



In Laboratory Now

研究室訪問 1

調節を知り、生命を知る

久堀 徹 研究室 ~ 資源化学研究所



久堀 徹 助教授

道路を走る車を想像してほしい。道路には坂もあれば、急カーブ、障害物などもある。そんなとき、安全に走行するために必要なものは、制御しづらい馬力の高いエンジンよりも、車の走行を高精度で制御するシステムの方だろう。

生命活動にも同じようなことがいえる。生命を維持するためには、変化する環境に合わせて常に代謝過程を調節しなければならない。

久堀研究室では『生命』を維持するのに最も大切な要素は『調節』であるという観点から研究を行っている。



葉緑体内の還元物質チオレドキシソ

生物の体内ではさまざまな酵素がはたらいている。しかし、いずれの酵素も常に一定のペースではたらいているわけではない。生体内の状態や、外界の変化に合わせて、酵素のはたらくペースは調節されているのである(酵素の活性調節)。

酵素の活性・不活性はさまざまな方法で調節されている。たとえば、酵素が反応を進めていくと、反応によって生じた生成物自体が酵素のはたらくを阻害して反応が調節される仕組み(フィードバック阻害)がよく知られている。また、あるタンパク質がその標的となる酵素の活性を調節する仕組みもある。後者の活性調節を行うタンパク質の例として、葉緑体内で標的酵素の活性調節を行うチオレドキシソが挙げられる。久堀研究室では、このチオレドキシソと、それによる葉緑体内での活性調節機構を研究している。

チオレドキシソは100個位のアミノ酸で構成される小さなタンパク質で、酸化状態でS-S結合(ジスルフィド結合)を形成できる一対のシステインをもつ。システインとは側鎖にSH基をもつアミノ酸である。そして、二つのSH基が酸化されて結合したものをS-S結合というのである。一

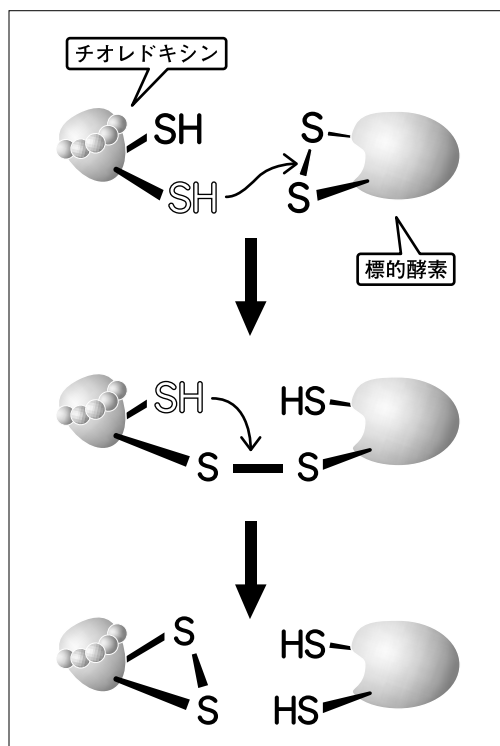


図1 チオレドキシソによる標的酵素の還元

方、チオレドキシンのように活性調節を受ける酵素分子（標的酵素）は分子内にS-S結合をもっている。

酵素の活性はその酵素がもつ独自の構造に由来している。そのため、チオレドキシンの二つのSH基が標的酵素のS-S結合を還元して、標的酵素の構造が変化するとき、活性も変化するのである。

このとき、分子レベルでは次のように反応が進行していく（図1）。まず、チオレドキシンの二つのSH基のうちの一つが標的酵素のS-S結合を攻撃して、チオレドキシシ - 標的酵素複合体を形成する。次に、チオレドキシンのもう一つのSH基

