (YEpl) type [52]) には、タンパク質の発現を誘導するプロモーター領域がない。そこで、図 4-7C に示すように、*yAAC2* 遺伝子の 5' 側上流プロモーター領域約 1 kbp [24] を PCR によって調製し、サブクローニングした。更に、各 AAC の cDNA

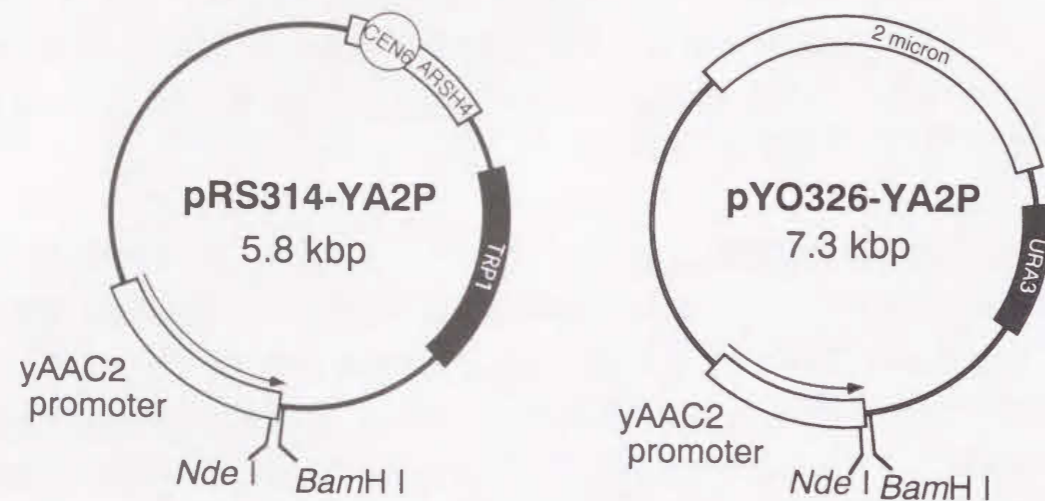


図 4-8 構築した発現ベクター

の挿入部位を作るため、プロモーター固有の *Nde* I 切断部位 (-580 付近 [24]) を *Sph* I のサイトに変異させ、加えてプロモーター領域の3'末端に新たに *Nde* I のサイトを創成した。最後にこのプロモーター領域を pRS314 及び pYO326 に挿入することで、*yAAC2* のプロモーター領域とその下流に AAC の cDNA の挿入部位である *Nde* I - *Bam*HI サイトを有する AAC 発現用ベクターである pRS314-YA2P 及び pYO326-YA2P (図4-8) を構築した。

酵母ミトコンドリアの調製

ミトコンドリア単離は、 OD_{600} が 1.0 ~ 1.3 になるまで YPGal 培地中で 30 °C 定温条件下で振盪培養した酵母細胞を用い、Nelson らの方法 [28] に準じて行った。まず、酵母細胞を還元剤処理及びザイモリアーゼ 20-T (生化学工業) 処理することで細胞壁を溶解させ、スフェロプラストにした。更にこれを等体積のガラスビーズ (内径 0.1 mm) 混在下でホモジナイズすることで細胞を破碎した。この破碎液を遠心分離にかけ、ミトコンドリア画分 (1,000 ~ 10,000 xg) を単離した。更にこの画分を高速遠心 (27,000 xg) することで層分離した軽ミトコンドリア層を除去し、残った重ミトコンドリア層のみを STE 溶液 (250mM ショ糖, 0.2 mM EDTA-2Na, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2)) に懸濁し、これを酵母ミトコンドリア懸濁液の標品とした。懸濁液のタンパク質濃度は、1% SDS 存在下でウシ血清アルブミンを標準物質として、BCA protein assay kit (Pierce) を用いて決定した。

SDS-PAGE と免疫染色

SDS-PAGE は、10% アクリルアミドゲルを用いて、Laemmli の方法 [53] に従って行った。ウエスタンブロットの方法は、第 2 章に述べた方法に基づいて行った。ただし、最終的なペルオキシダーゼ活性は、ECL ウエスタンブロット検出試薬 (Amersham) を用いて、生じた化学発光を X 線フィルムに感光させることで検出した。X 線フィルム上の検出されたタンパク質バンドの免疫染色強度は、島津クロマトスキャナー CS-9000 を用いて波長 560 nm における吸収を測定し求めた。

ミトコンドリア中の AAC の定量

全ミトコンドリアタンパク質中の AAC 量は、抗 bhAAC 抗体を用いて免疫染色した AAC バンドの染色強度より求めた。この免疫染色強度を各 AAC の絶対量に換算するために各 AAC の bhAAC 抗体に対する相対免疫反応度 (relative immunoreactivity: RIR) を決定した。

酵母ミトコンドリア (5 mg of protein/mL) を 1% トリトン X-100 にて可溶化した試料を、バッチ法 [54] にてヒドロキシアパタイトゲルと混和した後、非吸着画分である上清を分取した。*yAAC2* 及び bhAAC は、ヒドロキシアパタイトに吸着しないので [1, 54]、この画分には AAC が残存し、かつ SDS-PAGE 上で重複する 30 kDa 付近の他のタンパク質が除去されたため、この画分を試料として SDS-PAGE を行い CBB 染色すると、AAC は単一バンドとして検出された。そのため、このバンドの CBB 染色強度を測定し、BSA を標準物質として画分中の AAC 量を定量した。更にこの AAC バンドの bhAAC 抗体による免疫染色強度を測定することで、各単位 AAC 量当たりの RIR を算出した。これを全ミトコンドリア試料中の AAC バンドの免疫染色強度に外挿することで、ミトコンドリアタンパク質当たりの AAC 量を算出した。

ADP 透過活性の測定

まず、酵母ミトコンドリアは活性測定用溶液 (1 μ g/mL オリゴマイシンを含む STE 培地) 中に 1 mg of protein/mL の濃度で懸濁した後、0 °C で 5 分間インキュベーションした。その後、 $[^{14}C]$ ADP (最終濃度 100 μ M, 比放射活性 36 kBq/ μ mol) を加え、3 秒ないし 5 秒間インキュベーションした。なお、YEp/bhAAC の場合はインキュベーション時間は 10 秒ないし 30 秒行った。取り込み反応は、20 μ M CATR 及び 5 μ M BKA を添加することで停止させ、すぐに遠心 (27,000 xg) し、上清を除去することでミトコンドリア外の $[^{14}C]$ ADP を完全に除去した。そして沈殿したミトコンドリア中の $[^{14}C]$ ADP をアロカ液体シンチレーションカウンター LSC-3500 で測定することで、酵母ミトコンドリアの ADP 透過活性を求めた。

RNAの単離とノザンプロット解析

酵母全RNAは、YPGal培地中で $OD_{600} = 1.0 \sim 1.3$ まで培養した酵母細胞から、熱酸性フェノール法 [55] を用いて行った。RNA試料は、分光光度計 (島津UV-160) を用いて定量した [56]。ノザンプロット解析は定法に従って行った [56]。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 標識したプローブDNAは、各AAC特異的なDNA断片を鋳型としたmulti-priming法 [57]により調製した。得られたオートラジオグラムのシグナル強度は、バイオイメージングアナライザー BAS-1500 Mac. (富士フィルム) を用いて測定した。

第5章

ADP/ATP 透過担体の透過機能発現における第1ループの立体配置変化に関与するアミノ酸残基の同定

5.1 緒言

ADP/ATP 透過担体は、ミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を司る膜タンパク質である。第2章及び第3章の結果から、ADP/ATP 透過担体のマトリックス側の第1ループ (M1) が、透過機能発現時において膜内部とマトリックス側表面との間でその立体配置を相互転移させていることが見いだされた [1, 2]。また、この Cys⁵⁶ 間架橋により ADP/ATP 透過担体の透過活性が阻害されたことから、この立体配置変化が ADP/ATP 透過担体の透過機能に関与していることが予想された。しかし、その詳細は定かではなく、また実際のループ M1 の立体配置変化の機構についても全く解っていない。

SH 試薬である *N*-エチルマレイミド (NEM, 図 5-1) が、ADP/ATP 透過担体の阻害剤であることは 1970 年代前半から知られていた [3, 4]。その後、Boulay と Vignais は、NEM がウシ心筋ミトコンドリアの ADP/ATP 透過担体 (bhAAC) に存在する4つのシステイン残基のうち、ループ M1 中に存在する Cys⁵⁶ を標識することを明らかにした [5]。更に真島らは、この NEM の Cys⁵⁶ 標識に対応して bhAAC の ADP 透過活性が阻害されることを明らかにした [6]。また、NEM は bhAAC が m-state のとき Cys⁵⁶ を標識するが、c-state の時は標識しないことも明らかとされている [5, 7]。以上の知見から、NEM は Cys⁵⁶ を標識することで、ADP/ATP 透過担体の特異的阻害剤である BKA と同じく

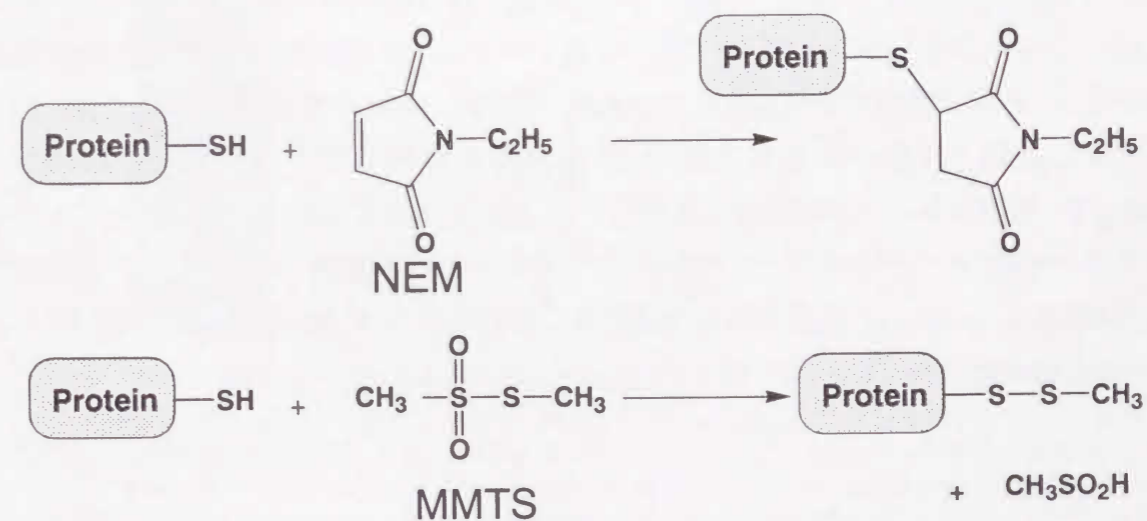


図 5-1 NEM と MMTS の SH 基修飾反応

ADP/ATP 透過担体を m-state に固定すると考えられ、Cys⁵⁶ が bhAAC の透過機能に関与していることが示唆される。加えて、このループ M1 中に存在するシステイン残基 (以後総称する際は Cys^{M1} と称す) は、今まで明らかとなった全ての生物種の ADP/ATP 透過担体で完全に保存されている [8]。これらの知見から、Cys⁵⁶ はループ M1 で透過機能に関与するとされている唯一のアミノ酸残基であり、ループ M1 の立体配置変化の機構を考える上で注目すべき残基であると言える。しかしながら、NEM による ADP/ATP 透過担体の機能障害の詳細な機構や Cys⁵⁶ の透過機能における役割については未だ明確な回答は得られていない。

そこで本章では、まず NEM の Cys⁵⁶ 標識に伴う bhAAC の機能的な変化について詳細に検討した。その際、NEM よりも分子サイズのが小さくかつ還元剤により解離可能なチオメチル基を SH 基に標識するメチルメタンチオールスルホネート (MMTS, 図 5-1) を NEM の比較対象物とした。MMTS は、無荷電性かつ膜透過性の化合物であることから、NEM と同様にマトリックス側から Cys⁵⁶ を優先的に標識することが予想される。NEM と MMTS はその修飾基のかさ高さの違いから、同一システイン残基を修飾してもタンパク質の機能に与える影響が異なる例がいくつか報告されており [8-12]、両者の bhAAC の機能に与える影響を比較検討することで、NEM の阻害機構について有効な知見が得られることが期待された。その結果、NEM, MMTS の Cys⁵⁶ 標識によって、マトリックス側からの基質の bhAAC に対する結合は阻害されないが、基質結合後の m-state から c-state への立体構造変化が阻害されることを示す知見を得た。これらの結果から、Cys⁵⁶ が bhAAC の基質結合には関与せず、基質結合後の立体構造変化に関与するものと思われた。

本章では更に、第 4 章において確立した酵母細胞での ADP/ATP 透過担体の発現系を用いて bhAAC の Cys⁵⁶ 相当する酵母 2 型 ADP/ATP 透過担体 (yAAC2) の Cys⁷³ 及び bhAAC のキメラ体 y2NbhAAC の Cys⁷² を種々のアミノ酸に置換した部位特異的変異体を調製し、その機能解析を行った。その結果、これら ADP/ATP 透過担体の Cys^{M1} は透過機能に必須ではなく、むしろその N 末端側に隣接したアスパラギン酸残基が ADP/ATP 透過担体の立体構造変化及びループ M1 の立体配置変化に関与している可能性が強く示唆される知見を得た。これらの知見をもとに、NEM の ADP/ATP 透過担体阻害機構及び ADP/ATP 透過担体の透過機能におけるループ M1 の及びその構成アミノ酸残基の機能的役割について考察した。

5.2 結果

5.2.1 MMTS による bhAAC 標識反応

まず、MMTS の bhAAC の Cys⁵⁶ に対する反応性を検討する目的で、¹⁴C]NEM の bhAAC 標識反応に対する MMTS の影響について検討した。ウシ心筋ミトコンドリアの反転膜小胞 (SMP) に 2 mM ¹⁴C]NEM (100 nmol/mg of protein) を添加して、0 °C, pH 7.2 の条件下で 10 分間反応させた。図 5-2A には、その SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィによる泳動像を示す。¹⁴C]NEM のみを処理した SMP (None) では、30 ~ 36 kDa の間の位置に 3 本の NEM と結合したバンドが検出された。このうち最も低分子質量側の約 30 kDa のバンドは、ADP/ATP 透過担体の特異的阻害剤 CATR を前処理したウシ心筋ミトコンドリアから調製された SMP (CATR) では検出されなかった。CATR の結合した bhAAC に NEM は結合できないことが既に報告されていることから [7]、この 30 kDa のバンドが bhAAC であることを確認した。更に、NEM のみを作用させたときの 30 kDa バンドの放射活性から ¹⁴C]NEM の bhAAC に対する結合量を算出したところ、bhAAC 1 分子当たり 0.6 分子の NEM が結合していた。この結合量は、同一反応条件下における真島らのペプチド解析による cold NEM の結合量の報告 [6] とよく一致した。更に真島らの報告 [6] によると、この反応条件下では bhAAC に結合した NEM の 95 % 以上は Cys⁵⁶ を標識していることから、この 30 kDa bhAAC の放射活性は NEM

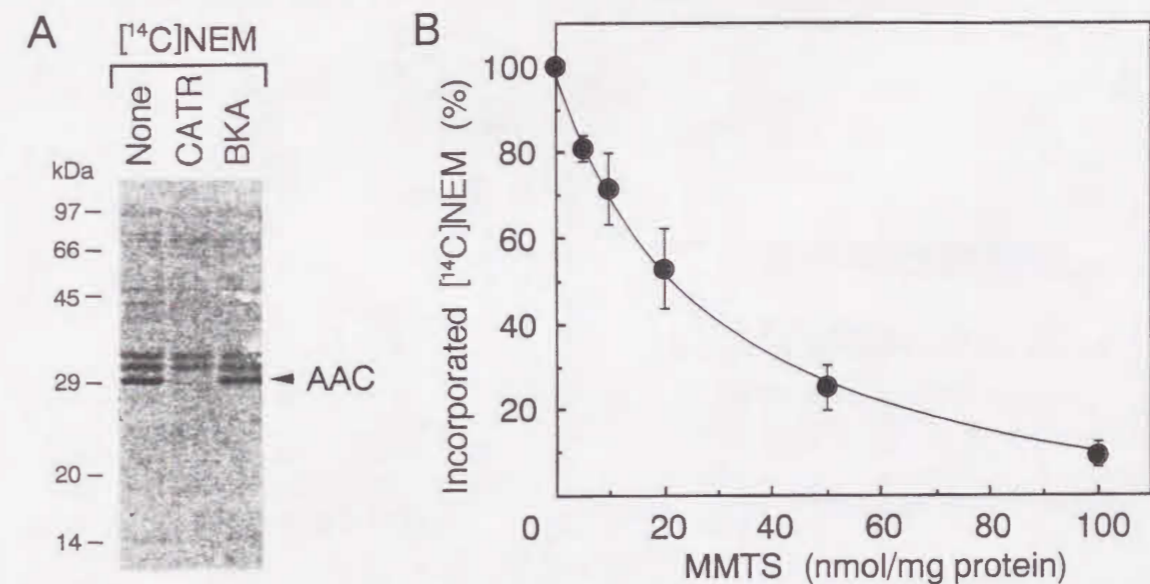


図 5-2 ¹⁴C]NEM の bhAAC 標識反応に対する MMTS の影響

¹⁴C]NEM 100 nmol/mg of protein で 0 °C, pH 7.2 で 10 分間処理したウシ心筋 SMP タンパク質 10 µg を SDS-PAGE に供した。A は、各種処理した SMP に対して ¹⁴C]NEM を反応させた場合のオートラジオグラフィを示す。None: 未処理の SMP, CATR: 200 µM CATR 処理した BHM から調製した SMP, BKA: 200 µM BKA を前処理した SMP をそれぞれ示す。B は、種々の濃度の MMTS を ¹⁴C]NEM と同時に添加した場合の AAC バンドの放射標識量の変化を示す。結果は、3 回の試験の平均値 ± 標準偏差で示す。

