

## ウシ心筋ミトコンドリア由来シトクロムbc<sub>1</sub>複合体のX線結晶構造解析

岩田 茂美、岩田 想

ウブサラ大学生物化学科

はじめに

呼吸鎖は生体エネルギーを産生し、生命活動を支える重要な機構の一つである。呼吸鎖の電子伝達系の一連の酵素は、真核生物ではミトコンドリア内膜、細菌では細胞質膜上の蛋白複合体として存在する。図1にミトコンドリアの呼吸鎖の概要を示した。

これらの複合体は各々の酸化還元電位に応じた一定の順序で電子の受け渡しを行い、それに共役して膜の内側から外側へ、膜電位に逆らって水素イオンを輸送する。これによって生じる膜を隔てた水素イオンの濃度勾配を使ってF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素はATP合成を行う。

呼吸鎖の生化学研究は今世紀初頭から精力的に行なわれているが、構造学的研究は1994年以来大きな進歩を遂げた。1994年のウシ心筋ミトコンドリア由来F<sub>1</sub>-ATP合成酵素(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の膜外ドメイン。Walkerはこの業績により1997年のノーベル化学賞を受賞した。)のX線結晶構造<sup>(1)</sup>、1995-96年のシトクロム酸化酵素(パラコッカス<sup>(2)</sup>およびウシ心筋ミトコンドリア<sup>(3)</sup>由来)、1997-98年のbc<sub>1</sub>複合体(ウシ<sup>(4,5)</sup>およびニワトリ<sup>(6)</sup>心筋ミトコンドリア由来)、そして1999年のフマル酸還元酵素(大腸菌由来<sup>(7)</sup>、この酵素はコハク酸脱水素酵素の逆反応を行う酵素で、嫌気性条件下で誘導される。コハク酸脱水素酵素と類縁の蛋白質で、呼吸鎖の構成員と考えられる)と相次いでX線結晶構造が発表された。

本稿では、これらの複合体のうち、特にシトクロムbc<sub>1</sub>複合体(複合体、シトクロム還元酵素)について説明したい。シトクロムbc<sub>1</sub>複合体では複合体、によって生成される還元型ユビキノンからシトクロムcへの電子伝達と水素イオンの輸送が供役して行なわれる。シトクロムbc<sub>1</sub>複合体もシトクロム酸化酵素(複合体)も電子の伝達に共役して水素イオンを膜を隔てて輸送する酵素であるが、それぞれ「キノンサイクル」および「水素イオンポンプ」と呼ばれるまったく異なった輸送機構を持っている。本稿ではシトクロムbc<sub>1</sub>複合体のキノンサイクルについて、構造的な側面から説明を行いたい。

### 1. シトクロムbc<sub>1</sub>複合体とキノンサイクル

シトクロムbc<sub>1</sub>複合体(以下bc<sub>1</sub>複合体)は還元型ユビキノンからシトクロムcに電子を渡す反応と供役して膜の内側から外側へ水素イオンを輸送する<sup>(8,11)</sup>。このbc<sub>1</sub>複合体は多数のサブユニットからなる複合体であり、筆者らが構造解析を行ったウシ心筋ミトコンドリア由来bc<sub>1</sub>複合体は、異なる11種のサブユニットからなる単量体が2量体を形成している。4つの酸化還元中心を持つ3つのサブユニット、シトクロムb(酸化還元中心は

ヘム $b_H$ 、ヘム $b_L$ ）、シトクロム $c_1$ （ヘム $c_1$ ）、リスケ鉄 硫黄蛋白質（リスケ鉄 硫黄クラスター）が電子伝達反応には必須であり、全ての $bc_1$ 複合体で保存されている。本稿では触れないが、「コア」と呼ばれる2つのサブユニット（サブユニット1,2）はミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ（MPP）ファミリーに属しており、 $bc_1$ 複合体は、電子伝達だけでなく、蛋白質のミトコンドリアへの輸送にも関与している多機能な蛋白質であることが知られている。

$bc_1$ 複合体の水素イオン輸送機構はP. Mitchellにより最初に提唱された「キノンサイクル」として知られている（図2）<sup>(8)</sup>。 $bc_1$ 複合体には2つのキノン結合部位があり、 $Q_p$ 結合部位はシトクロム $b$ のヘム $b_L$ 近傍にある還元型ユビキノン（ユビキノール）に特異的な酸化サイトであり、 $Q_N$ 結合部位はヘム $b_H$ 近傍にある酸化型のユビキノンに特異的な還元サイトである。