が複合体間のS-S結合を還元して、自らは酸化される。このようにしてチオレドキシシと標的酵素との間でS-S結合の交換が行われるのである。

標的酵素を還元したチオレドキシシは光合成反応の過程で得られた還元力により還元され、再び活性調節を行うタンパク質としての能力を得る。このように、チオレドキシシは光合成反応と連動して標的酵素の活性調節を行っている。つまり、チオレドキシシやそれによる葉緑体内の活性調節機構を研究することは、光合成、すなわち植物の生命維持システムを研究することにつながるのである。



チオレドキシシによる活性調節機構

光合成で、光と二酸化炭素と水を使って糖を作る複雑な反応を進めるためにはさまざまな酵素が必要である。いずれの酵素も、チオレドキシシによって活性調節されているということは以前から予想されていた。しかし、久堀先生がチオレドキシシの研究に着手した当時は、チオレドキシシの標的酵素は葉緑体ATP合成酵素など数種類しか同定されていなかった。そこで、先生はチオレドキシシの標的酵素同定のために今までにない新しい手法を考案したのである。

この方法では、まず、酸化状態でS-S結合を形成できる一対のシステインのうちの一つをセリン（側鎖にOH基をもつアミノ酸）に置換したチオレドキシシを用意する。そのチオレドキシシをあらかじめ担体に固定しておいて、そこに調べたい酵素群を通す。ここで、その酵素が葉緑体内でチオレドキシシに活性調節される可能性をもつものであるとしよう。その場合、図2のように、まずチオレドキシシのSH基が酵素のS-S結合を攻撃し、複合体を形成する。しかし、本来ならばもう一つあるはずのSH基がOH基になっているため、複合体間のS-S結合は還元されない。チオレドキシシは担体に固定してあるので、複合体を形成している酵素もそのまま担体の上に残る。あとは複合体間S-S結合を還元すれば標的酵素候補だけが溶出されてくるというわけである。

標的酵素候補が得られたら、次にこれらの酵素が実際に葉緑体内でチオレドキシシによる活性調節を受けているかどうかを生化学的に調べなければ

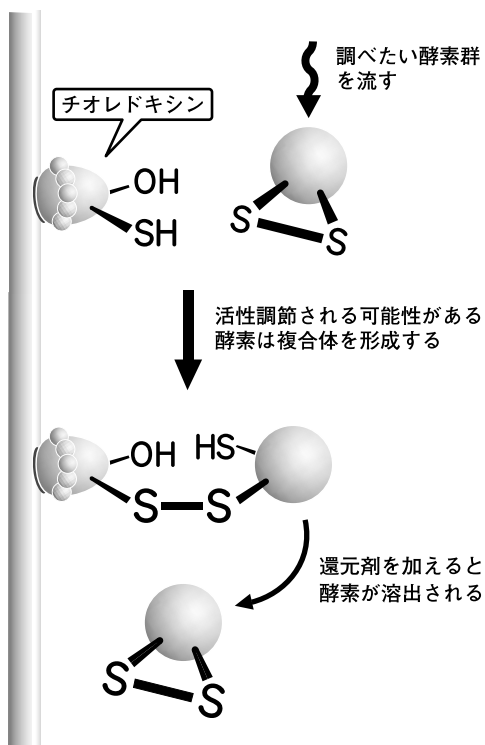


図2 S-S変換反応を利用した酵素の捕獲

ばならない。チオレドキシシはS-S結合に対して高い特異性をもっている。生体外で行う実験では標的酵素以外のS-S結合と反応する可能性があるため、最終的な確認作業を行う必要がある。生体内でも反応していることが確かめられてはじめて標的酵素として同定できるのである。

