

タンパク質結晶構造解析ユーザーグループ

結核菌由来シトクロム bc_1 複合体に含まれるシトクロム c_1c サブユニットの構造解析

田中真之¹、稲岡ダニエル健²、志波智生¹、村瀬良朗³、坂本順司⁴、北潔²、栗栖源嗣¹

(東大院総合文化¹、東大院医²、結核研³、九州工大情報工⁴)

シトクロム bc 複合体は、 b 型シトクロム、 c 型シトクロム、鉄硫黄タンパク質を含む複数のサブユニットから構成され、電子伝達に共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。シトクロム bc 複合体には、構造研究が豊富なミトコンドリア型 bc_1 複合体の他に、シトクロム b_6f 複合体と呼ばれる植物型、好氣的に生育する細菌が持つ細菌型 bc_1 複合体が存在している。細菌型の中でも、結核菌に代表される高 G+C 型グラム陽性菌が持つシトクロム bc_1 複合体は、ゲノム解析により、以下のように特徴的なサブユニット構造をとることが報告されている。サブユニット構成がシトクロム bc 複合体に共通な b 型シトクロム、 c 型シトクロム、鉄硫黄タンパク質のみと非常に単純であること、鉄硫黄タンパク質の膜貫通ヘリックスが3本であること、シトクロム c_1 サブユニットと可溶性電子伝達タンパク質シトクロム c が天然に融合したシトクロム c_1c サブユニットを構成し、ミトコンドリア型とはある程度異なった分子メカニズムで H^+ ポンプ機能を担っている可能性を持つこと、などが指摘されている。そこで、このような非常に特徴的なサブユニット構造を持つ、結核菌 *M. tuberculosis* 由来シトクロム bc_1 複合体に含まれるシトクロム c_1c サブユニットの X 線構造解析を行い、サブユニット内、サブユニット間での電子伝達経路について、ミトコンドリア型と何処が異なり、どのような点が同一なのかを、薬剤開発の観点からも明らかにしたいと考えて、発現、精製・結晶化、構造解析に取り組んだ。

結核菌 *M. tuberculosis* シトクロム c_1c サブユニットの可溶性ドメインのみをクローニングし、ヘムシャペロンを共発現させることで、大腸菌を用いた可溶性ドメインの大量発現に成功した。精製したサンプルを用いて結晶化を行ったところ、酸化状態のサンプルから良質な単結晶を得ることができた。KEK-PF の BL17A を用いて回折強度データを収集し、Fe-SAD 法で位相を決定して、2.9 Å 分解能で構造解析を行った。決定した X 線構造を基に、分子内部での電子伝達経路を検証し、他のマルチヘムシトクロムの構造と比較・検討を行った。次に、ミトコンドリア型シトクロム bc_1 複合体の複数の結晶構造を参考に、結核菌型シトクロム c_1c 周辺の電子伝達経路と分子間相互作用について考察を行った。その結果、解離会合を繰り返すミトコンドリア型の可溶性シトクロム c とは、全く異なる様式でシトクロム c 酸化酵素へ電子伝達する構造基盤が明らかになった。また、膜界面における効率の良い電子伝達を支える膜タンパク質複合体同士による超複合体形成に関しても、構造上の新しい知見を得ることが出来た。