膜中のユビキノールが $Q_p$ 結合部位に結合すると、ユビキノールはここで二電子酸化され、2個の水素イオンがミトコンドリア膜間側に放出される。このとき、最初の電子はリスケ鉄 硫黄蛋白質を経てシトクロム $c_1$ へ、さらに可溶性蛋白質であるシトクロム $c$ へと伝達される。一方、2番目の電子はヘム $b_L$ からヘム $b_H$ 、さらに $Q_N$ 結合部位と膜を横切って輸送される。この $Q_N$ 結合部位では酸化型のユビキノンがヘム $b_H$ からの電子によって還元され、このときマトリックス側から水素イオンがユビキノン分子へと取り込まれる。ユビキノンは二電子還元された後 $Q_p$ 結合部位へと移動し、再酸化され水素イオンをミトコンドリア膜間側へ放出する。このようなサイクルによりユビキノン自身が担体となって水素イオンを輸送する。

「キノンサイクル」と実際の蛋白質構造との対応関係はこれまで明らかではなかったが、今回の構造解析の結果との比較からその大筋は正しいことが証明された。

## 2. $bc_1$ 複合体の構造解析

我々は2つの異なる六方晶系に属する結晶を用いて構造解析を行った。2種類の結晶はそれぞれ空間群 $P6_522$  ( $a=b=211.2$   $c=339.3$  ) および $P6_5$  ( $a=b=130.1$   $c=720.9$  ) に属し、共にウシ心筋ミトコンドリア由来の $bc_1$ 複合体から得られた<sup>9,10)</sup>。 $P6_522$ 結晶は $3.0$   $\text{\AA}$ 、 $P6_5$ 結晶は $2.8$   $\text{\AA}$  までの分解能の反射を測定した。この2つの結晶からのデータを元に、重原子同型置換法と分子置換法を用いて位相を決定した。また $P6_522$ 結晶に関しては、2種類の阻害剤ミクソチアゾールとアンチマイシンAとの複合体についても構造解析を行った。構造解析は他の2つのグループとは独立に行なわれており、構造解析に他の構造の情報は利用されていない。その時点で、われわれの構造は、 $bc_1$ 複合体の構造としては初めて結晶学的に精密化されたものであり、アミノ酸残基の側鎖の位置を十分な精度で決定できるだけの明瞭な電子密度図を得ることができた。（R因子： $P6_522$ 結晶は28.5%、 $P6_5$ 結晶は32.5%）。現在 $P6_5$ 結晶の $2.5$   $\text{\AA}$ 解能での構造精密化を進めている。

### 3.全体構造およびキノン結合部位

図3aにbc<sub>1</sub>複合体の全体図を示した。各単量体が2回回転で関係付られた二量体を形成している。シトクロムbはbc<sub>1</sub>複合体の中心部に位置しており、そのミトコンドリア膜間側にヘムb<sub>L</sub>がマトリックス側にヘムb<sub>H</sub>が存在している。このサブユニットはほぼ完全に脂質二重膜中に埋もれており、そのミトコンドリア膜間側にリスケ鉄 硫黄蛋白質とシトクロムc<sub>1</sub>の膜外ドメインが存在している。

図3 bは複合体の膜貫通部分を膜に垂直な方向から示している。この図にはキノン類似体でありbc<sub>1</sub>複合体の阻害剤であるアンチマイシンとミクソチアゾールの構造も同時に示した。これらの阻害剤は、結晶中で別々の位置に結合し、実際に2つの異なるキノン結合部位が存在することを示している。アンチマイシンはマトリックス側にあるヘムb<sub>H</sub>の近傍のコビキノ還元サイト、Q<sub>N</sub>結合部位であると考えられる。ミクソチアゾールはミトコンドリア膜間側にあるヘムb<sub>H</sub>近傍のコビキノール酸化サイト、Q<sub>p</sub>結合部位であると考えられる。図からもわかるようにbc<sub>1</sub>複合体の二量体間には大きな疎水性の空間があり、一方の単量体のQ<sub>p</sub>結合部位と他方の単量体のQ<sub>N</sub>結合部位は同じ疎水性の空間に面している。この空間は膜中ではディスオーダーした脂質で充填されていてコビキノンはかなり自由に移動できると考えられる。シトクロムbの分子中にはキノンが通過できるような空間はなく、Q<sub>N</sub>及びQ<sub>p</sub>結合部位間でのコビキノンの移動は異なる単量体間の疎水空間を通じて行なわれると考えられる。