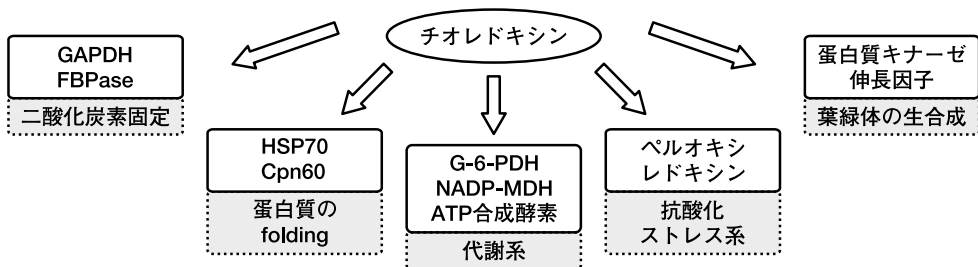


図3 チオレドキシンの還元力から標的酵素への還元力の伝達

沢山の標的酵素候補の生化学的な解析を行うことは非常に根気を要する作業である。久堀研究室は2001年にこの酵素捕獲法の研究成果を発表し、その後続く形で他の研究室が沢山の標的酵素を同じ方法で捕まえて報告している(図3)。

そして、久堀研究室では次のステップとして、葉緑体内の活性調節機構の解明のための研究を進めている。これは、図3に示した個々の酵素の性質(立体構造、触媒する生体反応など)を調べ、さらにチオレドキシンの還元力から各酵素への還元力の分配の割合を調べるといったものである。

図3においてチオレドキシンの還元力から各酵素へ向かう矢印は還元力の伝達を表し、その太さは伝達される還元力の大きさを表している。外界や体内の状態変化により、必要となる酵素の種類と量は

時々刻々変化する。つまり、矢印の太さも状態変化に合わせて常に変化しているはずである(さまざまな条件下での矢印の様子を一つの図で表すことは不可能であり、かつ、その矢印の様子が現時点で完全には把握されていないために、図3においては全ての矢印を同じ太さで表している)。各酵素の性質を調べるだけでなく、酵素がどのような条件下において、どのような活性調節を受けているかを調べなければ活性調節機構の全体像は見えてこないのである。

チオレドキシンの還元力から標的酵素への還元力の伝達は一定程度引くことができた。次はさまざまな条件下での還元力の伝達を決定したいと久堀先生はおっしゃっている。葉緑体内の活性調節機構の全貌が解明されるのも遠い未来の話ではないのかもしれない。



ATPを効率良く生産する巧みなシステム

チオレドキシンの標的酵素として当初から知られていたものの一つに葉緑体ATP合成酵素(*注1)がある。久堀先生はチオレドキシンの研究に着手する以前からこの酵素の研究を行っていた。そして、その研究のためにはチオレドキシンの研究が必要であったが、当時はチオレドキシンの研究がほとんどなされていなかった。それならば自分で調べるしかない。その結果、久堀研究室でのチオレドキシンの研究は前章までに紹介したような成果をあげるまでに至った。本章では、チオレドキシンの研究と並行して行われてきた葉

緑体ATP合成酵素の研究について紹介する。

葉緑体ATP合成酵素は他のATP合成酵素にはない特徴をもっている。一つは光合成反応から得たエネルギーをもとにATPを合成しているということ。もう一つはチオレドキシンの還元力によって活性調節を受けているということである。

葉緑体ATP合成酵素はチオレドキシンの還元力によってどのように活性を調節されているのだろうか。結論から言うと、葉緑体ATP合成酵素は光が当たると葉緑体が機能するときによくはたらくように調節されている。光エネルギーを利用する酵素なの

*注1 ATPはアデノシン三リン酸の略称で、エネルギー代謝の過程でエネルギーの受け渡しを行う。このエネルギーは能動輸送、生体物質の生合成など、生物のさまざまな生命活動に利用されている。ATP合成酵素については、LANDFALL48号の吉田研究室に関する記事でも取り扱っております。また、LANDFALLのホームページのバックナンバーからも参照できます。
URL: <http://www.titech-coop.or.jp/landfall/pdf/48/48-3.pdf>

