

新博士紹介

1. 氏名 青山 浩 (理化学研究所 光合成科学研究室)
2. 論文提出大学 大阪大学大学院理学研究科
3. 学位の種類 博士 (理学)
4. 取得年月 1996年3月
5. 題目 Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution

6. アブストラクト

チトクロム酸化酵素は、ミトコンドリアの内膜で細胞呼吸の末端酸化酵素として機能し、チトクロム *c* を酸化し分子状酸素を水に還元するとともに、電子伝達にともなって水素イオンを内膜の内側から外側へと能動輸送する酵素である。この酵素の反応機構の理解を深めるためにもっとも必要なことは詳細な立体構造の解明である。そこでこの酵素の X 線結晶構造解析を行った。

結晶化に最も重要な要因は単離した酵素分子を水溶液中に安定化するための界面活性剤の構造であり、デシルマルトシドで安定化すると 2.6 Å 分解能以上の X 線回折能を示す結晶が得られた。この結晶は斜方晶系で空間群 $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a=189.1$ Å, $b=210.5$ Å, $c=178.6$ Å であった。高エネルギー物理学研究所の放射光を X 線源として、巨大分子用ワイセンベルグカメラを使用して回折強度測定を行った。重原子同型置換法によって電子密度分布を求めたところ、極めて精度の高い 2.8 Å 分解能での電子密度が得られた。

酸素還元部位と考えられるヘム a_3 -Cu_B 部位とヘム *a* とは細胞質側の膜表面レベルから約 13 Å 下の面に水平に並んでいる。また Cu_A は複核で細胞質側を上方にとればヘム a_3 とヘム *a* の上方それぞれ 22 Å, 19 Å の位置に存在していた。上記の 3 つの金属中心はほぼ直角三角形の頂点に位置し、Cu_A とヘム a_3 の鉄原子が構成する斜辺上にマグネシウム部位が存在する。またヘム a_3

の鉄原子と Cu_B との距離は 4.5 Å で Cu_B には 3 つのヒスチジンイミダゾールが配位していた。ヘム a_3 鉄原子と Cu_B との間には強い磁氣的相互作用があるにも関わらず、両者を橋渡しするアミノ酸側鎖もイオウ原子も認められなかった。しかし水のような小さな分子の存在は否定できない。ヘム *a* は 2 つのヒスチジンイミダゾールが配位した典型的な低スピン型構造であった。Cu_A 部位では 2 個の銅原子を 2 個のシステインの S 原子が架橋して四辺形を作り、各銅原子に対して、それぞれもう 2 個の原子が配位して、2 つのシステイン S 原子とともに四面体を作るように配位していた。この Cu_A への配位子のうちグルタミン酸は側鎖ではなく主鎖のカルボニル基が配位していた。このグルタミン酸の側鎖部分はマグネシウムのひとつの配位子となっていた。マグネシウムは他にヒスチジン、アスパラギン酸、H₂O の 3 配位子を含めて四面体型配位構造をとっていた。亜鉛は上述の酸化還元活性金属部位から遠く離れてマトリックス側にあるサブユニットに結合していた。4 個のシステイン残基による、ほぼ正四面体型の配位でアミノ酸配列だけから考えると亜鉛フィンガー構造が予測されるがそのようなフィンガー構造は認められなかった。また Cu_A に配位しているヒスチジンからアルギニンを介してヘム *a* のプロビオン酸まで水素結合の存在があきらかとなり、Cu_A からヘム *a* への電子伝達に関与していると考えられる。

この酵素は 2 量体を形成しており、構造解析を行った実質的な分子量は 40 万であったが、通常の重原子同型置換法によって構造決定できた。これは高分解能の回折像を与える結晶が得られたことと、精度を上げた回折強度測定が行えたことによるものである。特にこの酵素のように巨大な膜タンパク質複合体結晶の回折強度測定には放射光の利用は不可欠であった。

(受付番号 96024)