の Cys⁵⁶ 標識の指標になると結論した。なお、この反応条件下で [¹⁴C]NEM が Cys⁵⁶ 以外のシステイン残基を標識していないことは、その結合により bhAAC の Cys⁵⁶ 以外のシステイン残基と SH 試薬との結合を阻害することが知られている BKA [7] を前処理しても 30 kDa bhAAC の放射標識量に変化がなかったことから確認された (図 5-2A, BKA)。

上記の反応条件下で 100 nmol/mg of protein の [¹⁴C]NEM を予め作用させ、次いで添加する時、種々の濃度の cold MMTS を同時に添加し、[¹⁴C]NEM の 30 kDa bhAAC の標識量の変化を測定することで、MMTS の Cys⁵⁶ に対する反応性について検討した。その結果を図 5-2B に示す。MMTS は濃度依存的に NEM の Cys⁵⁶ 標識を阻害した。この結果から、MMTS も NEM 同様 Cys⁵⁶ を標識していることが明らかとなった。なお、本研究は NEM と MMTS の分子サイズに起因した両試薬の bhAAC に与える影響の違いを検討することを目的としており、そのためには両試薬の Cys⁵⁶ に対する反応性を補正する必要があるため、NEM の反応量 100 nmols/mg of protein に対し、MMTS の反応量は [¹⁴C]NEM の標識を 50% 阻害する 20 nmol/mg of protein を用いた。

更に、MMTS と NEM の Cys⁵⁶ 標識反応のタイムコースを比較できるようにするために、第 2 章にて記述した銅オルトフェナンスロリン (Cu(OP)₂) による Cys⁵⁶ 間架橋反応に対する両試薬の影響について検討した。SMP (20 mg of protein/mL) を NEM (100 nmol/mg of protein) 及び MMTS (20 nmol/mg of protein) と 0 °C, pH 7.2 で所定時間反応させ、未反応の SH 試薬を除去した。次いでこの SMP 試料 (4 mg of protein/mL) に 100

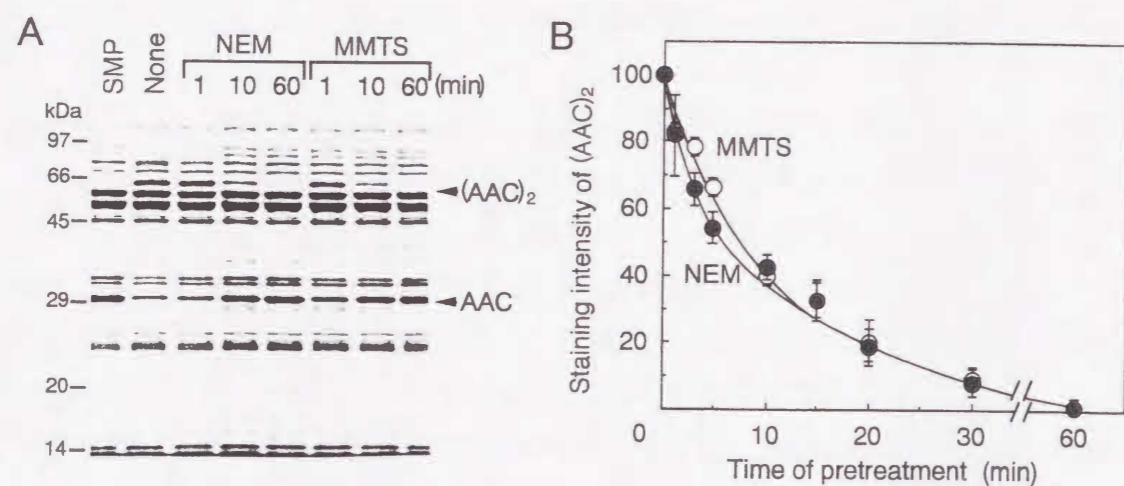


図 5-3 Cu(OP)₂ による bhAAC 分子間架橋反応に対する NEM, MMTS の影響

NEM (100 nmol/mg of protein) 又は MMTS (20 nmol/mg of protein) で所定時間前処理した SMP (4 mg of protein/mL) を 100 μM Cu(OP)₂ と 0 °C, pH 7.4 で 10 分間反応させた後、10 μg タンパク質を SDS-PAGE に供して CBB 染色した (A)。NEM, MMTS の前処理時間に応じた bhAAC 分子間架橋の形成量を 60 kDa の分子間架橋バンド ((AAC)₂) の CBB 染色強度から求めた (B)。結果は、3 回の試験の平均値±標準偏差で示す。

μM Cu(OP)₂ を 0 °C, pH 7.4 にて 10 分間反応させ、形成された 60 kDa の分子間架橋された bhAAC ((AAC)₂) 量の変化を観察した。その結果を図 5-3 に示す。SDS-PAGE の CBB 染色像 (A) より、NEM, MMTS を前処理すると、その前処理時間に依存して 60 kDa (AAC)₂ の形成が阻害され、30 kDa AAC 量が回復した。この結果からも、MMTS が NEM 同様に Cys⁵⁶ を標識することが裏付けられた。更に NEM, MMTS の前処理時間に応じた (AAC)₂ 形成量の推移をそのバンドの CBB 染色強度から測定した (B)。その結果、NEM と MMTS がほぼ同様の架橋阻害曲線を描いたことから、NEM と MMTS は前述の反応濃度においてほぼ同様の反応性で Cys⁵⁶ を標識していることが確認された。

5.2.2 bhAAC の ADP 透過活性に対する NEM, MMTS の影響

前述の反応条件で NEM 又は MMTS を所定時間前処理した SMP の ADP 取り込み速度を測定することで、両 SH 試薬の bhAAC の ADP 透過活性に対する影響を検討した。その結果を図 5-5 に示す。NEM は処理時間 1 分間で約 20%, 10 分間で約 70% と処理時間に応じて SMP の ADP 取り込み活性を阻害した。この阻害曲線は、図 5-4 に示す NEM の Cu(OP)₂ による bhAAC 分子間架橋反応に対する阻害曲線や過去の報告 [6] での NEM の SMP 中の Cys⁵⁶ 標識量の経時変化によく対応していたことから、NEM の Cys⁵⁶ 標識に伴って bhAAC の ADP 透過活性が阻害されることが確認された。

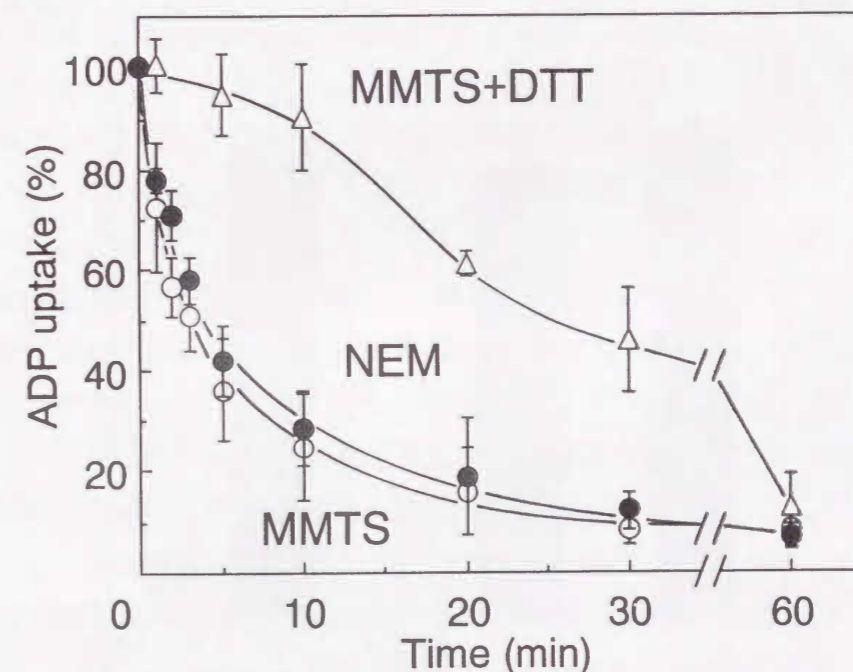


図 5-4 SMP の ADP 取り込み活性に対する NEM, MMTS の影響

図 5-3 と同条件で NEM, MMTS を前処理した SMP の ADP 取り込み活性を測定した (詳細は実験方法の項参照)。MMTS 処理した SMP は、一部を DTT (10 μmol/mg of protein) で 25 °C, 30 分間処理した後、ADP 取り込み活性を測定した (MMTS+DTT)。結果は 3 回の試験の平均値±標準偏差で示す。

一方、MMTS も NEM 同様に処理時間依存的に SMP の ADP 取り込み活性を阻害した。この MMTS の結果も、図 5-4 における Cu(OP)_2 による bhAAC 分子間架橋反応に対する阻害曲線によく対応した。更に MMTS を所定時間処理した SMP を、還元剤 DTT (10 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein) にて 25 °C, 30 分間処理した後、0 °C に戻してから ADP 取り込み活性を測定した (MMTS+DTT)。MMTS を 10 分間前処理した SMP の ADP 取り込み活性は、未処理の 30% まで低下していたが、DTT 処理により 90 % 以上まで回復した。この DTT 処理により膜表面のジスルフィド結合は還元されるので、膜表面に位置する Cys^{56} を修飾したチオメチル基は解離されると考えられる。以上の結果から、MMTS によって Cys^{56} を標識しても bhAAC の透過活性は阻害されることが明らかとなった。なお、MMTS の前処理時間が 10 分間以上になると処理時間の応じて透過活性部分的にしか回復しなかった。この原因としては、処理時間の長期化に伴い、MMTS が Cys^{56} だけでなくタンパク質内部に位置する他のシステイン残基も標識したためであると考えられる。

5.2.3 EMA の Cys^{159} 標識反応に対する NEM, MMTS の影響

エオシン 5-マレイミド (EMA) は、bhAAC のループ M2 中の Cys^{159} をマトリックス側から非常に特異的に標識することが報告されている蛍光性の SH 試薬である (第 1 章参照) [6]。MMTS, NEM で 10 分又は 60 分間処理した後、未反応の SH 試薬を除去した

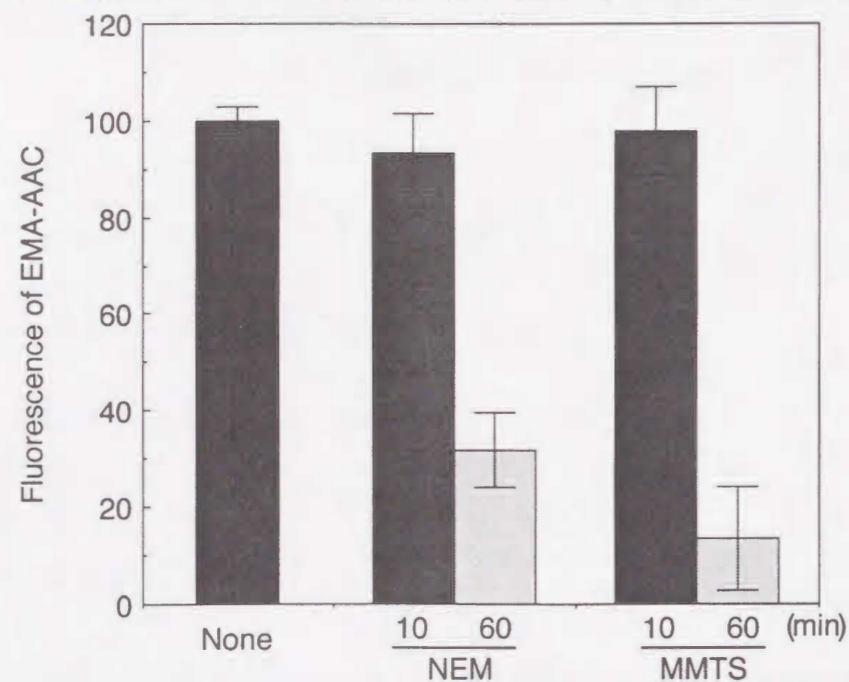


図 5-5 EMA の bhAAC 標識反応に対する NEM, MMTS の影響

NEM 又は MMTS で 10 分又は 60 分間処理した SMP (2 mg of protein/mL) に 20 μM EMA を 0 °C, pH 7.2 の条件で 1 分間反応させた。このタンパク質 10 μg を 15 % SDS-PAGE に供した。bhAAC 結合した EMA 量は、励起波長 530 nm における bhAAC のバンドの蛍光強度から求めた。結果は、3 回の試験の平均値 \pm 標準偏差で示す。

SMP 試料 (2 mg of protein/mL) に、20 μM EMA を 0 °C, pH 7.2 の条件下で 1 分間反応させた。過去の報告 [6] から、この反応条件で SMP 中の 90 % 以上の Cys^{159} が EMA に標識されるが、 Cys^{56} はほとんど標識されていないことも明らかとなっている。SMP 中の bhAAC を標識した EMA の蛍光強度は、NEM 又は MMTS を 10 分間前処理しても変化しなかった (図 5-5)。この結果から、少なくとも処理時間 10 分までは、NEM 及び MMTS は Cys^{159} を標識していないことが明らかとなった。しかし、処理時間を 60 分にしたところ、NEM と MMTS は EMA の bhAAC 標識量をそれぞれ 65 % と 82 % 阻害した。この結果から、MMTS も NEM 同様 Cys^{56} を標識した後、 Cys^{159} を標識することが明らかとなった。

また、EMA の特異的な Cys^{159} 標識は、EMA のエオシン骨格部位が基質である ADP と同様の認識を受けて、基質結合部位であるループ M2 に結合するためであることが既に報告されている [7, 13]。事実、マレイミド基を有さないエオシン化合物であるエオシン-Y は、ADP の bhAAC への結合を競合的に阻害することも明らかになっている [13]。以上の知見と、NEM, MMTS が Cys^{56} を標識することで、EMA の Cys^{159} 標識が阻害されなかったという結果から、 Cys^{56} を修飾することでマトリックス側からの基質結合は阻害されないことが強く示唆された。

5.2.4 bhAAC の立体構造変化に対する NEM, MMTS の影響

一般にタンパク質の立体構造変化を経時的に検出すること非常に難しい。bhAAC の場合、その立体構造変化に依存してウシ心筋ミトコンドリア (BHM) の内膜構造が変化することが古くから知られており [14-17]、この形態変化に対応して BHM 懸濁液の濁度が増加する [14-18]。図 5-6A にはミトコンドリアの形態の模式図を示す。ミトコンドリアは内膜 (IM) と外膜 (OM) の二重膜からなり、内膜の内腔は、多数の酵素群や化合物が高密度で存在するマトリックス (MA) となっている。また、内膜は、マトリックス側へと折り畳まれたクリステを形成している。図 5-6B は ADP/ATP 透過担体の基質及び特異的阻害剤によって起こる BHM の形態変化の電子顕微鏡像を示す。BHM 顆粒中暗影部は MA を示し、透明部はクリステ内の膜間スペース (IC) を示す。ADP と CATR が添加されたことで、bhAAC が c-state に固定された BHM (CATR) と ADP と BKA が添加されたことで、bhAAC が全て m-state に固定された BHM (BKA) では、明らかに IC の数や構造が違い、BKA の方がひとつひとつ IC が非常に小さく小円状である。これは、BKA の方が、より密な内膜構造をとり、クリステの形状が非常に細い円筒状になっていることを示している [14, 15]。また、ADP を添加して bhAAC が活性化されている BHM (ADP) では、CATR 型の IC と BKA 型の IC が混在した状態になる。なお、単離直後の BHM (none) の bhAAC はほとんどが c-state の状態にあるので [5]、

