



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酸化酵素 (CcO) は酸素分子を水へと還元する反応と共役してプロトンを膜間能動輸送することで、Fo-F1 ATP 合成酵素による ATP 合成に利用されるプロトン濃度勾配及び膜電位を生み出している。近年では、CcO の活性を制御することで細胞エネルギー生産全体の制御が可能であることが示唆されており、CcO の反応機構機構解明は様々な疾患の予防や治療につながることを期待されている。そこで、本研究では、CcO と様々なリガンドとの複合体構造を決定することで、CcO の反応機構の理解に資する情報を得ることを目的とした。CcO はその活性に必須な 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¹⁾。CcO の酸素還元中心の構造変化と、これら 4 つの金属中心の電子状態変化に誘起されるタンパク質の立体構造変化によって、酸素の還元反応と共役したプロトンの不可逆的な輸送が行われていると考えられている。そのため、酸素アナログである一酸化炭素 (CO) をプローブに用いて CO 結合還元型 CcO の構造を決定し、還元型 CcO と休止酸化型 CcO との構造比較を行うことで、酸素還元中心の構造変化および金属中心の電子状態変化とプロトン輸送経路の構造変化の関係を明らかにする。

2. 実験内容

CcO 結晶をウシ心筋から精製し、結晶化した。CO 飽和還元剤溶液は、2.5 mM ジチオナイトを含む還元剤溶液へ CO ガスを 30 分バブリングすることで調製した。得られた結晶を、CO 飽和還元剤へ 15 分もしくは 30 分浸潤して 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、2.3 Å 分解能でのデータ収集に成功した。CO 飽和還元剤へ 30 分浸潤した結晶のデータは質が悪く、データの処理に時間がかかっておりまだ電子密度マップの計算に至っていない。一方で、CO 飽和還元剤へ 15 分浸潤した結晶については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、金属中心の酸化還元によって構造が変化する D51 周辺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、D51 周辺の占有率を決定した。その結果、D51 周辺の構造は酸化型構造 (oxi) が 78% で還元型構造 (red) が 22% であることが分かった。一方で、helix X の構造は酸化型構造 (oxi) が 87% で還元型構造 (red) が 13% であった。CO 結合還元型の構造は、D51 周辺は還元型構造であり、helix X の構造は酸化型構造であるため、今回調製した CO 結合還元型 CcO 結晶に含まれる各状態の占有率は、酸化型 (78%)、還元型 (13%)、CO 結合還元型 (9%) であると考えられた。CO 結合還元型 CcO の占有率が 10% にも満たないほど低く、議論が難しいため、今後はより CO 結合還元型 CcO の占有率が高い結晶の得られる調製条件の検討を行う予定である。これまでの経験から、CcO 結晶自体の質も分解能だけでなく CO 結合率に影響があるように思われる。そのため、より高品質な CcO 結晶が得られるような精製方法の検討も行っていく。

4. 参考文献

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