### 4.金属中心の位置とリスケ鉄-イオウ蛋白質の運動

bc<sub>1</sub>複合体の結晶構造の構造において、リスケ鉄-イオウ蛋白質(以下ISP)が、結晶系によって3種類の異なる位置に現われたことは、非常な驚きであり、ISPのコンフォメーション変化がキノンサイクルの機構で重要な役割を果たしていることがわかった。ISPはヘムb<sub>L</sub>から受け取った電子をシトクロムc<sub>1</sub>へ渡す重要な役割を担っている。ISPの[2Fe-2S]鉄硫黄クラスターの配位子は2つのシステインと2つのヒスチジンで、フェレドキシンに見られる4つのシステインに配位された[2Fe-2S]クラスターとは異なる。ISPはこの特徴的な配位により酸化還元電位が+300mVと高く、非常に還元されやすい。ISPの膜外ドメインは、柔軟なリンカー部分によって膜貫通ヘリックスとつながっている。このISPの膜外ドメインの高分解能の結晶構造がすでに岩田らにより報告されている<sup>(12)</sup>。このISP膜外ドメインは126残基の小さい蛋白質だが2つのサブドメインを持っている。1つは鉄硫黄クラスターを有しているクラスター結合フォールドであり、もう1つはそれ以外のベースフォールドである。

我々の解いた2種類の六方晶系<sup>(5)</sup>とYuらによる、正方晶系(14<sub>1</sub>22)<sup>(4)</sup>の3種類のウシ心筋bc<sub>1</sub>複合体における金属中心はヘムb<sub>L</sub>,b<sub>H</sub>及びc<sub>1</sub>の位置に関してはほぼ同じであるが、リスケ鉄-イオウ中心の位置だけが大きく異なっていた。リスケ鉄-イオウ中心がどのサブユニットに近いかによって、この3つの位置はそれぞれ、"c<sub>1</sub>"、"Intermediate"及び"b"ポジションと呼ばれる。ニワトリ心筋bc<sub>1</sub>複合体においても阻害剤スティグマテルインの有無でリスケ鉄-イオウ中心の位置が異なることが観測されている<sup>(6)</sup>。

シトクロムbとシトクロム $c_1$ に対するISP膜外ドメインの相対的な構造変化を図4に示した。"c<sub>1</sub>"ポジションではISPの鉄 硫黄中心はその配位子のひとつであるHis161がヘム $c_1$ のプロピオン酸基と水素結合を作っている。この位置はISPからシトクロム $c_1$ への速い電子伝達に有利であると考えられる。"b"ポジションではISPはシトクロムbに近寄っており、ISPの鉄 硫黄中心はQ<sub>p</sub>結合部位の直上に位置する。実際ニワトリbc<sub>1</sub>複合体のQP結合部位阻害剤スティグマテリンとの複合体結晶においては"b"ポジションにあるISPのHis161は直接スティグマテリンと水素結合している<sup>(6)</sup>。つまりこの位置はQ<sub>p</sub>結合部位に存在するユビキノールからISPへの速い電子伝達に有利であると考えられる。ISPとユビキノールとの水素結合は、Q<sub>p</sub>結合部位からシトクロムbの表面に通じる疎水性のチャンネルを通じて形成されている。"Int"ポジションではISPは"c<sub>1</sub>"及び"b"ポジションの間にあり、鉄 硫黄中心は他のサブユニットとの間に水素結合を形成していない。ISPはシトクロムbのループefの上に腰掛けたような形になっている。