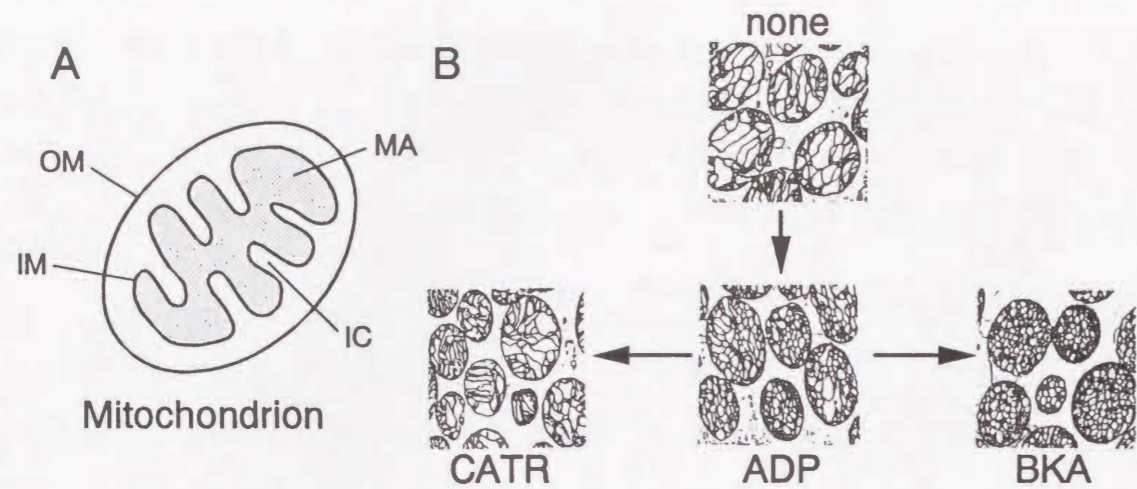


図 5-6 bhAAC の立体構造変化に依存した BHM の形態変化

A: ミトコンドリアの形態の模式図。それぞれ OM; 外膜, IM; 内膜, MA; マトリックス, IC; クリスチ内空間 (膜間スペースを含む) を示す。B: ADP, BKA, CATR をそれぞれ添加した BHM 切片の電子顕微鏡写真 (文献 15, 16 より引用)。

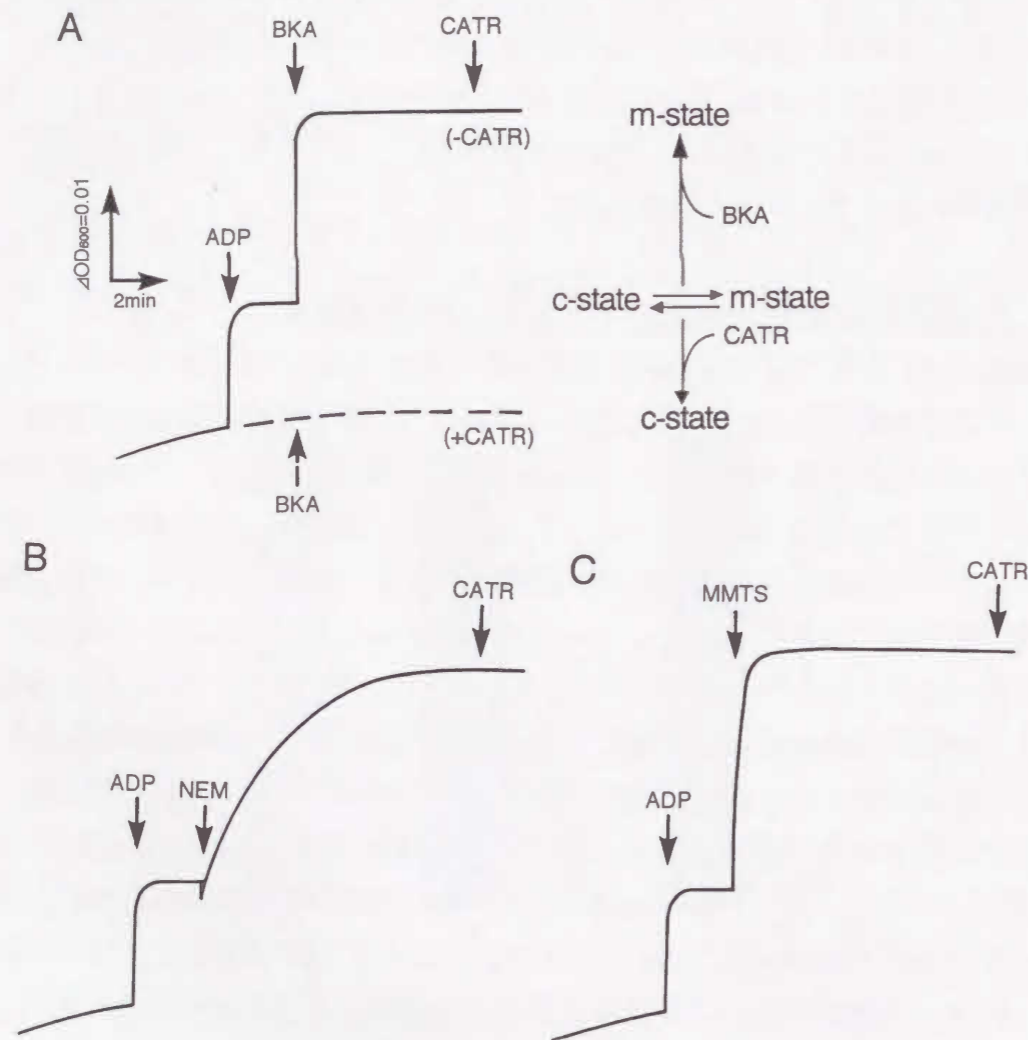


図 5-7 ADP/ATP 透過担体の基質及び阻害剤による BHM 懸濁液の濁度変化

BHM 懸濁液 1mg of protein/mL に 25 °C, pH 7.2 (トレース A は pH 6.5) の条件下, ADP (50 μM), BKA (10 μM), CATR (5 μM), NEM (1 mM), MMTS (1 mM) を添加し、波長 600 nm における濁度変化を測定した。

BHM は CATR と同じ形状である。このような内膜構造の変化は、BHM の光透過性に反映される。つまり、内膜構造が密な BKA 処理の BHM では、内膜構造が粗な CATR 処理の BHM と比較して光散乱が起こりやすく、そのため BHM 懸濁液のみかけの吸光度 (濁度) が高くなる [14-18]。図 5-7A には、波長 600 nm における BHM 懸濁液の濁度変化を示す。25 °C, pH 7.2 の条件下で 1 mg of protein/mL の BHM 懸濁液に対し、ADP を添加すると濁度が速やかに上昇し、更に BKA を添加すると濁度は更に上昇し、プラトーに達した後に CATR を添加しても濁度には影響がなかった。一方点線にて示すように、CATR 前処理すると、ADP 及び BKA を添加しても濁度は変化しなかった。このように濁度は、完全に bhAAC の各コンホメーションの存在比に依存していた。bhAAC のコンホメーションが BHM の内膜構造に影響を与える機構については未だ明らかとなっていないが、BHM 内膜における bhAAC の含量は全内膜タンパク質の 10% 以上を占めていることから、その立体構造が膜構造にも反映されやすいと考えられる。実際 ADP/ATP 透過担体含量の低いラット肝ミトコンドリアや酵母ミトコンドリアではこのような濁度変化は観察されなかった。

NEM, MMTS は疎水性が高く膜透過性であるとされている [19]。そこで、この濁度変化に対する NEM, MMTS の影響を検討することで、bhAAC の立体構造変化に対する NEM, MMTS の影響について検討した。前述の条件で ADP 添加後 1 mM NEM を添

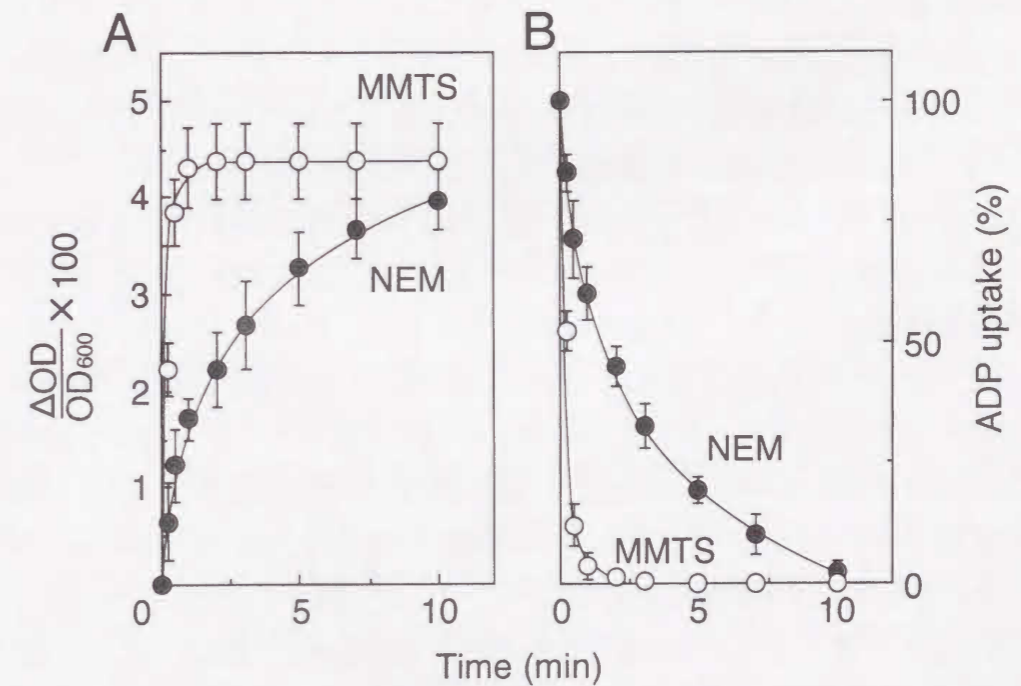


図 5-8 NEM, MMTS 添加による BHM の濁度 (A) と ADP 取込活性 (B) の経時変化

図 5-7B, 7C における NEM, MMTS 添加後の所定時間における BHM 懸濁液の濁度変化を BHM 懸濁液全濁度当たりの変化量として算出した (A)。また、NEM, MMTS 後所定時間毎に採取した BHM の ADP 取り込み活性を測定した (B)。各プロットは 3 回の試験の平均値 ± 標準偏差を示す。

加すると濁度は緩やかに上昇し、約 10 分後にプラトーに達した (図 5-7B)。また、同様に 1 mM MMTS を添加すると急激に濁度は上昇し、およそ 1 分でプラトーに達した (図 5-7C)。NEM や MMTS により上昇した濁度は BKA によるそれ (図 5-8A) とほとんど同じであった。更に、両試薬による濁度上昇がプラトーに達した後、CATR または BKA を添加しても濁度は変化しなかった。また、この NEM, MMTS による濁度上昇は、CATR を前処理することで完全に阻害された。更に、NEM, MMTS 添加後の濁度の変化と BHM の ADP 取り込み活性の変化のタイムコースを比較したところ (図 5-8)、濁度の上昇に対応して、BHM の ADP 取り込み活性が低下した。以上の結果と BHM で NEM が Cys⁵⁶ のみを標識するという報告 [5] から、この濁度上昇が、NEM 及び MMTS が Cys⁵⁶ を標識し bhAAC を m-state に固定したことに起因していることが明らかとなった。なお、このことは、NEM 及び MMTS 処理した BHM を電子顕微鏡写真にて撮影したところ、それらの形状が図 5-6B の BKA 処理した BHM に酷似していたことから強く支持された。

5.2.5 y2NbhAAC 及び yAAC2 の Cys^{M1} 変異体の機能解析

これまでの研究結果より、bhAAC の第 1 ループに存在するシステイン残基 (Cys^{M1}) である Cys⁵⁶ を修飾すると、bhAAC のコンホメーションが m-state に固定され、基質輸送が阻害されることが明らかとなった。この知見から、Cys^{M1} が ADP/ATP 透過担体の立体構造変化に関与する残基であることが示唆された。そこで、Cys^{M1} の機能的役割を明確にする目的で、第 4 章で機能解析可能な発現系を確立させた y2NbhAAC 及び yAAC2 の Cys^{M1} 変異体を調製し機能解析を行った。y2NbhAAC の Cys^{M1} である Cys⁷² を Ser (S) 及び Thr (T), Ala (A), Val (V), Met (M), Tyr (Y) にそれぞれ変異させた変異 y2NbhAAC の cDNA を調製し、これを用いて AAC 欠損酵母細胞 WB-12 を形質転換した。各形質転換細胞のグリセリン寒天培地上での 30 °C, 5 日間の生育状況を図 5-9 左パネルに示す。その結果、C72A または C72V 変異体によって形質転換された酵母細胞の増殖速度は、未変異体 (p-WT) によるそれとほぼ同じであり、グリセリン液体培地中での倍加時間は共に約 8 時間であった。C72S, C72T, C72M 変異体による形質転換細胞の増殖速度は p-WT のそれよりも遅く、倍加時間はそれぞれ 16, 16, 38 時間であった。更に、C72Y 変異体による形質転換細胞はグリセリン培地中で増殖しなかった。一方、yAAC2 の Cys^{M1} である Cys⁷³ の各変異体を用いて形質転換した酵母 WB-12 細胞のグリセリン寒天培地上での生育を観察したところ (図 5-9 右パネル)、C73A, C73V, C73T 変異体による形質転換細胞の生育は、未変異体 (p-WT) によるそれとほぼ同じ速度で増殖し、液体培地中での倍加時間は約 4 時間であった。C73S, C73M 変異体による形質転換細胞の生育は、未変異体のそれよりも遅く、それぞれ 14, 44 時間だった。更に、

y2NbhAAC (Cys⁷²)



yAAC2 (Cys⁷³)

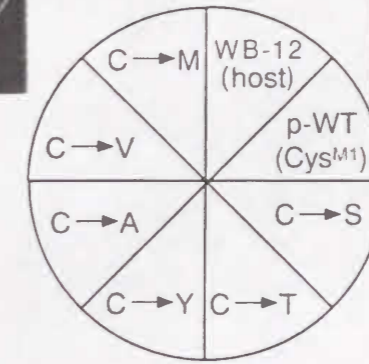
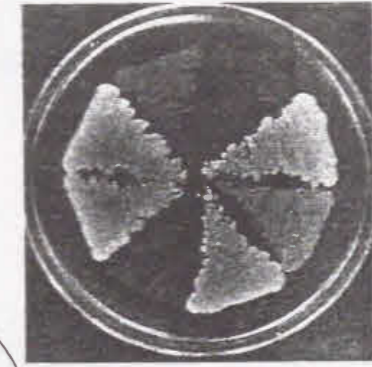


図 5-9 y2NbhAAC 及び yAAC2 の Cys^{M1} 変異体を発現した酵母細胞のグリセリン培地上での生育

y2NbhAAC (Cys⁷²), yAAC2 (Cys⁷³) の各変異体の cDNA で WB-12 細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞の培養液をグリセリン寒天培地上に塗布し、30 °C, 5 日間放置した。

C73Y 変異体による形質転換細胞は生育しなかった。この結果から、Cys^{M1} を Tyr に変異させると ADP/ATP 透過担体の透過活性が消失することが示唆された。

次に各形質転換酵母細胞のミトコンドリアを単離し、発現した変異 ADP/ATP 透過担体量を特異抗体による免疫染色強度から定量した (表 5-1)。その結果、全ての変異体はミトコンドリア中に発現し、透過活性が消失したと思われる y2NbhAAC 及び yAAC2 の Tyr 変異体でもミトコンドリア中に十分量発現していた。この結果から、Cys^{M1} をチロシンに変異することで ADP/ATP 透過担体の透過活性が消失することが明らかとなった。なお、その変異体の発現量は、未変異体の発現量の約 40-50 % 程度と少なかった。この原因として、本発現系で発現用プロモーターに採用している yAAC2 プロモーターには、ミトコンドリアの生合成を全般的に制御する転写因子である ABF1 の結合部位の共通配列が含まれていることから [20]、酸化的リン酸化能の低下、欠落に伴って、ミトコンドリアタンパク質の生合成量が低下したことを反映したものと考えられる [21-23]。事実、酵母において、yAAC2 の欠損や不活性な yAAC2 変異体の発現で酸化的リン酸化能の低下することに伴って、呼吸活性の指標となるチトクロム c 等のミトコンドリアタンパク質の発現量が低下することが知られている [24, 25]。このような発現量の差を補正する目的で、各形質転換細胞から単離したミトコンドリアにおける各変異体の分子活性を測定した (表 5-1)。その結果、y2NbhAAC では p-WT の分子活性と比較して、C72A, C72V 変異体は 95 % 以上の分子活性を保持していたのに対し、C72S, C72T 変異

体では約 60 %前後、C72M 変異体では約 20 % 程度まで低下した。更に、C72Y 変異体では分子活性が検出されなかった。このような変異体の分子活性は、図 5-9 における各形質転換細胞間のグリセリン培地上での生育を完全に反映していた。なお、yAAC2 の各変異体でも同様の結果が得られた。

表 5-1 で本節の結果とシステイン及び置換した各アミノ酸残基の物理化学的性質について比較したところ、システイン残基と比較して Van der Waals 体積 [26] が同程度か小さい場合、セリンやスレオニンのような親水性のアミノ酸残基に置換することで若干の活性の低下が観察されたもののほぼ活性は保持されていた。しかし、の Van der Waals 体積がメチオニン程度まで増加すると各変異体の分子活性は顕著に低下し、チロシン程大きくなると活性は完全に消失した。この結果から、Cys^{M1} 自体は ADP/ATP 透過担体の透過機能に関与しないが、Cys^{M1} 残基位のかさ高さが、ADP/ATP 透過担体のコンホメーション変化の際に起こる何らかの残基間相互作用に影響を与えていると考えられる。

