



Title	Structural studies on the oxygen reduction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase
Author(s)	太田, 和宏
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58002">https://hdl.handle.net/11094/58002</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a>&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【52】

氏 名 おお た かず ひろ

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 2 3 5 8 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 22 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当  
理学研究科生物科学専攻

学 位 論 文 名 Structural studies on the oxygen reduction mechanism of bovine heart  
cytochrome c oxidase

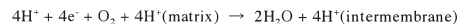
(ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元機構の構造研究)

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 中 川 敦 史

(副査)  
教 授 福 山 恵 一 教 授 長 谷 俊 治 名誉教授 月 原 富 武

## 論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリア呼吸鎖を構成する蛋白質の一つであるチトクロム酸化酵素は、次の反応を触媒する。



チトクロム c 由来の 4 つの電子とマトリックス由来の 4 つのプロトンを用い、呼吸で取り込んだ分子状酸素を水に還元する。さらに、この酸素還元に関役して、4 つのプロトンの能動輸送を行う。図 1 に示す本酵素の酸素還元サイクルに於いて、A 型中間体から P 型中間体への、酸素の O=O 結合を切断する反応は、一段階の反応で進行すると考えられている。本研究では、酸素のアナログ分子 (CO、NO、CN) を本酵素の酸素還元部位のプロープとして用い、これらの分子の結合構造に基づいて O=O 結合切断の仕組みを考察した。

各種リガンド結合結晶をソーキング法によって調製し、SPring-8 阪大蛋白研ビームライン 44XU にて X 線回折実験を行った。構造解析の結果得られた酸素還元部位の構造を図 2 に示す。

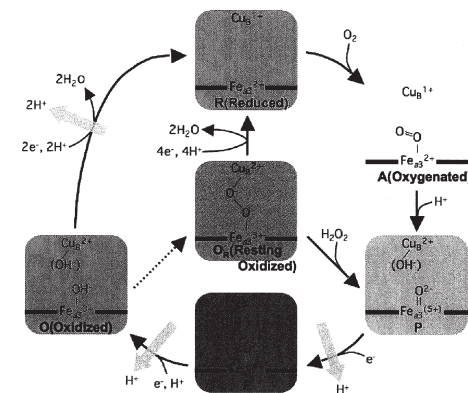


図 1. チトクロム酸化酵素の酸素還元サイクル。  
太い矢印はプロトン能動輸送を表す。

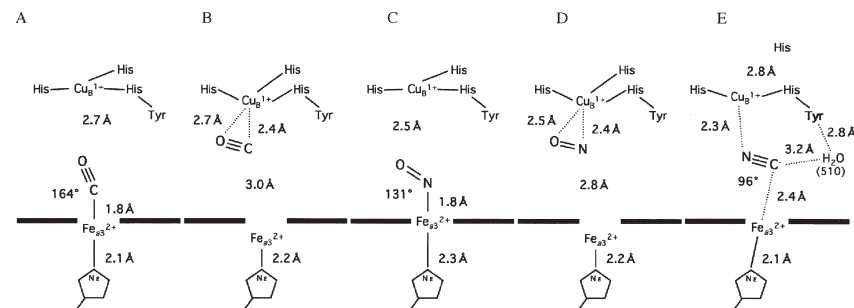
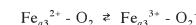


図 2.CO 結合還元型 (A: 280 K、B: 100 K)、NO 結合還元型 (C: 100 K、D: 50 K)、E: CN<sup>-</sup>結合還元型 (100 K)

