



シトクロム酸化酵素の反応機構解明

立木 啓悟， 渡辺隆寛， 島田 敦広
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、2.5～3.0 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。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、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) についても、構造多型が確認された。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うことで、調製した CO 結合型 CcO 結晶に含まれる休止酸化型、還元型、CO 結合還元型の割合を求めた (表 1)。その結果、還元剤であるジチオナイト濃度は 2.5 mM 以上にしても還元度にあまり影響がないことが分かった。さらに、CO バブリング時間についても 30 分と 60 分で、CO の結合率に影響は確認されなかった。また、同じ調製条件でも結晶の質によって各構造の占有率が影響を受けることも明らかとなった。今後は CO 結合還元型の占有率を可能な限り高くしたいので、結晶の調製環境の条件検討を行う予定である。具体的には、CcO に結合した CO が光解離しないよう、暗室での結晶調製作業を行う。

ジチオナイト濃度 (mM)	CO バブリング時間 (min)	分解能 (Å)	占有率 (%)		
			休止酸化型	還元型	CO 結合還元型
2.5	30	2.48	20	35	45
2.5	60	1.98	23	38	39
5.0	30	1.98	20	45	35
5.0	30	3.0	36	21	43
5.0	60	3.0	29	21	50

4. 参考文献

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