表 5-1 各アミノ酸残基の物理化学的性質と Cys^{M1} 部位特異的変異体の解析結果

	Cys	Ala	Ser	Thr	Val	Met	Tyr	
Volume (Å) ^a	43	25	31	52	61	83	101	
Hydrophobicity ^b	2.5	0.8	-0.7	-1.3	1.8	4.2	1.9	
y2NbhAAC (Cys ⁷²)	Growth ^c	8	8	16	16	8	44	N.G. ^f
	AAC ^d	0.60	0.62	0.52	0.49	0.63	0.44	0.32
	V _{ADP} ^e	22.4	21.9	13.5	13.8	26.8	4.8	N.D. ^g
yAAC2 (Cys ⁷³)	Growth ^c	4	4	8	4	4	48	N.G. ^f
	AAC ^d	0.72	0.77	0.55	0.69	0.75	0.40	0.33
	V _{ADP} ^e	86.7	83.4	40.2	82.4	88.3	4.4	N.D. ^g

a: アミノ酸残基側鎖の van der Waals 体積, 文献 26, 36 を参考にして算出した。

b: 各アミノ酸残基の疎水性度. Kyte & Doolittle の報告 [37] に基づいた。

c: 各野生型及び変異型 ADP/ATP 透過担体を発現した WB-12 細胞のグリセリン液体培地中での倍加時間 (hour)。

d: ミトコンドリア中の変異 ADP/ATP 透過担体含量 (nmols/mg of protein). 第 4 章と同じの方法で測定した。値は 3 回の試験の平均値として示す。

e: 各 ADP/ATP 透過担体の分子活性 (nmol ADP/nmol AAC/min). 単離直後のミトコンドリアの ADP 取り込み反応の初速度を ADP/ATP 透過担体含量で除することで算出した。詳細な方法は、第 4 章にて記述した方法に従った。値は 3 回の試験の平均値として示す。

f: No Growth.

g: Not determined. ミトコンドリアの ADP 取り込み活性が検出できなかった。

5.2.6 Cys^{M1} 残基に隣接する Asp 残基の変異に伴う ADP/ATP 透過担体の機能変化

図 5-10 では、各生物種の ADP/ATP 透過担体の Cys^{M1} 付近の配列を比較した。Cys^{M1} 残基の前後の配列は、Y-x-G-I-x-D-C-x-x-R (x は任意の配列を示す) という非常に保存さ



図 5-10 各 ADP/ATP 透過担体の Cys^{M1} 付近の配列比較

y: 出芽酵母, nc: アカパンカビ, b: ウシ, h: ヒトをそれぞれ示す。

y2NbhAAC (Asp⁷¹)

yAAC2 (Asp⁷²)

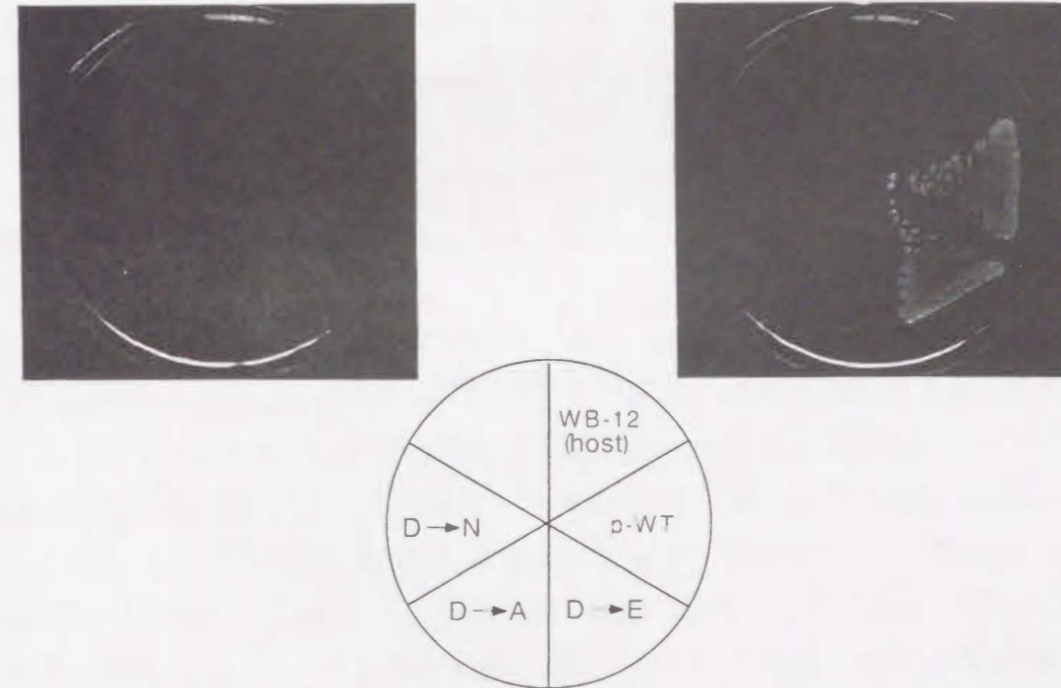


図 5-11 y2NbhAAC (Asp⁷¹) 及び yAAC2 (Asp⁷²) 変異体を発現した酵母細胞のグリセリン培地上での生育

y2NbhAAC (Asp⁷¹), yAAC2 (Asp⁷²) の各変異体の cDNA で WB-12 細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞の培養液をグリセリン寒天培地上に塗布し、30 °C, 5 日間放置した。

れた配列を形成している。特に Cys^{M1} の N 末端側に隣接する Asp 残基は、一部の植物 (Glu 残基) を除き、全ての生物種において保存されている [8]。そこで、Cys^{M1} との位置的關係からこの Asp 残基に着目し、その y2NbhAAC (Asp⁷¹), yAAC2 (Asp⁷²) の変異体を調製し機能解析した。y2NbhAAC の Asp⁷¹ を Glu, Ala, Asn に置換した変異体を WB-12 細胞内にて発現させたところ、Glu 変異体による形質転換細胞は p-WT 同様に生育したのに対し、Ala, Asn 変異体はほとんど生育しなかった (図 5-11)。更に、各変異体の分子活性を測定したところ、Glu 変異体ではほとんど活性に変化がなかったのに対して、Ala, Asn 変異体ではほとんど活性が消失していた (表 5-2)。また、yAAC2 の Asp⁷² でもほぼ同様の結果が得られた。以上の結果から、Cys^{M1} の N 末端側に隣接する Asp 残基の負電荷が ADP/ATP 透過担体の機能発現に必須であることが明らかとなった。

表 5-2 y2NbhAAC (Asp⁷¹) 及び yAAC2 (Asp⁷²) 変異体の解析結果

		p-WT	D→E	D→A	D→N
Growth ^a		8	8	N.G. ^d	>100
y2NbhAAC	AAC ^b	0.60±0.12	0.58±0.16	0.25±0.08	0.28±0.03
(Asp ⁷¹)	V _{ADP} ^c	22.4±5.5	24.8±3.2	N.D. ^e	N.D. ^e
yAAC2	Growth ^a	4	4	N.G. ^d	N.G. ^d
(Asp ⁷²)	AAC ^b	0.72±0.05	0.77±0.08	0.33±0.06	0.35±0.05
	V _{ADP} ^c	86.7±16.7	83.4±8.5	N.D. ^e	N.D. ^e

a: 各野生型及び変異型 ADP/ATP 透過担体を発現した WB-12 細胞のグリセリン液体培地中での倍加時間 (hour).

b: ミトコンドリア中の変異 ADP/ATP 透過担体含量 (nmols/mg of protein). 第 4 章と同じの方法で測定した。値は 3 回の試験の平均値 ± 標準偏差として示す。

c: 各 ADP/ATP 透過担体の分子活性 (nmol ADP/nmol AAC/min). 単離直後のミトコンドリアの ADP 取り込み反応の初速度を ADP/ATP 透過担体含量で除することで算出した。詳細な方法は、第 4 章にて記述した方法に従った。値は 3 回の試験の平均値 ± 標準偏差として示す。

e: No Growth.

f: Not determined. ミトコンドリアの ADP 取り込み活性が検出できなかった。

5.3 考察

5.3.1 MMTSによるbhAAC標識反応とその影響

本章では、まず MMTS が NEM の Cys⁵⁶ 標識を阻害することを初めて明らかにした (図 5-2)。更に、MMTS が NEM と同様に Cu(OP)₂ の Cys⁵⁶ 間架橋反応を阻害し (図 5-3)、EMA の Cys¹⁵⁹ 標識を阻害しない (図 5-4) ことも明らかにした。真島らの報告 [6] によると、SH 試薬が反応可能なシステイン残基は Cys⁵⁶, Cys¹⁵⁹, Cys²⁵⁶ であり、各システイン残基の NEM に対する反応性の差異から、このうち最もマトリックス側に露出している残基は Cys⁵⁶ であり、次に Cys¹⁵⁹ が位置し、Cys²⁵⁶ は最も膜内部側に位置するとした。この結果から、少なくともマトリックス側から Cys¹⁵⁹ よりも Cys²⁵⁶ の標識が先に起こるとは考えにくい (このことは EMA の標識反応でも確認されている [6])。以上のことから、MMTS は NEM と同様に Cys⁵⁶ を特異的に標識していることが明らかとなった。更に、図 5-2 及び図 5-3 の結果から、NEM 100 nmol/mg of protein と MMTS 20 nmol/mg of protein がほぼ同じ Cys⁵⁶ に対する反応性を示すことから MMTS は NEM よりも約 5 倍高い反応性で Cys⁵⁶ を標識することも明らかとなった。このことから、MMTS は非常に効率よく Cys⁵⁶ を標識する SH 試薬であるといえる。

更に本章では MMTS が bhAAC の透過活性を阻害することも明らかにした (図 5-5)。この MMTS による透過活性の阻害は、還元剤 DTT により回復したことや (図 5-5)、Cu(OP)₂ による架橋反応阻害に対応していたことから (図 2-6)、MMTS による bhAAC 透過活性の阻害も NEM と同じく Cys⁵⁶ を標識したことに起因することが明らかとなった。この結果は、Cys⁵⁶ 標識による透過阻害が NEM 特有でないことを示し、Cys⁵⁶ が透過機能に関与することを示唆した。

5.3.2 Cys^{M1} 修飾の ADP/ATP 透過担体に対する影響

NEM が BHM の ADP 取り込み活性を阻害することが 1972 年に明らかになり [3, 4]、更にこれが bhAAC の Cys⁵⁶ の修飾によることが 1984 年に明らかになって以来 [5]、NEM の透過阻害様式については様々な説が提出されてきた。その仮説は大別して 2 つある。第 1 の仮説として、Vignais らは NEM によって基質結合が阻害されるという説を挙げている [27]。しかし、これは明確な根拠となるデータは示されていない。唯一の根拠として、ミトコンドリア溶質輸送担体のひとつであり、ADP/ATP 透過担体と高いホモロジーを示すリン酸キャリアーにおいて、bhAAC の Cys⁵⁶ に相当する Cys⁴² が NEM により標識されるとリン酸の結合が阻害される知見 [28] を挙げている。しかし、基質が違う別の輸送担体の結果を簡単に引用できるものではない。今回の結果で、NEM, MMTS とともに EMA の Cys¹⁵⁹ に対する標識を阻害しなかった (図 5-4)。序論にて

記述した通り、EMA が Cys¹⁵⁹ を選択的に標識するのは、そのエオシン構造が基質認識部位と見られるマトリックス側の第 2 ループ (M2) に基質様に認識されることに起因する [13]。つまり、EMA の Cys¹⁵⁹ への結合は、マトリックス側からの基質結合の指標となりうるので、NEM, MMTS の ADP/ATP 透過担体の活性阻害は基質結合阻害によるものではないといえる。このことは、近年同じくループ M2 に結合することが示唆されている [7] 特異的阻害剤 BKA の結合も NEM により阻害されないという報告 [29] から強く支持される。

もう一つの仮説として Klingenberg らは、NEM が基質結合後に起こる bhAAC の立体構造変化を阻害するという説を提唱している [30]。これは、NEM で Cys⁵⁶ を標識した bhAAC には BKA は結合できるが CATR は結合できないことと [4, 28]、逆に bhAAC を CATR で c-state に固定すると NEM は結合できず、BKA で m-state に固定すると Cys⁵⁶ が NEM で標識されたことによる [28]。今回、BHM の濁度変化を用いた bhAAC の立体構造変化の測定から、NEM, MMTS が bhAAC を m-state に固定することが明らかとなった (図 5-7, 5-8)。NEM の場合このような濁度変化を起こすことは既に報告されていたが [30]、当時まだ ADP/ATP 透過担体のコンホメーションについてはっきりとした概念が示されていなかった。今回、より詳細にこの変化を解析することにより、NEM による BHM 懸濁液の濁度上昇が、NEM の Cys⁵⁶ の標識に伴う bhAAC の m-state 固定化に起因することが明らかとなった。つまり、NEM による bhAAC の活性阻害は、基質結合後に起こる立体構造変化の阻害によるといえる。

5.3.3 Cys^{M1} のループ M1 の立体配置変化に対する機能的役割

NEM, MMTS による bhAAC の Cys⁵⁶ 修飾反応とそれに伴う bhAAC の透過活性の変化の機構を解析した結果、Cys^{M1} が ADP/ATP 透過担体の立体構造変化に関与する残基であることが示唆された。そこで、次に y2NbhAAC 及び yAAC2 の種々の Cys^{M1} 変異体を酵母細胞にて発現させその機能解析を行った。このような解析に関して、既に Nelson らが yAAC2 の Cys⁷³ を Ser に置換した結果、ADP/ATP 透過担体の機能が保持されたことを報告している [31]。この結果より、Cys^{M1} の機能的役割及び NEM の Cys^{M1} 標識による透過阻害の機能について Klingenberg らは、

- 1) Cys^{M1} が機能的に必須な残基ではなく、NEM の基質輸送阻害も NEM のかさばった構造が何らかの立体障害となっている。
- 2) Cys を Ser に置換しても SH 基が水酸基にかわるだけで、その残基の水素結合性は残存することから、ADP/ATP 透過担体の立体構造変化の際、Cys^{M1} その SH 基と他の特定残基と水素結合することで機能的に関与しており、NEM の Cys^{M1} 標識による阻害はこの SH 基を修飾することによる。

という 2 つの仮説を立てた [32]。今回、y2NbhAAC, yAAC2 共に Cys^{M1} を Ala, Val に置換しても透過活性がほぼ完全に保存された (表 5-1)。一方、水酸基を有する Tyr に置換しても活性は完全に消失した (表 5-1)。この結果から、仮説 2 は成立しないと言える。つまり、Cys^{M1} 自体は ADP/ATP 透過担体の基質輸送に必須なアミノ酸残基ではないことが明らかとなった。加えて、より残基体積の高いアミノ酸残基に置換するに従い、変異体の透過活性が低下し、Van der Waals 体積 [26] が Met 残基 (83 Å³) 以上になると活性が極端に低下することが明らかとなった (表 5-1)。この結果は、bhAAC において活性阻害を起こす NEM 化したシステイン残基の体積 (152 Å³) やチオメチル化したシステイン残基の体積 (91 Å³) にもよく対応していた。以上の知見から、化学修飾や変異により Cys^{M1} 位のかさ高さが上昇すると、ADP/ATP 透過担体の立体構造変化時に何らかの立体障害が生じ、その結果 ADP/ATP 透過担体の基質輸送が阻害されると考えられる。

5.3.4 ループ M1 の立体配置変化に対するアスパラギン酸残基の関与

近年、様々なタンパク質における NEM による機能障害が基質結合や立体構造変化に対する立体障害であることが報告されている [9-12]。これらの場合、システイン残基近傍のアミノ酸残基が基質結合や立体構造形成に関与することが報告されており、かつ比較的修飾基の小さい MMTS によるシステイン残基修飾では機能阻害を受けない場合が多い [9-12]。

本章の結果より、Cys^{M1} の NEM 修飾による機能阻害は、ADP/ATP 透過担体の立体構造変化に対する立体障害であることが明らかとなった。しかも、MMTS による修飾でも活性が阻害されたことから、Cys^{M1} の非常に近傍に位置するアミノ酸残基が ADP/ATP 透過担体の立体構造変化に関与することが示唆された。そこで、アミノ酸配列比較から、Cys^{M1} の N 末端側に隣接するアスパラギン酸残基に着目し、y2NbhAAC 及び yAAC2 のこの残基の部位特異的変異体の機能解析を行ったところ、グルタミン酸では活性が保持されたが、アスパラギンやアラニンに置換することで、ADP/ATP 透過担体の活性がほぼ完全に阻害された (表 5-2)。この解析結果から、このアスパラギン酸のカルボキシル基が基質輸送に必須であることが明らかになった。カルボキシル基は pKa が低いため、ループ M1 が膜内部に移行しても、解離型を保持するであろう。そのため、c-state においては特定の正電荷を有するアミノ酸残基と塩橋を形成すると考えられる。更に、これが m-state から c-state への立体構造変化もしくは c-state における立体構造維持に必須であり、Cys^{M1} 位の構造的かさ高さの増加がこの塩橋形成の立体障害となり、ADP/ATP 透過担体の機能阻害につながると考えられる。

現在までに、ADP/ATP 透過担体の立体構造変化への関与が強く示唆されるアミノ酸残基を同定したという報告はなく、今回のアスパラギン酸残基が初めての報告となる。

また本章の解析結果から、Cys^{M1}の機能的役割及びNEMの阻害機構が明らかになったことは、ADP/ATP透過担体の透過機能発現機構を解明する上で非常に有用な知見であると考えられる。