で、葉緑体ATP合成酵素は光が当たらないとき（夜など）にはATPを合成することが出来ない。しかし、酵素は可逆的で両方向の反応（ATP合成酵素の場合、ATPの生成と分解の二つの反応）を触媒することが出来る。つまり、昼間いくらATPを生産しても、夜には自分自身で分解してしまう恐れがあるのだ。チオレドキシンはこのようなエネルギーの無駄遣いをなくするために葉緑体ATP合成酵素の活性調節を行っているのである。チオレドキシンは光合成反応の過程で還元力を得ているため、光が当たっているときにだけ還元力を伝達できる。この性質により、光が当たっているときに葉緑体ATP合成酵素はチオレドキシンによって還元され、よくはたらくようになるというわけである。一方、光が当たらないときに葉緑体ATP合成酵素は酸化状態になり、不活性化される。ATP合成を効率良く、無駄なく行うためのシステムが葉緑体には備わっているのである。

では、チオレドキシンは葉緑体ATP合成酵素にどうはたらきかけているのだろうか。ATP合成酵素は非対称な形をした回転軸である一つのサブユニットと、軸受け部分を形成する各三つずつのサブユニットで構成されている。葉緑体ATP合成酵素のサブユニットには他のATP合成酵素のサブユニットにはない特徴がある。葉緑体ATP合成酵素のサブユニットには酸化状態でS-S結合を形成できる一対のシステインが存在するのである（図4）。チオレドキシンはこの部位に作用し、S-S結合の酸化還元を通して葉緑体ATP合成酵素の活性調節を行っている。

葉緑体ATP合成酵素は、以前LANDFALL48号の吉田研究室の記事で紹介したATP合成酵素の仲間なので、やはり、回転してはたらく酵素である。すると、S-S結合がチオレドキシンによって

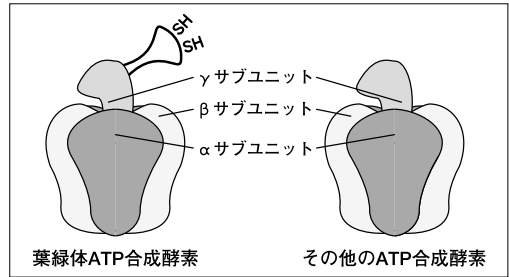


図4 酵素の構造と特徴

還元されている場合とそうでない場合とではサブユニットの回転の仕方は異なるはずだ。久堀先生は分子レベルで直接観察を行うことで回転の仕方を確認しようとした。

そこで、吉田先生が細菌のATP合成酵素に対して行ったのと同じく、まず、観察を行うために葉緑体ATP合成酵素に遺伝子操作を加え、分子全体を固定できるようにする。そして、サブユニットに目印となる『棒』を付けることで回転を観察しようというのである（サブユニットは『軸』なのでそれだけ見ても回転は確認できない）。しかし、この方法には二つの難点が存在した。一つは葉緑体ATP合成酵素に遺伝子操作を加えることが難しいということ。もう一つはこの実験は酸化・還元の両条件下で行われるため、溶液条件に影響されない回転観察用の棒が必要だということである。

久堀研究室では、問題となっている二つのシステインを含む領域を、遺伝子操作しやすい好熱菌のATP合成酵素に導入することで一つ目の難点を解決した。また、二つ目の難点は慶応大学のグループが開発した回転を観察するための微小プラスチックビーズを用いることで解決した（図5）。そして、回転観察実験を行った結果、還元状態では

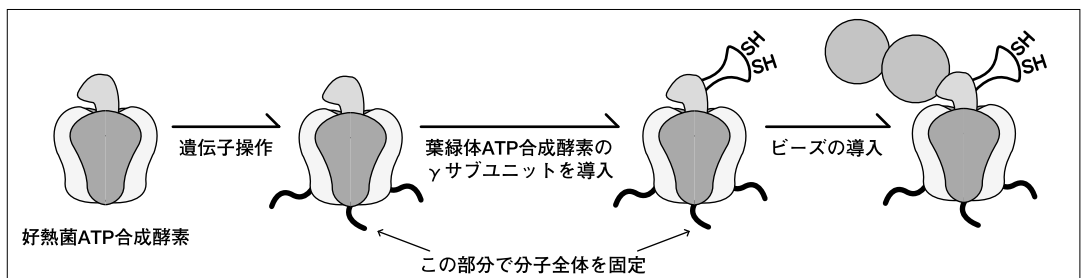


図5 回転観察用複合体ATP合成酵素の作成

時々休むもののよく回転し、酸化状態では見かけ上回転速度は変わらないものの頻繁に休むようになる様子が観察されたのである。このことは、光が当たってチオレドキシンが還元力をもつときに

