

酸化修飾タンパク質の構造解析 –分子レベルでの酸化ストレス–

静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科 伊藤創平

【背景】

リン酸化、糖鎖付加等の翻訳後修飾は、タンパク質の活性、細胞内での局在、安定性の制御等の機能調節において重要な役割を持っている。一方、老化、生活習慣病、癌等の疾病により酸化ストレスが生じると、タンパク質は非酵素的な修飾を受け、構造変化や機能障害を引き起こすことが知られている。近年、生体高分子酸化傷害に関する分子生物学的な研究の発展は著しく、疾病における特異的な傷害を検出するマーカー(酸化ストレスマーカー)が多数明らかとなっており、臨床的有用性が認められつつある。しかし、酸化ストレスの標的となる生体高分子の構造変化を分子レベルで解明した例は非常に限られる。演者らは、主にX線結晶構造解析や質量分析の手法を用いて、酸化ストレスにより修飾を受けた蛋白質等の解析を行ってきた。今回のシンポジウムでは分子レベルでの酸化傷害の一例として、銅、亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ(Cu, Zn-SOD)の過酸化水素による失活の機構について報告する。

地球上で活動している生命体のほとんどが最終電子受容体として酸素を利用している。この酸素を一電子還元して生じるスーパーオキシドラジカル(O_2^-)に対し、多くの生物はSODを産生して過酸化水素に還元し、毒性を軽減している。しかしSODは、この産物である過酸化水素により自身が失活することが知られている。また、酸化傷害やアミノ酸の変異により、銅の遊離と共に金属結合部位の立体構造が崩壊し、時に β シートが露出することでアミロイド様繊維の形成を引き起こす。SODの量的及び分布の異常やアミノ酸の変異は、家族性筋萎縮性側索硬化症等の疾病に直接つながることから、その発見から約40年が経つにもかかわらずいまだに注目を集める酵素であり、2000年以後も毎年300報を超える論文が発表されている。しかし、これら知見の積み重ねにも関わらず過酸化水素による失活機構には不明な点があった。そこで我々は、主にX線結晶構造解析の手法を用いて解析を行った。

【方法】

失活機構の解明を分子レベルで行うには、過酸化水素処理に耐えうる良質な結晶が必要であると考え、結晶化条件の探索を行った。結晶化サンプルには、ヒトSODに比べてシステインの数が少なく、また活性中心の銅が遊離しにくいウシ赤血球由来Cu, Zn-SODを用いた。その結果、斜方晶系($P2_12_12_1$)と六方晶系($P6_522$)に属する無色結晶を得た。シンクロトロンの高輝度X線を照射することで、いずれも 1.2\AA の超える高分解能の回折像を生じた。これらの結晶を $2\sim 80\text{ mM}$ の過酸化水素を含む結晶化母液中で、30分~15時間室温でインキュベートした後、 90 K の低温下でデータ測定を行った。

【結果】

斜方晶系($P2_12_12_1$)では非対称単位中に2分子(モノマーA、Bとする)、六方晶系($P6_522$)では非対称単位中に1分子のSODが存在していた。また活性中心の銅はいずれもヒスチジン側鎖3個が配位しているCu(I)の状態であった。これらの結晶に $5\sim 20\text{ mM}$ 過酸化水素を、最大で15時間のソーキングを行い、活性中心の立体構造の変化を観察した。なお、通常のスーパースーパーオキシド不均化反応では、ヒスチジン3個が配位したCu(I)とヒスチジンが4個配位したCu(II)の状態を繰り返すことで、スーパーオキシドアニオン2分子間の電子の授受を行い、酸素分子と過酸化水素分子に不均化することが知られている。

10 mM 、30分の過酸化水素処理を行った斜方晶系の結晶構造では、銅原子の $2F_o-Fc$ 電子密度マップに突出が生じ、 F_o-Fc マップでも突出部位に正の電子密度が生じていた。反応Iにより $Cu(III)=O$ が