5.4 参考文献

- [1] Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554
- [2] Hashimoto, M., Majima, E., Goto, S., Shinohara, Y., and Terada, H., (1999) *Biochemistry* **38**, 1050-1056
- [3] LeBlanc, P., and Clauser, H., (1972) *FEBS Lett.* **23**, 107-113
- [4] Vignais, P.V., and Vignais, P.M., (1972) *FEBS Lett.* **26**, 27-31
- [5] Boulay, F., and Vignais, P.V., (1984) *Biochemistry* **23**, 4807-4812
- [6] Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181-22187
- [7] Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
- [8] Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [9] Chang, A., and Slayman, W., (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15531-15536
- [10] Hutchison, K.A., Matic, G., Meshinchi, S., Bresnick, E.H., and Pratt, W.B., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10505-10509
- [11] Siksnys, V., and Pleckaityte, M., (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 199-205
- [12] Yamaguchi, A., Kimura, T., and Sawai, T., (1993) *FEBS Lett.* **322**, 201-205
- [13] Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
- [14] Stoner, C.D., and Sirak, H.D., (1973) *J. Cell. Biol.* **56**, 51-64
- [15] Stoner, C.D., and Sirak, H.D., (1973) *J. Cell. Biol.* **56**, 65-73
- [16] Scherer, B., and Klingenberg, M., (1974) *Biochemistry* **13**, 161-170
- [17] Weber, N.E., and Bair, P. V., (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* **41**, 821-829
- [18] Klingenberg, M., Grebe, K., and Scherer, B., (1971) *FEBS Lett.* **16**, 253-256
- [19] Aschner, M., Mullaney, K.J., Fehm, M.N., Vitarella, D., Wagoner Jr., D.E., and Kimelberg, H.K., (1994) *Brain Res.* **648**, 16-23
- [20] Betina, S., Gavurníková, G., Havierník, P., Šabová, L., and Kolarov, J., (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 651-657
- [21] de Winde, J.H., and Grivell, L.A., (1993) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **46**, 51-98
- [22] Dorsman, J.C., van Heeswijk, W.C., and Grivell, L.A., (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 7827-7301
- [23] de Winde, J.H., and Grivell, L.A., (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2872-2883
- [24] Klingenberg, M., Gawaz, M., Douglas M.G., and Lowson, J.E., (1992) in: *Molecular Mechanisms of Transport* (Quagliariello, E., and Palmieri, F., Eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 187-195
- [25] Müller, V., Basset, G., Nelson, D.R., and Klingenberg, M., (1996) *Biochemistry* **35**, 16132-16143
- [26] Moriguchi, I., Kanda, Y., and Komatsu, K., (1976) *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1799-1806
- [27] Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [28] Phelip, A., and Wohlrab, H., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19882-19885
- [29] Vignais, P.M., Chabert, J., and Vignais, P.V., (1975) *Biomembranes Structure and Function*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 307-313
- [30] Aquia, H., Eiermann, W., and Klingenberg, M., (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 133-139

- [31] Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1159-1170
[32] Klingenberg, M., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 447-457
[33] Laemmli, U.K., (1970) *Nature* **227**, 680-685
[34] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989) in *Molecular Cloning* (Ford, N. et al. Eds) Cold Spring harbor laboratory Press, New York, E37-E38
[35] Schiestl, R.H., and Gietz, R.D., (1989) *Curr. Genet.* **16**, 339-346
[36] Richards, F.M., (1973) *J. Mol. Biol.* **82**, 1-14
[37] Kyte, J., and Doolittle, R.F., (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132

5.5 実験方法

試薬

NEM : ナカライテスク

MMTS : Aldrich

DTT : ナカライテスク

NACys : ナカライテスク

EMA : Molecular Probe

CATR : Sigma

BKA : Delft University of Technology, Prof. Duineより恵与

[³H]ADP : Du-pont New England Nuclear

[¹⁴C]NEM : Du-pont New England Nuclear

AG1-X8樹脂 : Bio-Rad

Sephadex G-50 : Pharmacia Biotech

合成オリゴDNA : 日清紡

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

ウシ心筋ミトコンドリア (BHM) と垂ミトコンドリア粒子 (SMP) の調製

BHM及びそのSMPは、第2章に記述した方法に従って調製した。CATRを前処理したSMPを調製する際は、第3章のに記述した方法に従った。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は 12 % のアクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法 [33] に準じて行った。試料懸濁液に最終濃度 1 % SDS, 1 % DTT となるように試料緩衝液を添加し溶解した後、SDS-PAGE に供した。泳動後、CBB でタンパク質を染色した。

NEM 標識反応

SMP を反応用 STE 溶液 (50 mM ショ糖, 0.2 mM EDTA, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2)) に 20 mg/ml タンパク質の濃度になるように懸濁し、2 mM NEM と 0 °C で所定時間反応させた。この反応は 10 μmol/mg of protein の DTT を添加することで停止した。

ADP/ATP 透過担体に対する NEM 結合量の測定

[¹⁴C]NEM (比放射活性 4 mCi/mmol) を前記の条件で SMP と反応させた後、SDS-PAGE に供した。結合した NEM 量は、バイオイメージングアナライザー-BAS-1500 Mac (富士フィルム) で 30 kDa の ADP/ATP 透過担体のバンドの放射活性を定量することで求めた。オートラジオグラフィは、Kodak X-OMAT AR フィルムを用い、-80 °C で 20 日間露光した。

MMTS の標識反応

SMP を STE 溶液に 10 mg of protein/mL の濃度になるように懸濁し、200 μM の MMTS と 0 °C で所定時間反応させた。この反応は 5 μmol/mg of protein の NACys を添加することで停止した。

Cu(OP)₂ による架橋反応

SMP を NEM または MMTS で前述の条件で処理した後、ST 溶液 (250 mM ショ糖, 10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)) で膨潤させた Sephadex G-50 ミニカラム (0.6 x 5.5 cm) に、速やかに 10 mg/mL タンパク質濃度で 50 μL の反応液を添加し、スピнкаラム法 [34] により、未反応の NEM または MMTS と EDTA を除去した。回収液のタンパク質濃度を測定した後、タンパク濃度が 4 mg of protein/mL になるように ST 溶液に懸濁し、100 μM Cu(OP)₂ と 0 °C で 10 分間反応させた。この反応は 5 mM EDTA と 5 mM NEM を添加することで停止した。未処理の SMP についても同じ手順で反応を行った。Cu(OP)₂ による ADP/ATP 透過担体分子間架橋反応の解析は第 2 章における方法に従って、60 kDa (AAC)₂ バンドの CBB 染色強度から求めた。

EMA による標識反応のタイムコース

SMP を NEM または MMTS で前述の条件で 10 分間処理した後、Cu(OP)₂ の架橋反応の項で記した様な手順で、STE 溶液で膨潤させた Sephadex G-50 カラムを用いてスピнкаラム法により、未反応の NEM, MMTS を除去した。その後、STE 溶液で 2mg of protein/mL のタンパク質濃度に希釈し、20 μM EMA と 0 °C で所定時間反応させた。この反応は、10 μmol/mg of protein の DTT を添加することで停止した。EMA による標識反応の解析は以下の手順で行った。試料懸濁液に最終濃度 1 % SDS, 1 % DTT となるように試料緩衝液を添加し溶解した後、15 % アクリルアミドゲルの SDS-PAGE に供し、ゲル中の標識された ADP/ATP 透過担体バンドの相対蛍光強度を、島津クロマトスキャナー CS-9000 を用いて、530 nm の励起光により得られた蛍光を測定して求めた。

ADP 透過活性の測定

SMP の ADP 透過活性の測定は、第 3 章にて記述した方法に従った。

NEM, MMTS を処理した BHM は、遠心処理により沈殿させた。沈殿を STE 溶液で 3 回洗うことで外液中の ADP 及び未反応の SH 試薬を除去した後、1 μg/mL のオリゴマイシンを含む同溶液に 1 mg of protein/mL の濃度で懸濁し、0 °C にて放置した。その後 100 μM [³H]ADP (比放射活性 185 kBq/μmol) を添加し、0 °C にて 10 秒間放置した。取り込み反応を 5 μM CATR により停止させた後、直ちに遠心操作及び STE 溶液による沈殿の洗浄を 2 回行い、未取り込みの [³H]ADP を除去した。沈殿した BHM は 2 % SDS にて可溶化した後、その放射活性を液体シンチレーションカウンター LSC-3500 (アロカ) にて測定されることで、ADP 取り込み活性を算出された。

BHM の濁度変化の測定

単離直後 (24 時間以内) の BHM を 1 mg of protein/mL のタンパク質濃度になるように 1 μg/mL のオリゴマイシンを含む濁度測定用溶液 (250 mM ショ糖, 0.2 mM EDTA, 10 mM PIPES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 7.2)) に懸濁し、この懸濁液の波長 600 nm における濁度変化を島津 UV-300 分光光度計を用いて測定した。反応はガラスセル中で行い、測定は 25 °C, 攪拌下で行った。この際、各試薬の添加容量は、濁度への影響を考慮して 5 μL 以下とした。

yAAC2 及び y2NbhAAC への変異導入

bhAAC の Asp⁵⁵, Cys⁵⁶ に相当する y2NbhAAC の Asp⁷¹, Cys⁷² 及び yAAC2 の Asp⁷², Cys⁷³ への点変異の導入は、PCR を利用した定法に従った (図 5-12) [25, 31]。y2NbhAAC の場合、変異導入用のプライマー 3 と 2 は、それぞれ 5'-GGGATCATTGATTGCGGTGGTGAG (y2NbhAAC のコード領域 202 ~ 224 に相当) とその相補配列の合成プライマーを使用した。Cys⁷² への変異の導入を行う場合、上記プライマーの下線で示した Cys⁷² のコドン (TGC) を、Ser (TCA), Thr (ACC), Tyr (TAC), Ala (GCT), Val (GTC), Met (ATG) のコドンに変換して合成されたプライマーを用いた。Asp⁷¹ への変異の導入を行う場合、上記プライマーの波線で示した Asp⁷¹ のコドン (GAT) を、Glu (GAC), Ala (GCT), Asn (AAC) のコドンに変換して合成されたプライマーを用いた。更に、プライマー 1 及び 4 はそれぞれ HT499 及び HT432 (共に第 4 章参照) を用いて、未変異の y2NbhAAC の cDNA を鋳型として用いた。yAAC2 の場合は、変異導入用のプライマー 3 と 2 は、それぞれ 5'-GGTATCTT-AGACTGTTTCAAGAGA (yAAC2 のコード領域 205 ~ 228 に相当) とその相補配列の合成プライマーを使用した。変異導入を行う場合、上記プライマーの下線で示した Cys⁷³ のコドン (TGT) 及び Asp⁷² のコドン (GAC) を、y2NbhAAC と同じように各アミノ酸残基

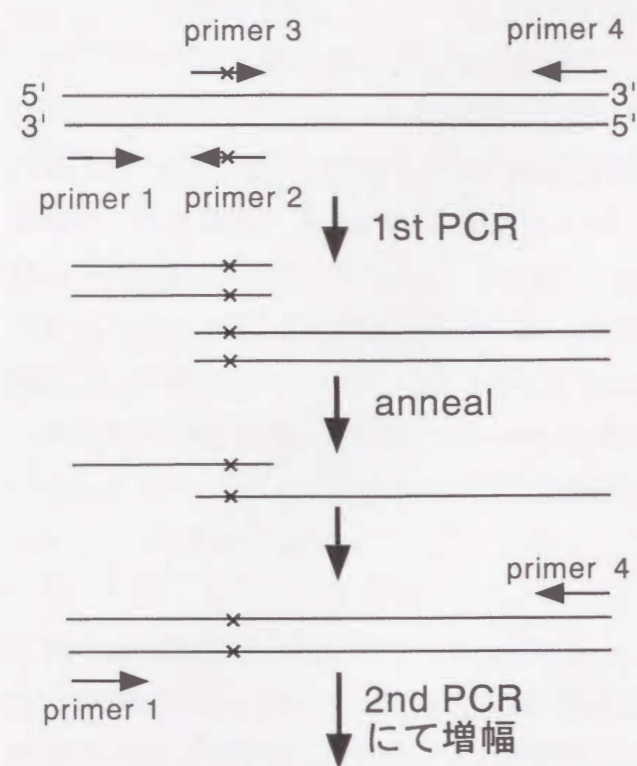


図 5-12 PCR による変異導入法

部位特異的な変異の導入には2段階のPCRを行った。第1段階のPCRにおいて、鋳型には y2NbhAAC もしくは yAAC2 の cDNA を鋳型とした。更に、増幅用のプライマーには、両末端のプライマー1と4に加え、目的の部位に変異をもつプライマー3とこれに相補的なプライマー2も用いた。プライマー1と2及び3と4のペアでそれぞれ PCR を行った。それぞれの PCR 産物を Klenow にて処理することで 3' overhang を取り除いた。次に両 PCR 産物を混合して、94 °C にて熱変性させた後、相補する部分をアニールさせた。相補鎖を合成した後、プライマー1と4を用いて変異が導入された cDNA 全長を PCR にて増幅した。

のコドンに変換した合成プライマーを用いた。調製された変異AACのcDNAは、酵母発現ベクターであるpRS314-YA2P (第4章参照) にサブクローニングした。この発現プラスミドを用いて酢酸リチウム法 [35] により宿主酵母細胞WB-12 (第4章参照) を形質転換した。

酵母細胞を用いた種々の実験方法

宿主細胞及び形質転換細胞などの酵母細胞の培養及びグリセリン培地上での生育、ミトコンドリアの単離、ミトコンドリアタンパク質の定量法、ミトコンドリアのADP透過活性の測定法は全て第4章の方法に従った。

第6章

ADP/ATP 透過担体の基質認識に関与するマトリックス側第2ループ中のアミノ酸残基の同定

6.1 緒言

ADP/ATP 透過担体は、ミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を司る膜タンパク質である。序論にて記述したように ADP/ATP 透過担体の基質認識は、種々の ATP 加水分解酵素などの他の ATP 結合タンパク質と比較して非常に特殊であり、キレート金属イオンを必要としない [1]。更に、特異的阻害剤である CATR や BKA が 3 価の負電荷を有することから、ADP/ATP 透過担体が多価の有機アニオンを認識していることが示唆される。その一方で、ADP/ATP 透過担体が同じプリン環を有する GDP や GTP を輸送しないことから [2]、最終的な基質認識部位では非常に厳密に基質の立体構造を認識していることがわかっている。このような特異性の高い ADP/ATP 透過担体の基質認識機構については非常に興味を持たれるところであるが、近年までその詳細は全く明らかではなかった。

真島らは、2 価の負電荷を有する SH 試薬エオシン 5-マレイミド (EMA, 図 6-1) が、非常に迅速にかつ特異的にウシ心筋 ADP/ATP 透過担体 (bhAAC) のマトリックス側第2ループ (M2) に存在する Cys¹⁵⁹ を標識することに着目し [3]、その反応機序について解析を行った [4]。その結果、SH 基と共有結合を形成するマレイミド基を持たないエオシン-Y (図 6-1) がマトリックス側からの ADP の結合を拮抗的に阻害することを見い

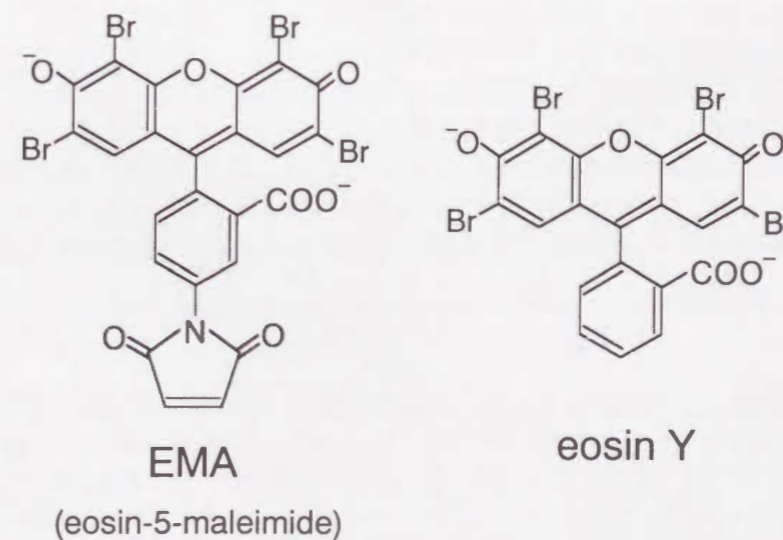


図 6-1 EMA 及びエオシン-Y の構造

だした [4]。更に、エオシン-Y の電子的構造を量子力学的に解析したところ、その静電ポテンシャル (ESP) 構造がアデノシンと高い類似性を示すことも明らかとなった [4]。これらの知見から、EMA 及びエオシン-Y が、ADP や ATP 同様に bhAAC に認識されていると考えられ、Cys¹⁵⁹ が bhAAC 基質結合部位内もしくはその近傍に位置することが示唆された。また、アジド化 ADP [5], ATP [6], ATR [7] の結合部位がループ M2 に含まれることが示唆されていることも考慮すると、ループ M2 が ADP/ATP 透過担体における主たる基質認識部位であるといえる。しかしながら、ループ M2 の構造及び基質との相互作用に関する知見は、最近までほとんど報告されていなかった。