これら3つの位置間でのISPの構造変化は、(i) 膜外ドメイン全体の回転、(ii) 膜外ドメインの内部での構造変化の2つを含んでいる。このうち見た目にも顕著なのが、活性ドメイン全体の回転である。この回転は、膜貫通ヘリックスの後にある短いヘリックスa0'のC末端側に近いIle<sup>74</sup>を中心とした回転(図5)で説明される。「c<sub>1</sub>」ポジションから、「Int」および「b」ポジションの回転角はそれぞれ約35度および60度となっている。膜外ドメインの中の構造変化もまた大変興味深い。この構造変化は、膜外ドメインの中の2個のサブドメイン間でおこるドメインモーションで、ISPの「c<sub>1</sub>」、「Int」、および「b」ポジションにおける、シトクロム $c_1$ およびbの認識に深く関係していると考えられる。

"Int"ポジションでは、ISP膜外ドメインとループef間に多くの相互作用(もっぱらファンデルワールス相互作用)が観測される。ループef上でこの相互作用に参与する残基は各種bc<sub>1</sub>複合体間で保存されており、これらの残基の変異酵素にはbc<sub>1</sub>複合体を不活性化するものがあることから、"Int"ポジションの安定化はbc<sub>1</sub>複合体の活性に重要な働きがある可能性がある。

## 5. Q<sub>p</sub>結合部位におけるユビキノールの酸化と電子の流れの分岐

ユビキノールがQ<sub>p</sub>結合部位で酸化される際、最初の電子はISP、そしてシトクロム $c_1$ へと移動し、2個目の電子はヘムb<sub>L</sub>へと移動する<sup>(14,15,16,17)</sup>。この分岐はキノンサイクルにおいてもっとも不可解な部分であったが、ISPが構造変化を起こすことを考慮にいと、この現象を非常にうまく説明できる。我々はこれをユビキノール酸化の三状態モデル<sup>(5,13)</sup>と呼んでいる(図5a)。

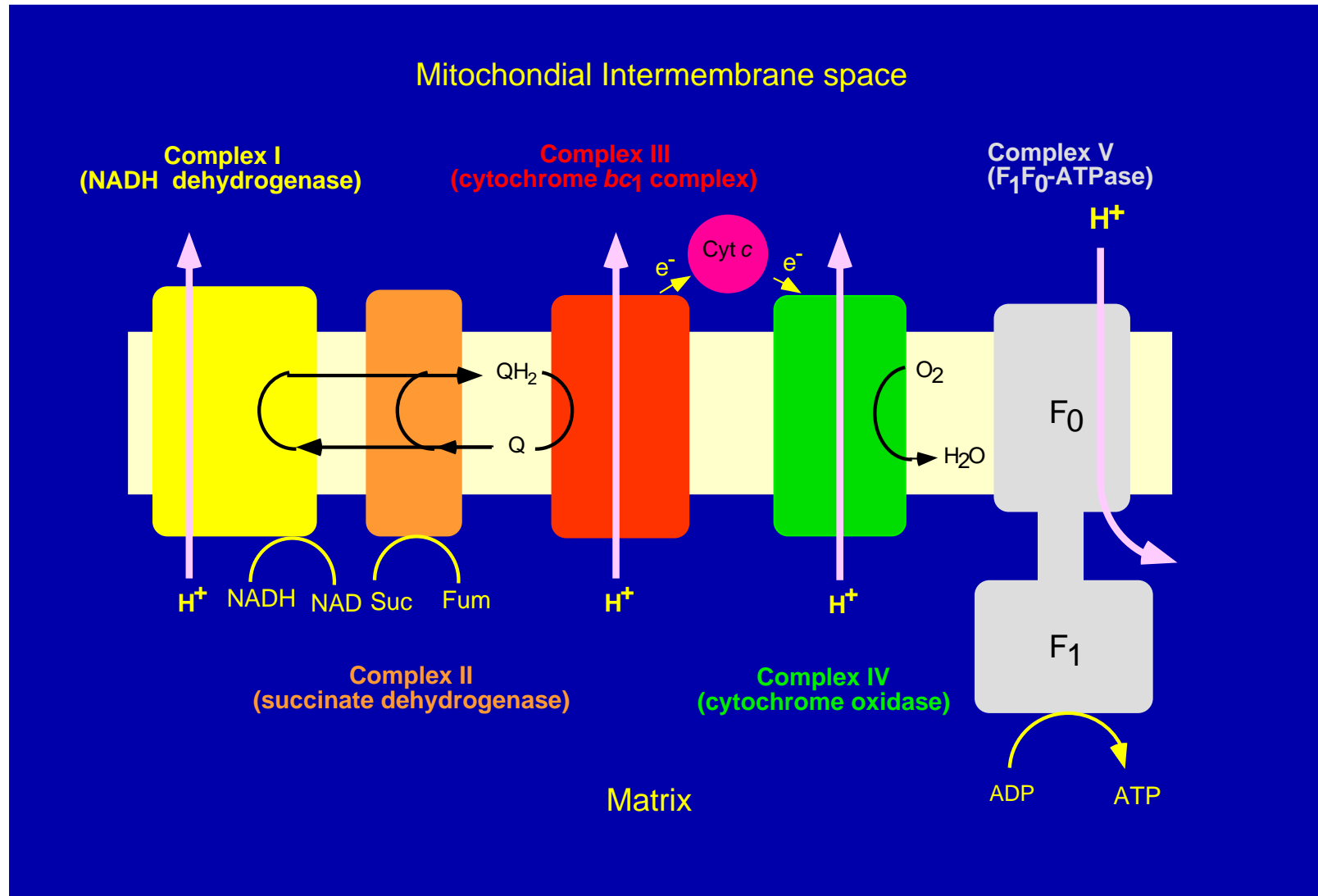
1) 酸化された鉄 硫黄中心は他のサブユニットと水素結合を作らないことが知られている<sup>(18)</sup>ので"Int"状態はこれに対応すると考えられる。ただし水素結合がない状態ではISPは非常に動きやすく、"Int"ポジションの近傍で熱振動していると思われる。2) ISPは位置関係から"b"ポジションにおいてのみ、Q<sub>p</sub>結合部位に結合しているユビキノールまたはセミキノンと相互作用できる。実際にセミキノンの類似体であるスティグマテリ