CO ならびに NO の Cu<sub>B</sub> へのサイドオン結合構造 (図 2B、2D) は、本酵素の酸素供給経路を通じてやって来た酸素分子が Cu<sub>B</sub> に一時的に結合する際の構造に相当すると考えられる。NO の Fe<sub>a3</sub> へのベント-エンドオン結合構造は、NO と O<sub>2</sub> の電子的類似性から、酸素分子が Cu<sub>B</sub> から Fe<sub>a3</sub> へ移ることで形成されると考えられる。CN<sup>-</sup>結合還元型構造では、CN<sup>-</sup>の Cu<sub>B</sub> への結合に伴い、Cu<sub>B</sub> の配位子の一つである His が Cu<sub>B</sub> から解離していた。また、活性中心へム a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> サイトに水が一つ現れ、CN<sup>-</sup>と Tyr244 の両方に水素結合していた。この水の出現は、CN<sup>-</sup>の結合によりム a<sub>3</sub> がシフトする構造変化に起因すると考えられる。このシフトは、まわりのヘリックス VIII、IX のシフトを伴っていた。

得られた酸素アナログ分子の構造に基づいて、図 3 に示す本酵素の酸素還元機構を提案する。ヘモグロビンやミオグロビンでの報告から、Fe<sub>a3</sub> に結合した酸素は、



という共鳴構造をとると考えられる。O<sub>2</sub> は CN<sup>-</sup>と同様の構造変化を引き起こし、図 3 の灰色の構造をとることが推測される。このような遷移構造が形成されるならば O<sub>2</sub> は、Cu<sub>B</sub>、Fe<sub>a3</sub>、Tyr244 からそれぞれ 1 つずつ、合計 3 つの電子を一度に受け取ることが可能となる。この時点で、酸素には 4 つの電子が与えられたことになり、O=O 結合は切れ、P 型ができて上がる。酸素に電子を一つずつ与えたのでは、反応中に活性酸素種が生じる可能性がある。そこで本酵素は、前述の機構により、O=O 結合の切断を一段階で、すなわち、4 電子を一気に与えることで活性酸素種の生成を伴わない酸素の完全還元を実現していると考えられる。

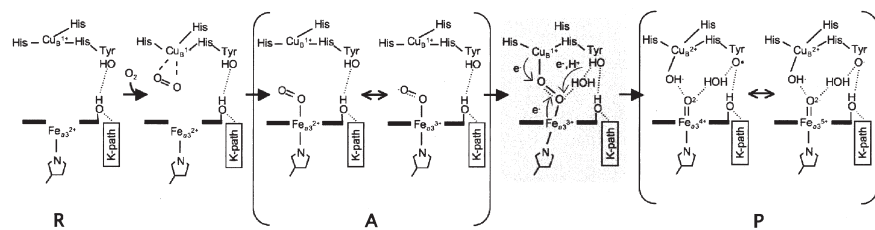


図 3. 提案したウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元機構。

## 論文審査の結果の要旨

真核生物は、ミトコンドリア呼吸鎖が生み出すエネルギーで活動している。呼吸鎖には複数の膜蛋白質複合体が関与しているが、その中でチトクロム *c* 酸化酵素（複合体 IV）は、チトクロム *c* から伝達されてきた 4 つの電子と、マトリックス側から取り込んだ 4 つのプロトンを用いて、分子状酸素を水に還元し、さらに、この酸素還元に関与して、4 つのプロトンの能動輸送を行う。この結果として得られるプロトンの濃度勾配を利用して、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素により ATP が合成され、エネルギーを獲得する。

本研究では、チトクロム酸化酵素による酸素還元機構を、構造生物学的に明らかにすることを目的とした。申請者は、チトクロム *c* 酸化酵素の結晶に、酸素アナログ分子 ( $CO$ ,  $NO$ ,  $CN^-$ ) をソーキングして作製した基質アナログ結合結晶を用い、中間体構造を決定した。

詳細な構造解析の結果とこれまでの分光学を用いた実験データと合わせ、チトクロム *c* 酸化酵素において、4 電子を一気に与えることで活性酸素種の生成を伴わない酸素の完全還元を実現していることを構造面から明らかにした。

この成果は、呼吸鎖で働く最も重要な膜蛋白質複合体の 1 つであるチトクロム *c* 酸化酵素の完全な反応メカニズムを解明する上での鍵となる、重要な知見といえる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。