真島と寺田は、最近、コンピューターグラフィックス (CG) シミュレーションにより、bhAAC のループ M2 領域 (Asp¹³⁴ ~ Gln¹⁷⁴) (図 6-2) の 3 次元構造解析と基質分子との相互作用様式について解析した結果から、基質認識に関与すると想定されるいくつかのアミノ酸残基に関して報告している [8]。本章では、これを含めた過去の報告に基づいて、ループ M2 中のアミノ酸残基について、y2NbhAAC を用いた部位特異的変異解析を行った。そして、その結果をもとにループ M2 における基質認識機構について考察した。

6.2 結果

6.2.1 ADP/ATP 透過担体のループ M2 領域のアミノ酸配列比較

まず、bhAAC のループ M2 領域 (Asp¹³⁴ ~ Gln¹⁷⁴) [9] を既に明らかになっている他の 22 種の ADP/ATP 透過担体 (アイソフォームを含む) [10] のループ M2 領域とホモロジー解析を行った。図 6-2 は解析に引用した 10 種の ADP/ATP 透過担体のループ M2 領域のアミノ酸残基配列を列挙した [11]。その結果、ループ M2 領域は、種間での相同性という観点から、4 つの副領域 (副領域 I ~ IV) に分割できることがわかった (図 6-2)。bhAAC の配列に基づいて、副領域 I (Asp¹³⁴ ~ Leu¹⁴⁰) は、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーの共通配列 (P-x-(D, E)-x-x-(K, R)) の一部を含み、ADP/ATP 透過担体以外の溶質輸送担体でも高い相同性を示す領域である。また、副領域 IV (Gly¹⁶⁷ ~ Gln¹⁷⁴) も副領域 I と同様に他の溶質輸送担体とも相同性を示す領域であった (第 1 章 図 1-2 参照)。即ち、これら膜貫通領域付近の領域は、ミトコンドリア溶質輸送担体の膜内構造維持に関与する領域であると推察される。残るループ中央部の配列のうち、副領域 II (Ala¹⁴¹ ~ Gln¹⁵⁰) は種間でホモロジーが低い領域であったのに対し、C 末端側の副領域 III (Arg¹⁵¹ ~ Asp¹⁶⁷) ADP/ATP 透過担体アイソフォーム間で相同性の高い領域であった。以上の解析から、ループ M2 領域による基質認識にはこの副領域 III が関与するのではないかと推察された。この推察は、副領域 III 中にはエオシン骨格を持つ SH 試薬 EMA [3] の結合部位である Cys¹⁵⁹ が含まれていることから支持された。

		*. * * * * * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *
bhAAC	135-DFARTRLAAD--VGKGAQQREFTGLGNCITKIFKSDGLRGLYQ-174	
bANT1		
bANT2	135-DFARTRLAAD--VGKSGSEREFRGLGDCLVKITKSDGIRGLYQ-174	
hANT1	135-DFARTRLAAD--VGKGAQQREFHGLGDCI I K I F K S D G L R G L Y Q - 1 7 4	
hANT3	135-DFARTRLAAD--VGKSGAEREFRGLGDCLVKIYKSDGKGLYQ-174	
rANT1	135-DFARTRLAAD--VGKSSQREFNGLGDCLTKIFKSDGLKGLYQ-174	
yAAC1	138-DYARTRLAADARGSKSTSQRQFNGLLDVYKKTCLKTDGLLGLYR-179	
yAAC2	147-DYARTRLAADSKSSKKGARQFNGLIDVYKKTCLKSDGVAGLYR-188	
yAAC3	136-DFARTRLAADAKSSKKGARQFNGLTDVYKKTCLKTDGIAGLYR-177	
ncAAC	138-DYARTRLANDAKSAKKGGERQFNGLVDVYRKTIASDGIAGLYR-179	
riceAAC	148-DYARTRLANDAKAAKGGGERQFNGLVDVYRKTCLKSDGIAGLYR-189	

I II III IV

図 6-2 各種 ADP/ATP 透過担体のループ M2 領域のアミノ酸配列

各種 ADP/ATP 透過担体の配列は、総説 [11] に従った。アスタリスクで保存されていたアミノ酸残基、ドットで同性質のアミノ酸残基を示す。種の略号として h:ヒト, b:ウシ, r:ラット, nc:アカパンカビ, y:出芽酵母, rice:コメを示す。

6.2.2 y2NbhAAC におけるループ M2 領域部位特異的変異体の機能解析

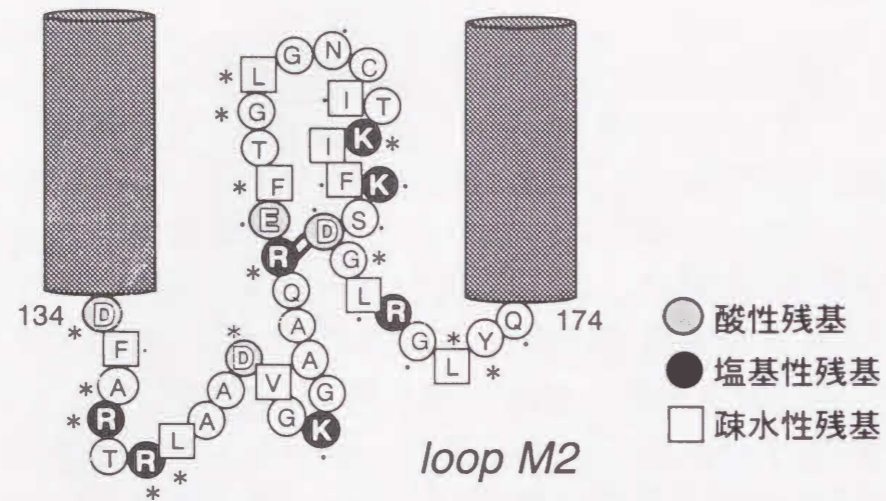


図 6-3 bhAAC のループ M2 領域のトポロジー [8]

アスタリスクで種間で保存されていたアミノ酸残基、ドットで種間で同性質であったアミノ酸残基を示す。

前述のように着目したループ M2 中の副領域 III 中で注目すべき数カ所のアミノ酸残基の部位特異的変異解析を y2NbhAAC を用いて行った。なお、以後のアミノ酸残基番号は、ここまでの表記との間での混乱を避けるため、y2NbhAAC 本来のアミノ酸残基番号ではなく、native な bhAAC のアミノ酸残基番号に置き換えて記載した。y2NbhAAC 本来のアミノ酸残基番号は bhAAC の番号に N 末端領域の延長分 16 残基を足した番号である (例 bhAAC: Cys⁵⁶=y2NbhAAC: Cys⁷², 第 5 章参照)。

変異を導入するアミノ酸残基を選択するに際し、最近、真島と寺田により報告されたループ M2 の 3 次元構造及び基質との相互作用様式の CG シミュレーションの報告を参考にした [8]。図 6-3 には、これに基づいた bhAAC のループ M2 領域のトポロジーを示す。これによると、非常に興味深いことに前述の Arg¹⁵¹ ~ Asp¹⁶⁷ 領域は、Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ が塩橋を形成することでヘアピン構造をとった。更に、領域内には Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³, Phe¹⁶⁴ と 4 個の疎水性残基が近接しており、クラスターを形成していた。まず、これら 6 個の特徴的なアミノ酸残基について解析した。

図 6-4 には、各 y2NbhAAC 変異体にて形質転換した ADP/ATP 透過担体欠損酵母細胞 WB-12 のグリセリン培地上での生育を観察した結果を示す。まず、塩橋を形成するとされた Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ をそれぞれアラニンに置換した R151A, D167A 各変異体で形質転換した WB-12 細胞は、未変異体 (p-WT) にて形質転換した場合とは対照的にグリセリン培地上で生育しなかったことから、これら変異体は不活性であることが示唆された。更に、実際に形質転換細胞からミトコンドリアを単離した後、各変異体の分子活性を測

定したが、これら変異体の ADP 透過活性は全く検出されなかった。次に、疎水性クラスターを形成するとされた 4 残基 (Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³, Phe¹⁶⁴) について同様にアラニンに置換して解析したところ、F163A, I160A, I163A の 3 変異体がそれぞれ発現した WB-12 細胞もグリセリン培地上で全く生育しなかった (図 6-4)。唯一 F164A 変異体で形質転換した WB-12 細胞はグリセリン培地上で顕著に生育したが、その液体培地中での倍加時間は、約 13 時間と p-WT の形質転換細胞 (8 時間) と比較して長かった。更に、F180A 変異体の分子活性を測定したところ、p-WT に対して約 65 %程度であった。以上の結果は、不活性化が起きた 5 種のアミノ酸残基に関して透過機能に必須のアミノ酸残基であることを示し、前述のシミュレーションにより想定された塩橋及び疎水性クラスター領域が ADP/ATP 透過担体の透過機能に関与する部位であることを示唆した。

次に、種間で保存されたアミノ酸残基である Gly¹⁵⁵ (図 6-3) をプロリンに置換した。2 次構造予測から [8], Gly¹⁵⁵ はヘアピン構造の hinge 部に位置し、Gly¹⁵⁷ とともにターン構造を形成していると考えられる (図 6-3)。グリシンは側鎖効果がないアミノ酸残基であるので、この残基のペプチド骨格は自由回転し、構造的に変化しやすい部位であるといえる。即ち、Gly¹⁵⁵ をプロリンに置換すると、この部位のペプチド骨格を強制的なターン構造に固定することになる。解析の結果、G155P 変異体は透過活性が完全に消失していた (図 6-4)。したがって、Gly¹⁵⁵ はターン構造を単にとるだけでなく、その構造を自由に变化させることと、その構造的な可変性が ADP/ATP 透過担体の透過機能に

y2NbhAAC

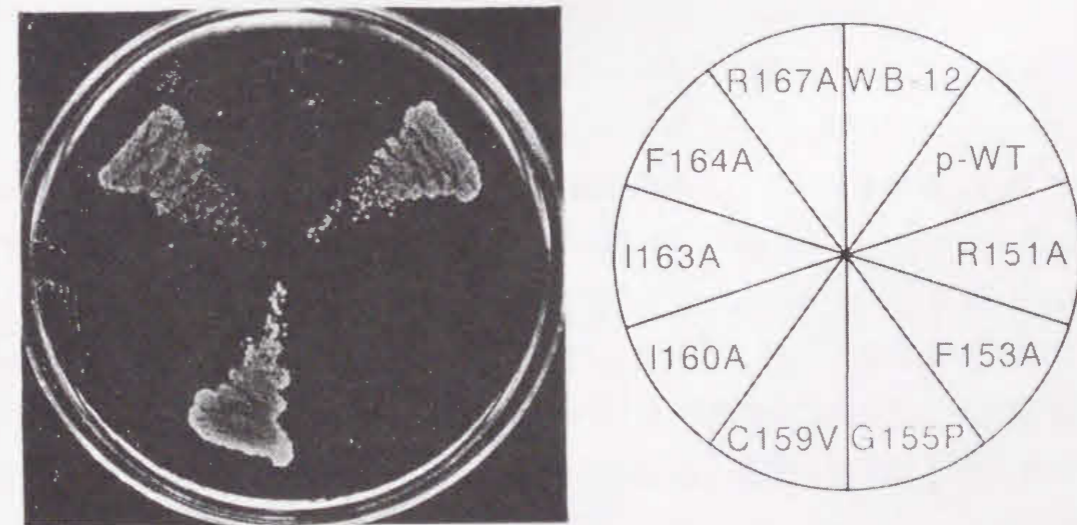


図 6-5 y2NbhAAC のループ M2 アミノ酸残基変異体を発現させた酵母細胞のグリセリン培地上での生育
各変異体により形質転換された ADP/ATP 透過担体欠損酵母細胞 WB-12 をグリセリン寒天培地上で 30 °C にて 5 日間培養した。

重要であることが示唆された。

最後に EMA の結合部位である Cys¹⁵⁹ をバリンに置換した。Cys¹⁵⁹ 位は、高等生物ではシステイン残基で保存されているが、酵母などの真菌類ではバリンに保存されている (図 6-2)。C159V 変異体で形質転換した WB-12 細胞のグリセリン培地中での倍加時間は、p-WT によるそれと比較して少し速かった (約 7 時間)。酵母ミトコンドリアにおける変異体の分子活性も p-WT より約 35 % 程度逆に上昇した。この結果は Cys¹⁵⁹ が直接的に bhAAC の透過活性に関与していないことを明確に示した。

6.3 考察

本章では、過去の報告 [6, 8-10] から基質結合部位と想定されたループ M2 領域のアミノ酸残基の透過機能に与える影響について、y2NbhAAC を用いた特異的変異解析を行うことで検討した。特に、様々な生物種の ADP/ATP 透過担体のアミノ酸配列を比較した結果から、ADP/ATP 透過担体に特異的に相同性の高い領域として Arg¹⁵¹ ~ Asp¹⁶⁷ の領域に着目した (図 6-2)。ADP/ATP 透過担体の基質認識及び透過機構に関しては、1970 年代から種々の説が報告されてきた [6, 12]。その中、現在でも様々な輸送モデルの基本となっているのが、Klingenberg が提唱した 'single-binding center-gated pore model' である (図 1-4) [13]。このモデルでは、基質結合部位には荷電したアミノ酸残基間での塩橋がゲートとして形成されている [13]。このことは現在でも広く受け入れられており [6, 10]、ADP/ATP 透過担体の基質認識機構の重要な概念のひとつとなっている。そこで、副領域 III 中の荷電アミノ酸残基を検討したところ、本領域中には Arg¹⁵¹, Glu¹⁵², Lys¹⁶², Asp¹⁶⁵, Asp¹⁶⁷ と 5 個の荷電アミノ酸残基が存在し、このうち種間で電荷が保存されているアミノ酸残基は、Arg¹⁵¹ と Lys¹⁶² 及び Asp¹⁶⁷ であった。このうち、は Lys¹⁶² は既に酵母 2 型アイソフォーム (yAAC2) において、これに相当するリジン残基の部位特異的変異解析が行われており、このリジン残基が yAAC2 の透過機能に必須ではないことが明らかとなっている [14]。今回、Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ が bhAAC の透過機能に必須であることが明らかとなった。前述のように、最近の CG シミュレーションの結果から、Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ の両残基が塩橋を形成する可能性があることが報告されており [6]、今回のこの結果は両残基が塩橋を形成することを支持した。

過去の報告より、ADP/ATP 透過担体の基質認識部位にはアデニン環を包含する様な疎水性ポケットが存在することが示唆されている [4]。CG シミュレーションによると、Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ の間の塩橋の近傍に疎水性残基によるクラスターが形成される可能性が示唆された [6]。そこで次に、その疎水性クラスターに相当する Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³ Phe¹⁶⁴ をアラニンに置換した結果、Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³ 残基が bhAAC の透過機能に必須であることが明らかとなった。おそらくこれらは基質と直接疎水性相互作用を行うと考えられる。しかし、疎水性クラスターを形成すると思われた Phe¹⁶⁴ はアラニンに置換しても、透過活性は残存していた。Phe¹⁶⁴ は比較的種間でも疎水性残基としてよく保存されている (図 6-3)。しかし、周辺の配列を加えて検討したところ、高等生物の ADP/ATP 透過担体に限れば、Ile¹⁶³ の方が保存されていた (図 6-2)。また、酵母などの真菌やコメなどの植物では Phe¹⁶⁴ 位がロイシン又はイソロイシンで保存されていた (図

6-2)。以上の知見から、実際に保存されているアミノ酸残基は Ile¹⁶³ の方であるといえる。そして、今回の結果は副領域 III で保存されている 3 つの疎水性アミノ酸残基が透過機能に必須であることを明らかにし、これらが疎水性のポケットを形成していることを示唆した。

CG シミュレーション上でループの hinge 部に位置するとされた Gly¹⁵⁵ をプロリンに置換して構造的な自由度を制限した結果、透過活性が消失した (図 6-4)。この結果から、2 次構造予測 [8] によりターン構造を形成することが予想されている Gly¹⁵⁵/Gly¹⁵⁷ 領域の構造が可変的であることを示し、この可変性が透過活性発現に必須であることが示唆された。おそらく、基質が結合した後、このヘアピン構造が変化すると考えられ、その際 Gly¹⁵⁵/Gly¹⁵⁷ 領域は、この立体構造変化において重要な役割を果たすのかもしれない。

また、EMA の結合部位である Cys¹⁵⁹ をバリンに置換すると透過活性は逆に上昇した (図 6-5)。この結果から、Cys¹⁵⁹ は基質認識に直接関与しないことが強く示唆された。yAAC2 など哺乳動物以外の ADP/ATP 透過担体では Cys¹⁵⁹ 位はバリンで保存されている [9]。加えて、酵母 2 型 ADP/ATP 透過担体は、ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体よりも分子活性が高かった (第 4 章, 表 4-1)。以上の知見から、Cys¹⁵⁹ 位は基質結合に直接的に関与しないものの、この位置の疎水性の増大は ADP/ATP 透過担体の透過活性を増大させるといえる。この結果のみならず、F164A 変異体で分子活性が低下したことを含めて考えると、この副領域 III で形成されると考えられるヘアピン構造全体の中の疎水性度の変化は、ADP/ATP 透過担体の透過活性に影響を与えると言える。おそらくこの領域中の直接基質と相互作用しないアミノ酸残基は、疎水性クラスターの構造維持に影響を与えると考えられ、クラスター周辺の疎水性度の上昇がクラスター構造の安定化につながると考えられる。