ンが"b"ポジションにあるISPのHis161と水素結合していることが、ニワトリbc<sub>1</sub>複合体で確認されている。3)還元された鉄 硫黄中心はQ<sub>p</sub>結合部位にキノールイオンまたはセミキノンがないときにはQ<sub>p</sub>結合部位から遠く離れた位置に存在することが示唆されている<sup>(18)</sup>。これは"c<sub>1</sub>"ポジションに対応すると考えられる。これらの推定が正しいとすれば、キノールの酸化と電子の流れの分岐は以下のように説明できる(図5b)。a)基質がなくbc<sub>1</sub>複合体が完全に酸化されているときISPは"Int"ポジション付近にある。ISPはこの位置の回りで熱振動により動いている。b)ユビキノールがシトクロムbのQ<sub>p</sub>結合部位に結合する。c)ユビキノールから水素イオンが脱離してユビキノールイオン(QH<sup>-</sup>)になる。ISPのHis161がQHと水素結合を形成することによりISPは"b"ポジションにトラップされる。d)最初の電子伝達はヘムb<sub>L</sub>より酸化還元電位の低いISPに対して起こりセミキノン(SQ<sup>-</sup>)が生成する。このとき不安定なセミキノンは還元した鉄 硫黄中心と結合し安定化されている<sup>(14)</sup>。e)"b"ポジションではISPからヘムc<sub>1</sub>の距離が遠いので、電子伝達は起こらずISPは還元された状態のままである。したがって2番目の電子伝達はb<sub>L</sub>に対して起こり、同時に水素イオンが放出される。f)ヘムb<sub>L</sub>上の電子は速やかにヘムb<sub>H</sub>へと移動する。またユビキノンと鉄 硫黄中心の結合は弱まりISPは"c<sub>1</sub>"ポジションへ移動し、鉄 硫黄中心の電子がヘムc<sub>1</sub>に渡される。ヘムc<sub>1</sub>上の電子がシトクロムcに渡されて最初の状態a)に戻る。このように考えると全ての電子伝達は水素結合を介しているため非常に速く、律速段階にはならないと考えられ、生化学的に観測された結果をうまく説明できる。