は葉緑体ATP合成酵素が活性化され、逆の条件のときには不活性化されるという事実と見事に合致しているのである。



構造変化の解明と活性調節の理解

葉緑体ATP合成酵素がチオレドキシンによって活性調節を受ける様子は確認された。では、実際に葉緑体ATP合成酵素はどのような構造変化を起こしているのだろうか。そして、その構造変化がどのように回転の仕方に影響を与えているのだろうか。久堀先生はサブユニット上の二つのシステイン周辺の構造変化に注目している。

葉緑体ATP合成酵素の分子全体の活性を変化させるスイッチ部分はサブユニット上に存在し、二つのシステインを含む35個のアミノ酸から成っている。この部分の二次構造(*注2)は、長いループと短いヘリックス(螺旋状構造)で構成されていることが配列から予測されている。スイッチ部分のこの長いループは、サブユニットに到達するのに十分な長さをもっている。これらのことを踏まえた上で、久堀先生は酸化状態でスイッチ部分にS-S結合ができると、その部分の立体構造が変化して、サブユニットのいずれかに接触し、回転を妨げるような相互作用をするのではないかと予測している(図6)。

また、久堀研究室では、そのスイッチ部分の構造に変異を導入した際に興味深い現象が観察されている。あるとき、回転の調節とは異なるテーマでスイッチ部分の負電荷アミノ酸三つを削除するという実験を行った。そして酵素を分子レベルで観察したところ、還元条件下でよく回転を休み、酸化条件下でよく回転をするようになる様子が観察されたという。酸化還元による酵素の活性調節の正逆が逆転する変異を発見したというのであ

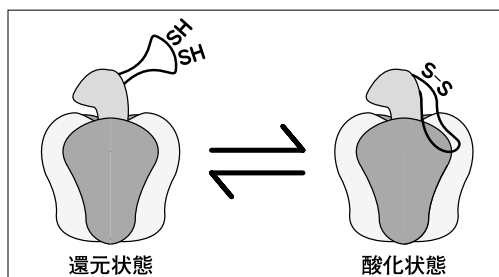


図6 構造変化の予測

る。スイッチ部分の立体構造がまだ分かっていない現段階では本当は何が起、スイッチ部分の分子機構を考える上で面白い発見だろうという。

現在、久堀研究室はドイツの研究室と共同で葉緑体ATP合成酵素のスイッチ部分の構造解析を行っている。構造解析が進むことで、制御に関わる立体構造がどのようなものなのかということを引きちんと追求した実験ができるようになるだろうと久堀先生はおっしゃっている。そして、そのような実験を重ねていくことで葉緑体ATP合成酵素の活性調節機構の全貌が明らかになっていくことだろう。活性調節機構が分子レベルで明らかになれば、他の酵素に葉緑体ATP合成酵素がもつようなスイッチ部分を付け、活性を自由に制御できるようになるかもしれない。先生はこのような応用研究も将来の目標に掲げているという。久堀研究室での葉緑体ATP合成酵素に関する研究は、今まさに佳境を迎えようとしているのである。

『生命』を維持するために最も大切な要素は『調節』であるという観点から研究を行う。

久堀先生のこの研究スタイルは、生命というものの本質を的確に見抜いた上で確立されてきたものなのだと、二度の取材で先生からお話しを聞か

せていただいた時に感じました。

最後になりましたが、多忙中取材に快く応じて下さった久堀先生にこの場を借りてお礼を申し上げます。

(岸 寛)

*注2 ポリペプチド(多数のアミノ酸がペプチド結合したもの)主鎖の部分的立体構造。