以上本章の結果を考慮してモデル化したループ M2 の基質認識機構を図 6-5 に示す。Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ をはじめとするこの領域内の酸性及び塩基性残基は同一ループ内もしくは 2 量体構造中の対向するループ間で塩橋を形成する。更に、この塩橋より更に内部では、Phe¹⁵³, Ile¹⁶⁰, Ile¹⁶³ がなどの疎水性アミノ酸残基が、2 量体構造中で向かい合わせる形で疎水性ポケット [4] を形成している。以上の相互作用により基質認識部位のゲートは形成されている。基質のリン酸エステル部がこの塩橋を開裂した後、疎水性相互作用により更にゲート内部に侵入する。そして基質に侵入に伴いながら、このヘアピン領域の立体構造も変化する。このような基質認識機構は、過去の知見 [3, 4] に対しても矛盾しないものであった。

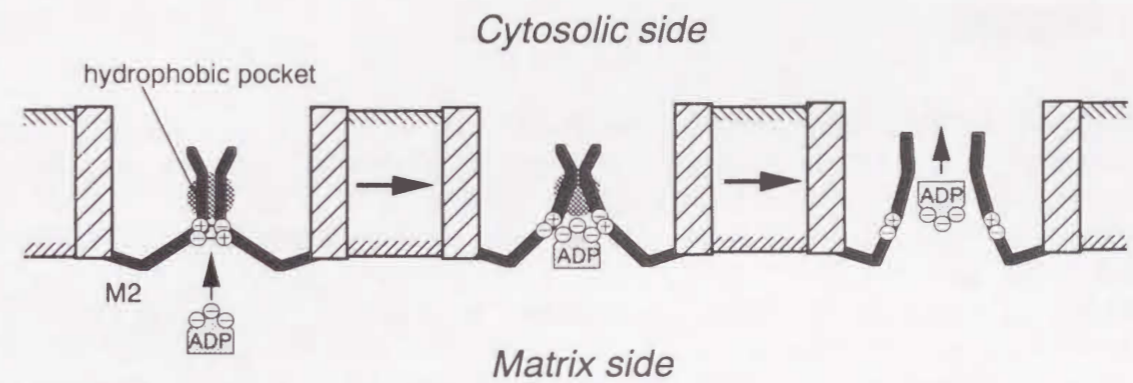


図 6-5 ループ M2 による基質認識機構
斜線部が膜貫通領域、黒太線がループ M2 をそれぞれ示す。

今回の知見は、ループ M2 が ADP/ATP 透過担体の基質認識部位であることを支持する結果であり、ADP/ATP 透過担体の透過機構を研究する上で意義深い知見であると考えられる。

6.4 参考文献

- [1] Krämer, R., (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **592**, 615-620
- [2] Klingenberg, M., (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A.N., Eds), Plenum Publishing Corp., New York, Vol. 3, pp. 383-438
- [3] Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22181-22187
- [4] Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
- [5] Dalbon, P., Brandolin, G., Boulay, F., Hoppe, J., and Vignais, P.V., (1988) *Biochemistry* **27**, 5141-5149
- [6] Mayinger, P., Winkler, E., and Klingenberg, M., (1989) *FEBS Lett.* **244**, 421-426
- [7] Boulay, F., Lauquin, G. J.-M., Tsugita, A. and Vignais, P.V., (1983) *Biochemistry* **22**, 477-484
- [8] 真島英司, 寺田 弘, (1998) *生物物理*, **38**, 245-249
- [9] Aquia, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M., (1982) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 345-349
- [10] Fiore, C., Trézéguet, V., Le Saux, A., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Nodel, F., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G., and Vignais, P.V., (1998) *Biochimie* **80**, 137-150
- [11] Brandolin, G., Le Saux, A., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.-M., and Vignais, P.V. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 459-472
- [12] Vignais, P.V., Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P., Block, M.R., and Gauche, I., (1989) in: *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (A. Azzi, et al. Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 133-146
- [13] Klingenberg, M., (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A.N., Eds), Plenum Publishing Corp., New York, Vol. 3, pp. 383-438
- [14] Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1159-1170

6.5 実験方法

CATR : Sigma

BKA : Delft University of Technology, Prof. Duineより恵与

[¹⁴C]ADP : Du-pont New England Nuclear

合成オリゴDNA : 日清紡

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

y2NbhAAC変異体の調製と機能解析

y2NbhAACの部位特異的変異体をコードするcDNAの調製方法は、第5章にて記述した方法に従いPCRにて調製した。点変異を導入する際、Arg¹⁶⁷ (CGG), Phe¹⁶⁹, Phe¹⁸⁰ (TTC), Ile¹⁷⁶, Ile¹⁷⁹ (ATC), Asp¹⁸³ (GAT) のコドンにAla (GCT) のコドンに、Gly¹⁷¹ (GGT) のコドンにPro (CCA)のコドンに、Cys¹⁷⁵ (TGT) のコドンにVal (GTC)にそれぞれ変換した合成プライマーを用いた。調製された変異AACのcDNAは、酵母発現ベクターであるpRS314-YA2P (第4章参照) にサブクローニングした。この発現プラスミドを用いて宿主酵母細胞WB-12 (第4章参照) を形質転換した。形質転換細胞などの酵母細胞の培養及びグリセロール培地上での生育及びミトコンドリアの単離、y2NbhAAC発現量の定量、ADP透過活性の測定は全て第4章の方法に従った。

第7章 総括

本研究では、ミトコンドリア ADP/ATP 透過担体の基質透過機構を解明することを目的とし、特にマトリックス側に位置する3つの巨大な親水性ループ (M1, M2, M3) に着目して、その構造と機能的役割について検討した。第2, 3章では、SH 基特異的な種々の化学架橋試薬を用いて、ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の膜内構造におけるシステイン残基の空間的配置について検討し、ADP/ATP 透過担体の機能単位や各ループの立体配置の違いに関して知見を得た。特にループ M1 が基質輸送に伴ってその立体配置を膜内外に大幅に変化させることを見だし、基質輸送に伴った ADP/ATP 透過担体の立体構造変化にループ M1 が関与することがわかった。次に第4章では、酵母細胞にて発現し難かった bhAAC を、細胞質側に突出している N 末端領域を酵母 ADP/ATP 透過担体の相当領域と組み換えたキメラ体とすることで酵母ミトコンドリア上に多量に機能発現させることに成功した。更に第5章では、この発現系を用いてループ M1 の立体配置変化の機構とこれに関与するアミノ酸残基の同定を行い、この立体配置変化が基質輸送に必須であることと、ループ M1 中のシステイン残基の N 末端側に隣接するアスパラギン酸残基が特定残基と塩橋を形成することで立体配置変化に関与することを見いだした。最後に第6章では、基質結合部位と目されるループ M2 の立体構造と基質認識機構に関する過去の報告に基づいて部位特異的変異解析を行った結果から、ループ M2 が基質認識部位であることが強く支持され、その認識機構について有用な知見を得た。

本章では、本研究の成果と既に報告された種々の知見をもとに、ADP/ATP 透過担体のアデニンヌクレオチド透過機構に対するループの関与について総括し、最後にこれをもとにミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーの溶質輸送機構についても考察する。

7.1 ADP/ATP 透過担体の親水性ループの膜内構造と機能的役割

まず、本研究結果から ADP/ATP 透過担体は、膜中において2つの 30 kDa サブユニットが対称に向かい合った 12 回膜貫通型の 2 量体として存在し、機能することが明らかになった (第2, 3章)。更に、0 ~ 16.8 Å と架橋距離が全く異なる全ての架橋試薬によって、本担体が m-state の状態にあるときに Cys⁵⁶ 同士の分子間架橋を形成したことから、Cys⁵⁶ 間距離は少なくとも 0 ~ 16.8 Å の範囲で変動することも明らかとなった (第2, 3章)。以前の報告 [1] によると、12 本の膜貫通ヘリックスのシリンダーを同心円上に配置すると、これにより形成される孔 (pore) の内径はおよそ 36 Å であると算出されている。この知見を考慮すると、Cys⁵⁶ 間距離が大幅に変動していることがわかる。図 7-1 にはウシ心筋 ADP/ATP 透過担体のアミノ酸配列に基づいた 6 回膜貫通構造を示す。

Cys⁵⁶は本透過担体のループ M1 (Glu²⁹ ~ Arg⁷¹) のほぼ中央に位置することから、Cys⁵⁶の存在状態は、ループ M1 の存在状態を反映する可以考虑することができる。従って、ループ M1 は m-state においてマトリックス側に最も露出し、Cys⁵⁶ 間距離が 12 Å の時を中心として広範囲に揺動していることがわかった (第 3 章)。更に、c-state において架橋が全く形成されないことから、ループ M1 は膜内部に貫入していることも明らかとなった。以上の結果からループ M1 は、本透過担体の基質輸送に伴う立体構造変化に応じて、その立体配置を大幅に変化させることになる。加えて、ループ M1 の立体配置変化を阻害することで本透過担体の透過機能が阻害されることから (第 3, 5 章)、この立体配置変化は本透過担体の透過機能に必須であるといえる。以上の結果及び基質である ADP, ATP の分子サイズがおよそ 8 ~ 12 Å 程度であるという知見から [2-4]、ループ M1 はマトリックス側からの基質の移動を制御するゲートとしての役割を有することが強く示唆された。

一方で、本透過担体の他のマトリックス側親水性ループ M2 (Asp¹³⁴, ~ Gln¹⁷⁴), M3 (Asp²³¹ ~ Lys²⁷¹) にも、それぞれほぼ中央の位置にシステイン残基が 1 個ずつ存在するにも関わらず、これらシステイン残基は Cu(OP)₂ 及びジマレイミド誘導体による架橋反応に関係しなかった (第 2, 3 章)。これらシステイン残基はマトリックス側から作用させた SH 試薬と反応することから [5]、決して SH 試薬との反応性が低い非解離状態ではなく、解離した状態にあると考えられる。即ち、ループ M2, M3 が SH 試薬が侵入し孔内部に貫入していることが明らかとなった。前述のように、膜貫通領域で形成される孔の内径は約 36 Å であり、このサイズであると 10 kDa 程度の球状タンパク質でも透過できることになる。しかし、これらループ M2, M3 がこの孔内部に貫入し基質の透過路を形成しているためにより低分子の ADP, ATP のみが輸送可能となる。ループ M1 を含めこれらループの立体配置に関する知見は、リジルエンドペプチダーゼに対する各ループの感受性に関する報告からも強く支持されている [6, 7]。

ADP/ATP 透過担体の基質認識機構に関する従来の報告に基づいて [6, 8-10]、基質認識に関与することが予想されたアミノ酸残基の部位特異的変異解析を行った結果、ループ M2 中のいくつかのアミノ酸残基が透過機能に必須であったことから、ループ M2 が基質結合部位を形成していることが強く示唆された (第 6 章)。現在までに、その電子構造が基質に類似したエオシン骨格を有する EMA [5, 8, 9] や同じく基質類似の構造を有するアジド化アクリジン誘導体 [11] がループ M2 中の Cys¹⁵⁹ をマトリックス側から標識することと、アジド化 ADP, ATP, ATR が細胞質側からループ M2 に結合すること [12-14] が報告されている。加えて BKA もマトリックス側から M2 に結合することが示唆されている [9]。これらの報告は、ADP/ATP 透過担体の基質及び特異的阻害剤の結合が同一部位で行われていることを示し、Klingenberg が提唱した 'single-binding center-

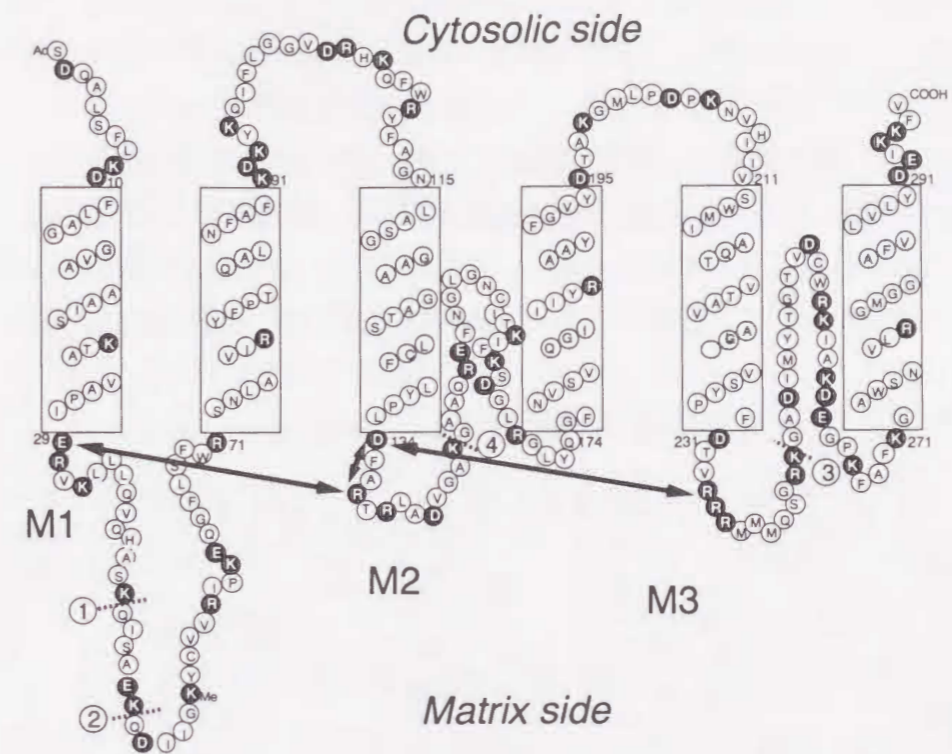


図 7-1 ウシ心筋 ADP/ATP 透過担体の膜内構造

アミノ酸配列は Aquila らの報告 [23] に従った。点線で示した箇所がマトリックス側から作用させたリジルエンドペプチダーゼによる切断部位であり、傍らの丸囲み数字で切断順序を示した。矢印で示した箇所は、Nelson らの yAAC2 での報告 [17] に基づいた塩橋を形成することが予想されるアミノ酸残基対を示す。

gated pore model' [15] を強く支持した。すなわち、ループ M2 が本透過担体における主たる基質結合部位であるといえる。また、このループ M2 中の Arg¹⁵¹ と Asp¹⁶⁷ の塩橋が基質の結合を制御するという過去の報告 [6] から、基質認識後のゲートとしても機能していることが示唆され、この知見は本研究の結果からも支持された (第 6 章)。

また、ループ M3 の機能的役割については本研究では知見を得ることができなかった。Vignais らはアジド ADP がループ M3 中のリジン残基も標識することを示した [12]。更に最近の当研究室の研究報告から、BKA によって Cys¹⁵⁹ 及び Cys²⁵⁶ の SH 試薬による標識が阻害される一方で、eosin-Y によって Cys¹⁵⁹ に対する標識は阻害されるが Cys²⁵⁶ に対する標識は逆に増強されることが示されている [16]。この結果から、基質結合部位はループ M2 を中心に形成されていると考えられ、ループ M3 はむしろその補助的役割を果たしているのではないかとと思われる。おそらくループ M3 は基質結合部位を含めた ADP/ATP 透過担体孔内の構造維持の役割を果たしている可能性がある。また SH 試薬の反応性から、ループ M2 の Cys¹⁵⁹ 付近の領域より、ループ M3 の Cys²⁵⁶ 付近の領域の方がより膜内部の位置に存在することが明らかとなっている [5]。その一方で、最近、マトリックス側からのリジルエンドペプチダーゼによる切断反応解析の結果、ループ

M2 の Lys¹⁴⁶ よりも先に Lys²⁴⁴ の C 末端が切断されることから(図 7-1) [7, 16]、より膜貫通領域に近いセグメントでは、ループ M3 の方がループ M2 のよりマトリックス側に露出していると考えられる。更に、このプロテアーゼによる各ループの切断反応も、c-state に ADP/ATP 透過担体を固定すると完全に阻害されることから [6, 7, 16]、ループ M3 も基質輸送に際して何らかの構造変化を生じていると考えられる。

以上の知見は、これらマトリックス側の巨大なループが ADP/ATP 透過担体の透過機能に関与し、基質輸送に伴い協調的にその立体構造を変化させることを示している。

7.2 ADP/ATP 透過担体の基質透過機構

第 6 章では、ループ M2 おける基質結合部位が、ADP/ATP 透過担体分子間及び分子内での塩橋領域と、疎水性の高いポケットからなることが示唆された。Klingenberg の “single-binding center-gated pore model” [15]において、この塩橋こそがゲートであり基質の結合による塩橋の開裂がゲートが ‘開く’ ことを意味する。従って、ループ M2 の塩橋が基質輸送のゲートであるとするならば、ループ M2 に基質が結合することで基質輸送は達成されるはずである。しかし、基質結合部位とは無関係なループ M1 中の Cys⁵⁶ に化学修飾ないし点変異を行うことで、本担体の基質透過活性を阻害できた (第 5 章)。しかも、その阻害様式で特徴的なこととして、Cys⁵⁶ を修飾しても、マトリックス側からの基質結合は阻害されず、基質結合後の立体構造変化が阻害された (第 5 章)。従って、ループ M2 と基質が結合するだけでは、基質透過は起こらない。更に、Cys⁵⁶ を含むループ M1 は基質輸送に伴ってその立体配置を変化させ、この立体配置変化が透過機能に必須であることがわかった (第 3 章)。従って、ループ M2 に基質が結合した後、ループ M3 を含めたこれら親水性のループは協調的に立体構造を変化させていると言え、これが ADP/ATP 透過担体透過担体の基質輸送の本体であると想定される。

