



シトクロム酸化酵素の反応機構解明

島田 敦広, 立木 啓悟
岐阜大学

キーワード：シトクロム酸化酵素, 膜タンパク質複合体, 高分解能結晶構造

1. 背景と研究目的

電子伝達系の末端酵素であるシトクロム *c* 酸化酵素(CcO)はプロトンポンプと共役して酸素分子を水へと還元する。これにより生じる細胞膜を介したプロトン濃度勾配及び電位差を利用して、ATP 合成酵素によって生体内の大部分の ATP が合成されている。したがって、CcO の反応機構解明は生体エネルギー論における最重要課題であり続けている。CcO はその活性のために 4 つの金属中心 (Cu_A、heme *a*、heme *a*₃、Cu_B) を持ち、heme *a*₃ と Cu_B によって酸素還元中心が構成されている。CcO の反応サイクルは CcO への酸素結合によって開始されるが、酸素はこの heme *a*₃ と Cu_B が還元状態である還元型 CcO へのみ結合することが可能である。さらに、結合した酸素は直ちに酸素還元中心を構成するこれら金属中心と近傍のチロシンによって 4 電子還元される¹⁾。CcO の反応サイクルを理解するためには、完全還元型への酸素結合とそれに続く酸素還元反応過程での金属中心の電子状態変化をとらえる必要がある。しかし、反応サイクルの初期構造である酸素結合還元型 CcO は非常に短寿命であり、その構造をとらえるのは困難である。そこで、本研究では、酸素の基質アナログである一酸化炭素 (CO) を用いて安定な CO 結合還元型 CcO を調製し、その立体構造と金属中心の電子状態を解明することで、酸素結合還元型 CcO の反応サイクル中での機能を解明することを試みた。

2. 実験内容

CcO 結晶をウシ心筋から精製し、結晶化した。得られた結晶を、CO 飽和還元剤へ浸潤して CO 結合還元型 CcO 結晶を調製したのちに液体窒素で凍結した。凍結した結晶に対してクライオ条件下で波長 1.12 Å の X 線を照射して回折データの収集を行った。

3. 結果および考察

測定の結果、2.5 Å 程度の分解能で電子密度マップを計算することができた (図)。電子密度マップから酸素還元中心を構成する heme *a*₃ と Cu_B の間にリガンドに由来する電子密度がはっきりと確認された。一方で、酸素還元中心以外の CcO 構造に注目すると、金属中心の酸化還元によって構造が変化する部分 (helix X や D51 周辺など) については、電子密度が不明瞭であった。そこで、温度因子や残余電子密度に注目して精密な計算を行ったところ、これらタンパク質構造については多型構造を取っており、30 から 40%程度酸化型構造が含まれていることが明らかとなった。したがって、CO 結合還元型 CcO 結晶の調製に用いた還元剤濃度が低かった、もしくは反応時間が短かった可能性がある。今後は還元剤濃度や反応時間を検討し、より詳細な CO 結合還元型 CcO 結晶構造の解明を目指す。

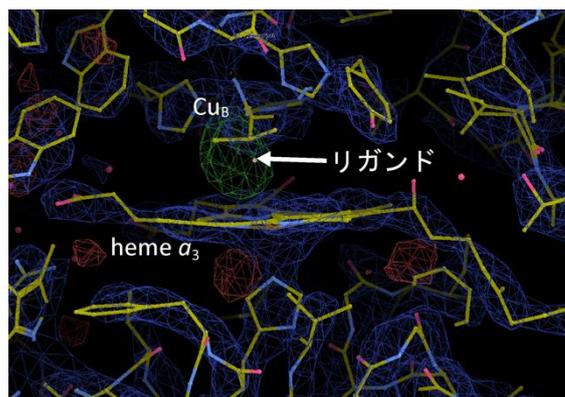


図. 酸素還元中心の構造と電子密度マップ。
緑メッシュ：Fo-Fc マップ (+)
赤メッシュ：Fo-Fc マップ (-)
青メッシュ：Density modification マップ

4. 参考文献

1. Shinya Yoshikawa and Atsuhiko Shimada. (2015) *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989