

Title	Molecular Characterization and Reaction Mechanism of Bovine Heart Cytochrome bc <sub>1</sub> Complex
Author(s)	久保田, 智巳
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3065772">https://doi.org/10.11501/3065772</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	久保田 智 巳
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 10601 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	<b>Molecular Characterization and Reaction Mechanism of Bovine Heart Cytochrome <math>bc_1</math> Complex</b> (ウシ心筋チトクロム $bc_1$ 複合体の諸性質と反応機構)
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 福井 俊郎 助教授 福山 恵一

#### 論文内容の要旨

チトクロム  $bc_1$  複合体の電子伝達とそれに共役したプロトンポンプの機構を解明するため以下のような解析をおこなった。

(1) 反応速度的解析。酵素の反応機構を解明するためには精密な反応速度的解析は必須であり、その第一歩として初期定常状態の解析を行なった。その結果、この酵素はピンポン機構で機能することが明らかになった。この結果と今までに提出されているこの酵素の反応機構に対する種々の作業仮説とを比較検討したところ、ユビキノンやチトクロム  $c$  の結合や解離が酵素分子内の電子の分布状態によって厳密に調節されていることが強く示唆された。

(2) 結晶化。この酵素の反応機構を解明するためには立体構造の情報は不可欠であり、この酵素の結晶化を試みた。酵素の精製法、酵素を可溶化させる界面活性剤の種類、結晶化条件等を検討した結果、非イオン性界面活性剤の存在下で沈殿剤 PEG を用いてこの酵素を結晶化することに成功した。さらに、結晶化条件の検討を行ない、緩衝液の種類により結晶系の異なる 2 種類の結晶(単斜晶系と六方晶系)を得ることができた。分解能は単斜晶系で  $7.5 \text{ \AA}$ 、六方晶系のもので  $6.5 \text{ \AA}$  であった。六方晶系の結晶の成長は精製のバッチにより異なっており、このような差をなくするため一度結晶化した標品を用いて再結晶化を行なうことを試みた。こうして得られた結晶は明らかに形や透明度がよく、結晶化の再現性も向上した。現在、六方晶系の結晶を用いて X 線構造解析をおこなっている。この結晶の持つ分解能での解析結果から酵素分子の概形のみならずおおよその鉄原子の位置や基質結合部位、サブユニットの配置などの情報が得られることが期待できる。

(3) 結晶標品の性質。この結晶標品は、(i) 電子伝達及びプロトンポンプ活性を持ち、(ii) 典型的なチトクロム  $bc_1$  複合体の吸収スペクトル及び Rieske 型鉄イオウ中心の EPR スペクトルを示した。(iii) SDS-PAGE の結果からこの標品は 11 のサブユニット全てを含んでいた。これらの結果からこの結晶がチトクロム  $bc_1$  複合体の結晶であると結論した。また、この結晶化前後の標品の組成を比較したところ、結晶化によりこの酵素をさらに精製できることが示された。さらに分光学的手法を用いて詳細な酸化還元中心の性質を調べた。まず、この酵素のヘムの含量と吸収スペクトルをもとにこの酵素内の 2 種類のヘムの分子吸光係数を高い精度 ( $2\sigma < 5\%$ ) で決定することができた。また、高度の嫌気条件下での酸化還元滴定や EPR の測定の結果から、この酵素が非対称な二量体構造をとっていることが強く示唆された。これらの結果から、結晶標品は高純度の標品であり、且つ、生体内での性質をよく保っているという典型的なこの酵素の標品であると言える。

## 論文審査の結果の要旨

久保田君はミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅲ（チトクロム  $bc_1$  複合体）の反応機構をその立体構造と関連させるべく2つの研究を推進した。1つはこの酵素の精密な定常状態の反応速度論的解析でその結果反応中にユビキノールが1回とチトクロム  $c$  が2回結合するピンポン機構で機能すること、ユビキノール10が従来考えられていたような必須でないこと、などを見出し、ユビキノンやチトクロム  $c$  の結合解離が分子内電子の分布状態で厳密に調節されていることを示唆した。今1つはこの酵素を各種条件の検討の末、世界で初めて結晶化させ、その中で六方晶系のものは6.5 Å までのX線回折点を示した。このものは11ケのサブユニットを含み、結晶化により、より純品の複合体となることが示された。活性、スペクトルの性質、各種成分含量など従来のもより以上によりよい性質を示した。これにより今後の研究の発展に大きく寄与したと思われ、この論文が博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。