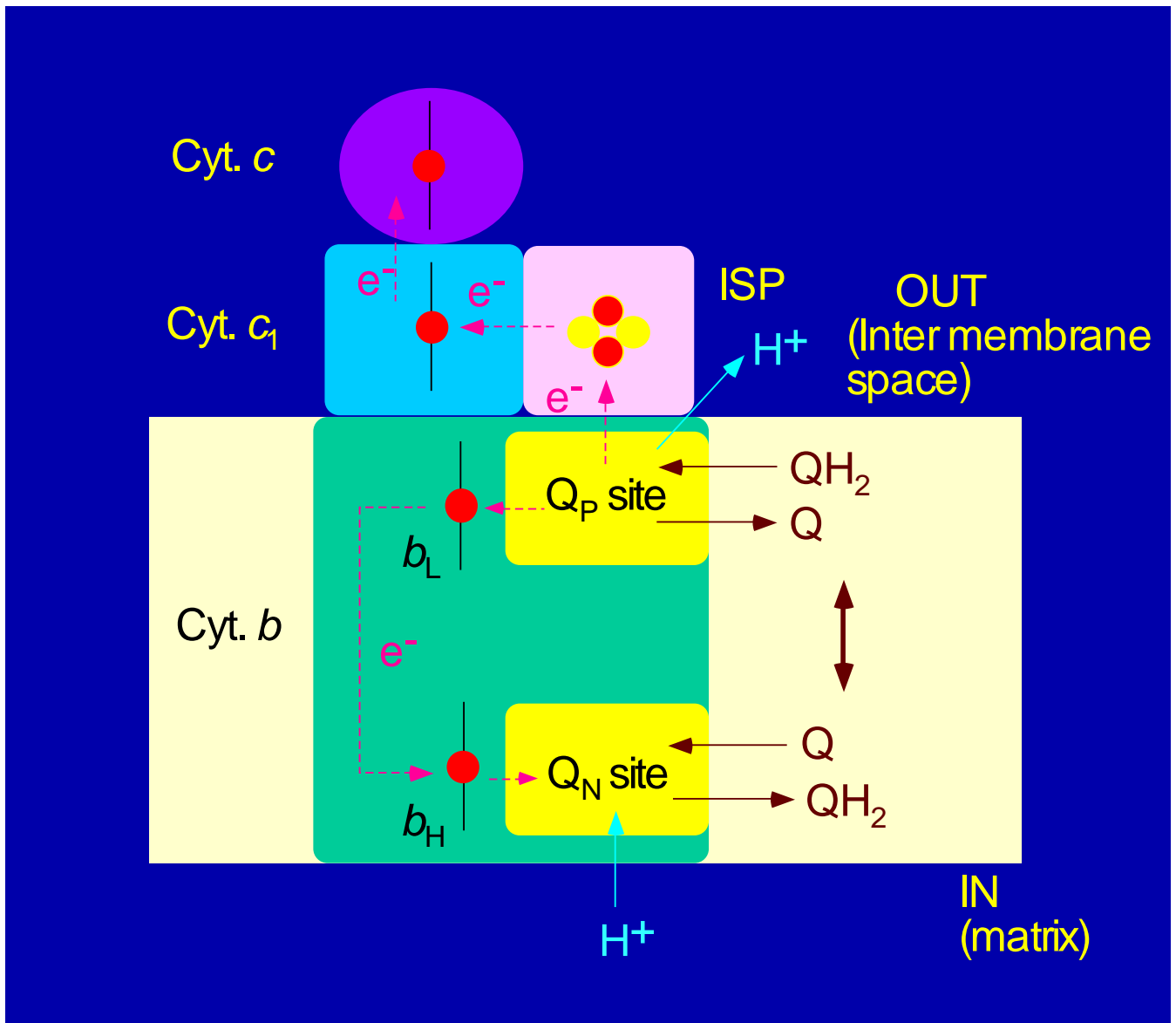
#### 文献リスト

- 1) J.P.Abrahams, A.G.Leslie, R.Lutter, J.E.Walker : Nature, 370, 621-628(1994).
- 2) S.Iwata, C.Ostermeier, B.Ludwig, H.Michel : Nature, 376, 660-669(1995).
- 3) T.Tsukihara, H.Aoyama, E.Yamashita, T.Tomizaki, H.Yamaguchi, K.Shinzawa-Itoh, R.Nakashima, R.Yano, and S.Yoshikawa : Science, 272, 1136-1144(1996).
- 4) D.Xia, C.-A.Yu, H.Kim, J.-Z.Xia, A.M.Kachurin, L.Zhang, L.Yu, J.Deisenhofer : Science, 277, 60-66(1997).
- 5) S.Iwata, J.W.Lee, K.Okada, J.K.Lee, M.Iwata, B.Rasmussen, T.A.Link, S.Ramaswamy, B. K.Jap : Science, 281, 64-71(1998).
- 6) Z.Zhang, L.Huang, V.M.Shulmeister, Y.-I.Chi, K.K.Kim, L.-W.Hung, A.R.Crofts, E.A.Berry, S.-H.Kim : Nature, 392, 677-684(1998).
- 7) T.M.Iverson, C.Luna-Chavez, G.Cecchini, D.C.Rees : Science, 284, 1961-1966(1999).
- 8) P. Mitchell : J.Theor.Biol., 62, 327-367 (1976).