生成しているか、もしくは銅原子の一部が移動していることが考えられた。さらに 20 mM、3 時間の過酸化水素処理を行うと、銅原子はアニオンホールに近づき、ヒスチジン 61 番と新たに配位結合が生じていた。銅原子の座標は、既知の Cu(II) とほぼ同じ位置であったが、ヒスチジン 46 番の配位が外れヒスチジン側鎖が 3 個配位している新規な構造を取っており、反応 II により反応性の高い Cu(III) が生じていることが考えられた。特に変化の大きかったモノマー A ではヒスチジン 46 番の側鎖の回転や、金属結合部位に局所的な温度因子の上昇が見られた。なおモノマー B は隣接分子との相互作用が密であったため、過酸化水素処理に対して耐性があったと考えられた。さらに長時間のソーキングを行ったところ、銅の占有率の低下、活性中心をとりかこむループの弛緩と温度因子の上昇、His46, Arg141 側鎖に特異的な温度因子の上昇がみられ、また反応 III によって引き起こされるアミノ酸残基の修飾等の酸化傷害を確認した。また重炭酸塩 50 mM を含む結晶化母液で 20 mM、3 時間の過酸化水素処理をおこなったところ、ヒスチジン 46 番が銅に配位していたことから Cu(III) が消失し Cu(II) が出来ていることが確認できた (反応 IV)。なお 40mM を超える高濃度の過酸化水素処理を行うと結晶が融解しデータ測定が不可能になった。

六方晶系の結晶では、活性中心に緩衝液に用いたクエン酸が結合していたが、過酸化水素処理することで斜方晶系の結晶と同様な変化が見られた。シンポジウムでは、活性測定等のデータもふまえ、これらの事象の詳細を報告する。

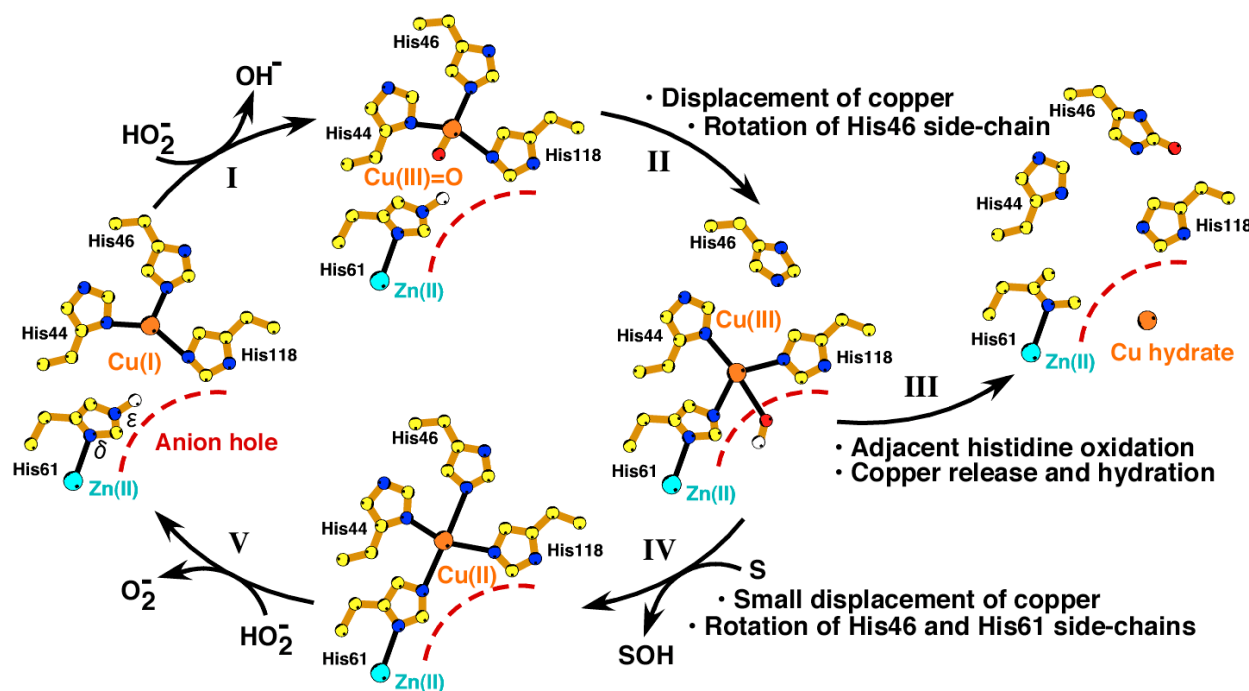


Figure 1. Proposed mechanism for the H₂O₂-induced structural changes in Cu,Zn-SOD.

The hydrogen peroxide treatment yields a Cu(III)=O species (reaction I). Next successive protonation steps (reaction II) yields a strong oxidants, Cu(II)OH/Cu(III), which can oxidize either adjacent histidine residues (reaction III) or external substrates, such as bicarbonate (reaction IV). The reaction III may result in the formation of the oxidized histidine (2-oxo-histidine), leading to the release of copper ion. The carbon, oxygen, nitrogen, and hydrogen atoms of protein are shown in yellow, red, blue, and white, respectively. The coordinate bonds are shown as black lines. The hydrogens except for His61 are omitted for clarity.