図 7-2 では、7.1 にて提唱した各ループの機能的役割をもとに作製したループの構造変化に基づいた基質輸送モデルを示す。ADP/ATP 透過担体が m-state の時ゲートであるループ M1 がマトリックス側に露出することで、基質結合部位はマトリックス側に曝されている。基質である ADP はループ M1 を通過して結合部位であるループ M2 に結合する。基質認識部位のゲートの開口に伴い、各ループが協調的に立体配置変化を行う。そして c-state では、ループ M1 は孔内部に貫入し、マトリックス側からの基質結合部位への基質の流入を防ぐ。一方、ループ M2 中の基質結合部位は、細胞質側に曝されている。また、ループ M1 がマトリックス側のゲートであることが強く示唆されたことから、同様のゲートが細胞質側にも存在すると考えられる。おそらくループ M3 ないし細胞質側のループがこの役割を果たすと考えられる。しかし、その可能性を示唆する報告

は未だなく、今後の検討課題であると考えられる。つまり、基質結合後の M2 の構造変化に応じて、M1 は閉じる方向へ、細胞質側のゲートは開く方向へと構造変化を起こすと考えられ、これにより、基質は細胞質側に放出されると考えられる。細胞質側からの基質輸送はおそらくこの変化が逆方向に起こり、細胞質側のゲートが開から閉へ、M1 が閉から開へと構造変化する。また、図中では基質を ADP としているがもう一つの基質 ATP の輸送も基本的にはこれと同じであろう (ATP は ADP より負電荷がひとつ多いので関与するアミノ酸残基等が増える可能性はある)。即ち、これらループの協調的な構造変化が、ADP/ATP 透過担体の基質輸送の本体であると考えられ、近年真島らにより提唱された cooperative swinging-loop モデルを強く支持した [6]。

では、基質輸送に際し、ループ同士はどのような相互作用を行うのであろうか。これらループには正電荷を有する残基が多数存在し、負電荷や水酸基などの極性基を有する残基も存在することから、ループ間の塩橋や水素結合が起こりやすいと考えられ、これらの相互作用の解離と再形成が連続的に生じることで、この構造変化が生じると考えられる。事実、本研究では、ループ M1 中のアスパラギン酸残基が、特定のアミノ酸残基と相互作用し、これが ADP/ATP 透過担体の透過機能に必須であることを報告した (第 5 章)。最近、Nelson ら [17] は yAAC2 を用いて種間で保存されたいくつかの極性残基の部位特異的変異解析を行い、更に不活性となった変異体の機能復帰変異体の取得及びその 2 次変異部位の同定を行うことで、ADP/ATP 透過担体内の塩橋形成部位の解析を行った。その結果、ループ M1 (Glu⁴⁵) とループ M2 (Arg¹⁵²) 間及びループ M2 (Asp¹⁴⁹) とループ M3 (Arg²⁵²) 間で塩橋が形成されることが報告された (図 7-1)。しかも、同一ループ M2 の Asp¹⁴⁹ と Arg¹⁵² 間でも塩橋が形成されることも明らかとなった。従って、これら塩橋は ADP/ATP 透過担体の構造変化に応じて組み換えられることが示

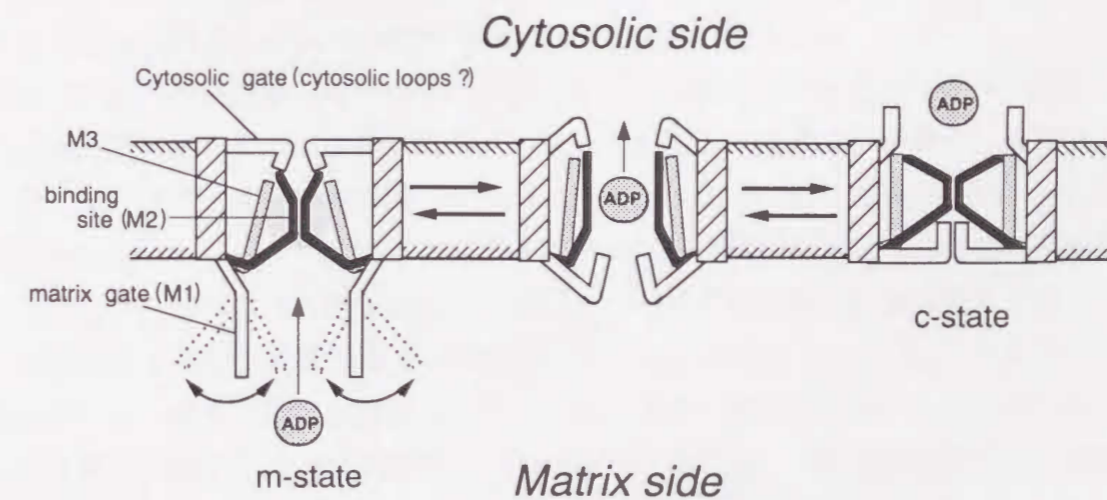


図 7-2 ループの協調的な立体配置変化に基づいた ADP/ATP 透過担体の基質輸送モデル

唆された。残念なことに、Nelson らは、これらの残基がミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーの共通配列 (P-x-(D, E)-x-x-(R, K)) に相当することから、このような塩橋は溶質輸送担体のミトコンドリア内膜中での高次構造維持の役割を担っていると解釈しており、ループ間の相互作用と透過機能との関連について全く論じていない[17]。しかし、この知見は、ループ間の協調性を支持する興味深い知見であり、今後このような手法での解析を薦めることでループ間相互作用に関する知見が得られるのではないかと期待される。

7.3 他の溶質輸送担体ファミリーの基質輸送機構

第 1 章にて記述したように、ミトコンドリア内膜には ADP/ATP 透過担体以外にも様々な溶質輸送担体が存在する。図 1-1 に示す現在同定されている 13 種の輸送担体の基質を比較すると、その基質は小さいもので無機リン酸から大きいもので FAD や ADP, ATP までそのサイズ及び構造は様々である (H⁺を輸送するとされる脱共役タンパク質は実際の基質が脂肪酸であり、同タンパク質に結合した脂肪酸が膜を介した H⁺伝達を行うという仮説が近年主流になりつつあることから [18-20]、この比較からは除外した)。またこれらの輸送形式は、多くが ADP/ATP 透過担体同様の交換輸送である。リン酸キャリアーなど一部の輸送担体は H⁺との共輸送により基質を輸送するが、これらは膜電位消失下では基質同士の交換輸送を行うことが知られている [21]。つまり本質的には全てのミトコンドリア溶質輸送担体は基質を交換輸送していると言える。更に、既にクローニングされている 9 種の輸送担体の一次構造を比較したところ、全ての輸送担体が、1) 約 300 個前後のアミノ酸残基からなり、2) 1 次構造内に 100 残基毎の 3 回繰り返し構造を有し、3) 各繰り返し配列毎に 2 カ所の疎水性領域が存在するという共通点が見出される [22]。つまり、全ての輸送担体が ADP/ATP 透過担体同様に 6 回膜貫通構造を膜中で形成するものと思われる [22]。図 1-2 に示した 5 種の溶質輸送担体のアミノ酸配列を比較すると各繰り返し配列におけるマトリックス側親水性ループと膜貫通領域との連結部付近の配列が非常に類似していることがわかる。特に各繰り返し配列の第 1 番目の膜貫通領域 (領域 I, III, V) と親水性ループの連結点に存在する P-x-(D, E)-x-x-(K, R) はミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーの共通配列として定義されている。

前述のように、ADP/ATP 透過担体中のこの配列中の正電荷残基及び負電荷残基がループ間及び同一ループ内での塩橋を形成しているが、この塩橋は固定されたものではなく、基質の輸送過程で開裂し、他のループ中のアミノ酸残基と新たな塩橋を形成すると考えられる。おそらく他の溶質輸送担体ファミリーでもこのような塩橋が形成、開裂、再形成行われていることが示唆される。したがって、本研究結果よりモデル化された

ADP/ATP 透過担体の協調的なループの立体配置による基質輸送機構が他の溶質輸送担体ファミリーにも応用可能であると考えられる。このモデルに基づくと、全ての溶質輸送担体の基質結合部位もループにより形成されることが示唆される。図 1-2 で基質が不明確な脱共役タンパク質を除く 4 種の輸送担体のループ領域を比較すると、ループ中央部の配列及び残基数にギャップが存在することがよくわかる。ループ領域の長さ比較したところ、基質が最も小さいリン酸キャリアーが最も短く、基質の最も大きい ADP/ATP 透過担体が最も長かった。つまり、基質のサイズとループの長さはよく対応している。なお、脱共役タンパク質の基質が脂肪酸アニオンであるならばその分子サイズはほぼ ADP, ATP と同じと考えられ、脱共役タンパク質と ADP/ATP 透過担体のループの長さがほぼ同じであることも説明がつく。このような考えはあくまで推察の域を脱しないが、今回提唱された ADP/ATP 透過担体における基質輸送のモデルが、他のミトコンドリア溶質輸送担体にも応用できることを更に支持するものであると考える。

本研究では、親水性ループが ADP/ATP 透過担体の透過機能発現に必須であることを明らかにし、ループ M1 及び M2 の機能的役割を示唆する興味深い知見を得た。今後、より詳細に ADP/ATP 透過担体のループ構造と透過機能との関係が解析されることで、ADP/ATP 透過担体の透過機構の全容が解明されると考える。そして、ADP/ATP 透過担体の透過様式の解明が、ミトコンドリア溶質輸送担体の輸送機構の全容の解明につながることを期待される。

7.4 参考文献

- [1] Nelson, D.R., and Douglas, M.G., (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 1171-1182
[2] Cini, R., Burla, M.C., Nunzi, A., Polidori, G.P., and Zanazzi, P.F., (1984) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2467-2476
[3] Sabat, M., Cini, R., Haromy, T., and Sundaralingam, M., (1985) *Biochemistry* **24**, 7827-7833
[4] Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York
[5] Majima, E., Koike, H., Hong, Y.-M., Shinohara, Y., and Terada, H., (1993) *J. Biol. Chem.* **269**, 22181-22187
[6] 真島英司, 寺田 弘, (1998) 生物物理, **38**, 245-249
[7] 武田匡嗣 「ミトコンドリア ADP/ATP 透過担体のループの立体配置変化と輸送機能発現機構」 1997年, 徳島大学修士論文
[8] Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.-M., and Terada, H., (1994) *Biochemistry* **33**, 9530-9536
[9] Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S., and Terada, H., (1998) *Biochemistry* **37**, 424-432
[10] Terada, H., and Majima, E., (1997) *Progr. Colloid Polym. Sci.* **106**, 192-197
[11] Ottemmeier, W., Masson, K., and Kalinna, S., (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 730-733
[12] Stubbs, M., (1981) in *Inhibitors of Mitochondrial Functions* (Erecinska, M., and Wilson, D.F., Eds) Pergamon Press, Oxford, pp. 283-3040
[13] Klingenberg, M., (1977) *Eur. J. Biochem.* **76**, 553-565
[14] Aquia, H., Eiermann, W., Babel, W., and Klingenberg, M., (1978) *Eur. J. Biochem.* **85**, 549-560
[15] Klingenberg, M., (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A.N., Eds), Plenum Publishing Corp., New York, Vol. 3, pp. 383-438
[16] 久保井 覚 「蛍光性化学修飾試薬を用いたミトコンドリアADP/ATP透過担体のループの立体配置変化の解析」 1999年, 徳島大学修士論文
[17] Nelson, D.R., and Felix, C.M., and Swanson, J.M., (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 285-308
[18] Jezek, P., Engstva, H., Zackova, M., Vercesi, A.E., Costa, A.D., Arruda, P., and Garlid, K.D., (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**, 319-327
[19] Jeek, P., Costa, A.D., and Vercesi, A.E., (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24272-24278
[20] Bienengraebel, M., Echtay, K.S., and Klingenberg, M., (1998) *Biochemistry* **37**, 3-8
[21] Palmieri, F., (1994) *FEBS Lett.* **346**, 48-54
[22] Pederson, P.L., (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 431-434
[23] Aquia, H., Misra, D., Eulitz, M., and Klingenberg, M., (1982) *Hoppe-Seyler'S Z. Physiol. Chem.* **363**, 345-349

謝辞

最後にあたり、本研究を遂行する上で終始ご指導ご鞭撻を賜りました徳島大学薬学部 寺田 弘 教授に深い感謝の意を表します。寺田先生には、常日頃から私という人間をご理解頂き、常に深い愛情をもって、研究者として、社会人として、ひいては人間として必要な様々な御勅言を賜りました。心より深謝いたします。

本研究を行うにあたり、一貫してご指導ご討論していただきましたアプロサイエンス 生命科学研究所 真島 英司 博士に心から感謝致します。真島博士には、当研究室における本研究の先達として、技術面のみならず研究に対する心構えなど研究者としての基礎からご指導いただきました。心よりお礼申し上げます。

更に、本研究を遂行するにあたり、良き理解者としてご指導、ご討論していただきました徳島大学薬学部 篠原 康雄 助教授並びに 山崎 尚志 助手に深く感謝致します。お二人には、時には指導者として時には教室の先輩として、技術的にも精神的にもお力添えを頂きました。心よりお礼申し上げます。

架橋試薬の構造解析を行うにあたり、快くご指導ご協力していただきました徳島大学薬学部 後藤 了 博士に心から感謝致します。

本稿をまとめるにあたり、ご査読、ご討論していただきました徳島大学薬学部 山内 卓 教授ならびに 樋口 富彦 教授に深謝致します。

本研究を行うに当たり、次の方々のご協力を頂きました。
猪川 和朗 修士、山口 七 修士、武田 匡嗣 修士、藤原 雅樹 氏、
畑中 貴 修士、石田 真弓 修士、久保井 覚 氏、 宮田 郁香 氏、
三木 里美 氏、 大西 正克 氏、 久米川 亜希子 氏
深く感謝致しますとともに諸氏の今後のご活躍をお祈り申し上げます。



6年間の研究室生活を通じて、不遜な私を暖かく見守り、常に良い刺激を与えて下さいました徳島大学薬学部生物薬品化学教室の卒業生並びに在学生の皆様に心から感謝し、本研究室が今後更に飛躍しますようお祈り申し上げます。

最後に、私という人間の最もよき理解者として、常に代え難い愛情持って見守って下さった父と母に感謝します。

1999年3月 橋本 満



論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 薬 第 50 号	氏 名	橋 本 満
審査委員	主 査	伊 田 弘	
	副 査	山 内 卓	
	副 査	木 通 口 豊 彦	

学位論文題目

ミトコンドリア ADP/ATP 透過担体における親水性ループの構造と機能的役割

審査結果の要旨

ADP/ATP 透過担体はミトコンドリア内膜中に存在して、ATP 合成の基質となる ADP のミトコンドリア内部への移行、および合成された ATP の細胞質中への移動を仲介するトランスポーターである。この 30kDa のトランスポーターには、非常に類似した構造を有するの 3 個のループがミトコンドリア内腔に面して存在しており、基質透過に際して重要な役割を果たしていると考えられる。本研究はウシ心筋ミトコンドリア中の ADP/ATP 透過担体に関し、第 1 親水性ループの存在状態をこのループに存在する Cys56 残基の反応性を指標に研究するとともに、ウシ心筋の透過担体を酵母ミトコンドリアにおいて機能的に発現する系を確立し、この成果を基に第 1 および第 2 ループに存在するアミノ酸残基の部位特異的変異体を調製することによって輸送活性に際する特定のアミノ酸残基の役割を明らかにしようとしたものである。

その結果、①第 1 ループはミトコンドリア内腔に通常は露出しており、広い範囲にわたって揺動しているが、輸送過程において膜内部へと移行する。②このようなループの可逆的な立体配置の変化に基づき、輸送活性が発現する。③ウシ心筋由来の透過担体は細胞質に面した N-末端領域をこれに相当する酵母由来の透過担体の N-末端領域に置換することにより、完全に機能を保持した形で酵母ミトコンドリア膜中に大量に発現させることが可能である。④このキメラ透過担体の部位置換変異体の透過活性から、ループ中の正および負に荷電したアミノ酸残基間の塩橋の形成、開裂が輸送活性に重要な役割を演じていることを明らかにした。

本研究は、ADP/ATP 透過担体の機能がループ同士の可逆的な相互作用とこれに基づくループの立体配置変化によって発現することを明らかにしたもので、その意義は大きい。本研究の成果は輸送担体一般の機能発現機構を理解するうえでも重要な知見を与えるもので、博士（薬学）の学位論文として妥当であると判定する。