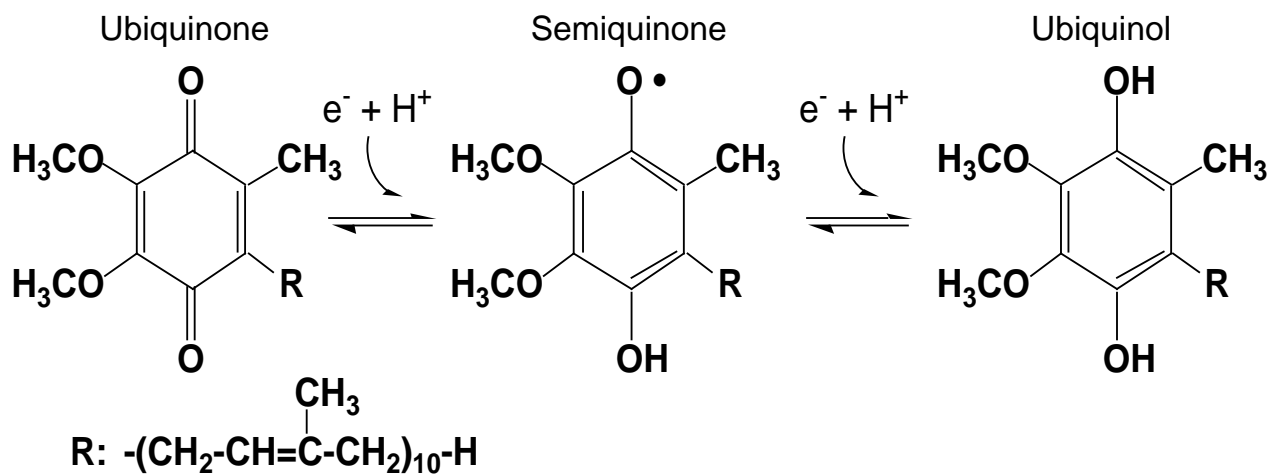
- 9) E.A.Berry, L. Huang, T.N.Earnest, B.K.Jap : J. Mol. Biol., 224, 1161-1166 (1992).
- 10) J.W.Lee, M.Chan, T.V.Law, H.J.Kwon, B.K.Jap : J. Mol. Biol., 252, 15-19 (1995).
- 11) U.Brandt, B.Trumpower : Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol., 29,165-197(1986).
- 12) S.Iwata, M.Saynovits, T.A.Link, H.Michel : Structure, 4, 567-579(1996).
- 13) M.Iwata, J.Bjorkman, S. Iwata : J.Bioenerg.biomembr., 31, 169-175(1999).
- 14) T.A.Link : FEBS Lett., 412, 257-264(1997).
- 15)M.K.Wikstrom, J.A.Berden : Biochim.Biophys.Acta, 283,403-(1972)
- 16)B.L.Trumpower : J.Biol.Chem., 265, 11409-(1990).
- 17)U.Brandt : FEBS Lett., 387, 1-(1997).
- 18) T.A.Link, O.M.Hatzfeld, M.Saynovits : "Transition Metals in Biology and their Coordination Chemistry", Wiley-VCH, 1997, p.315-325.



a

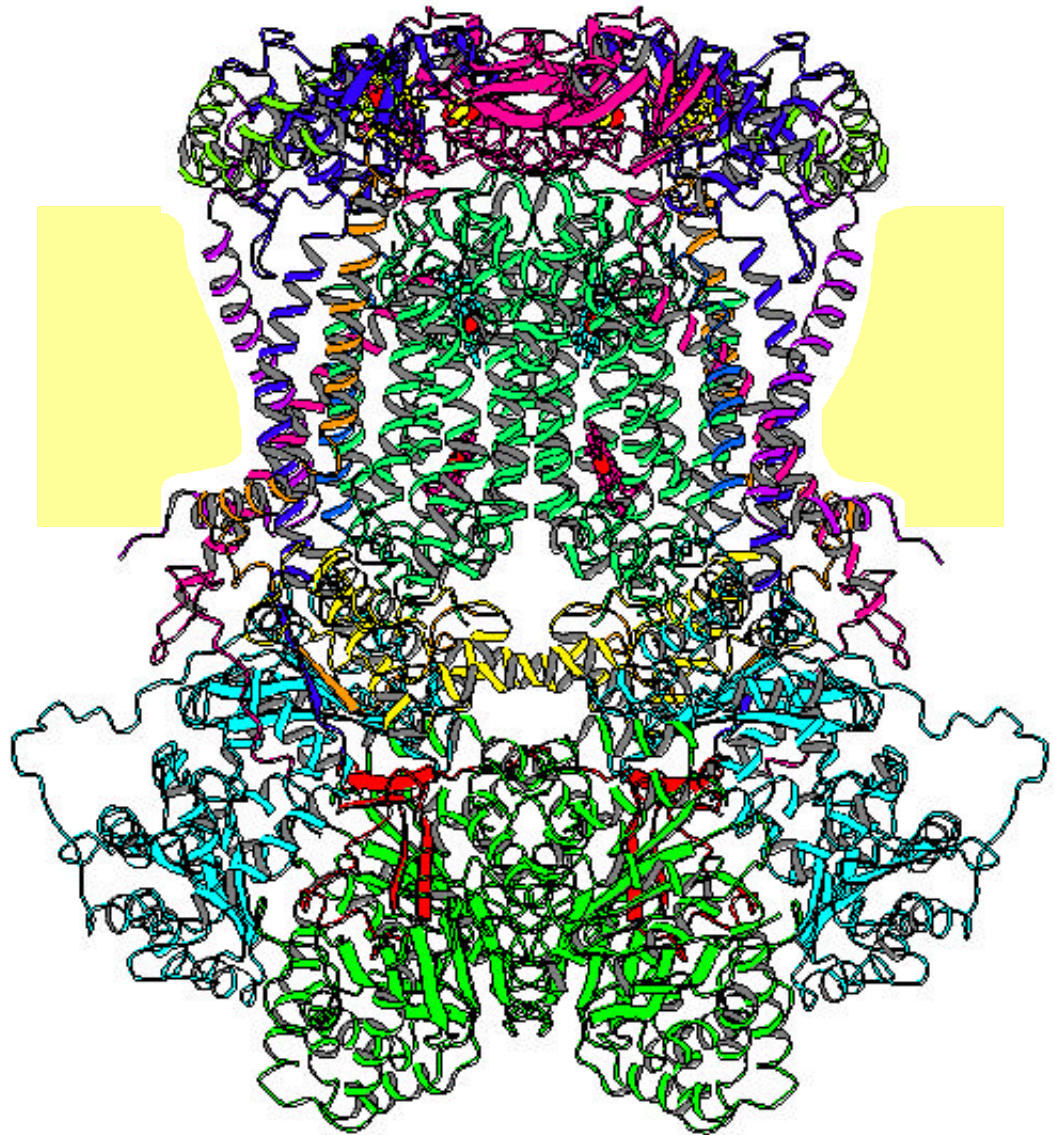
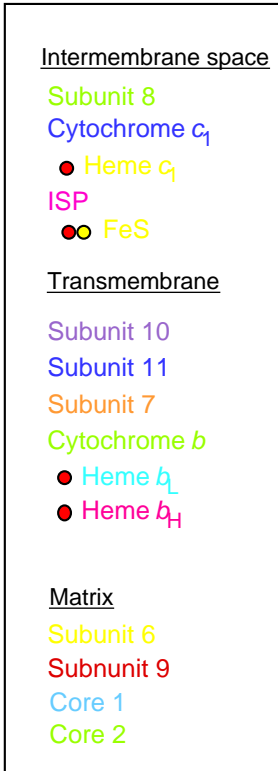


b

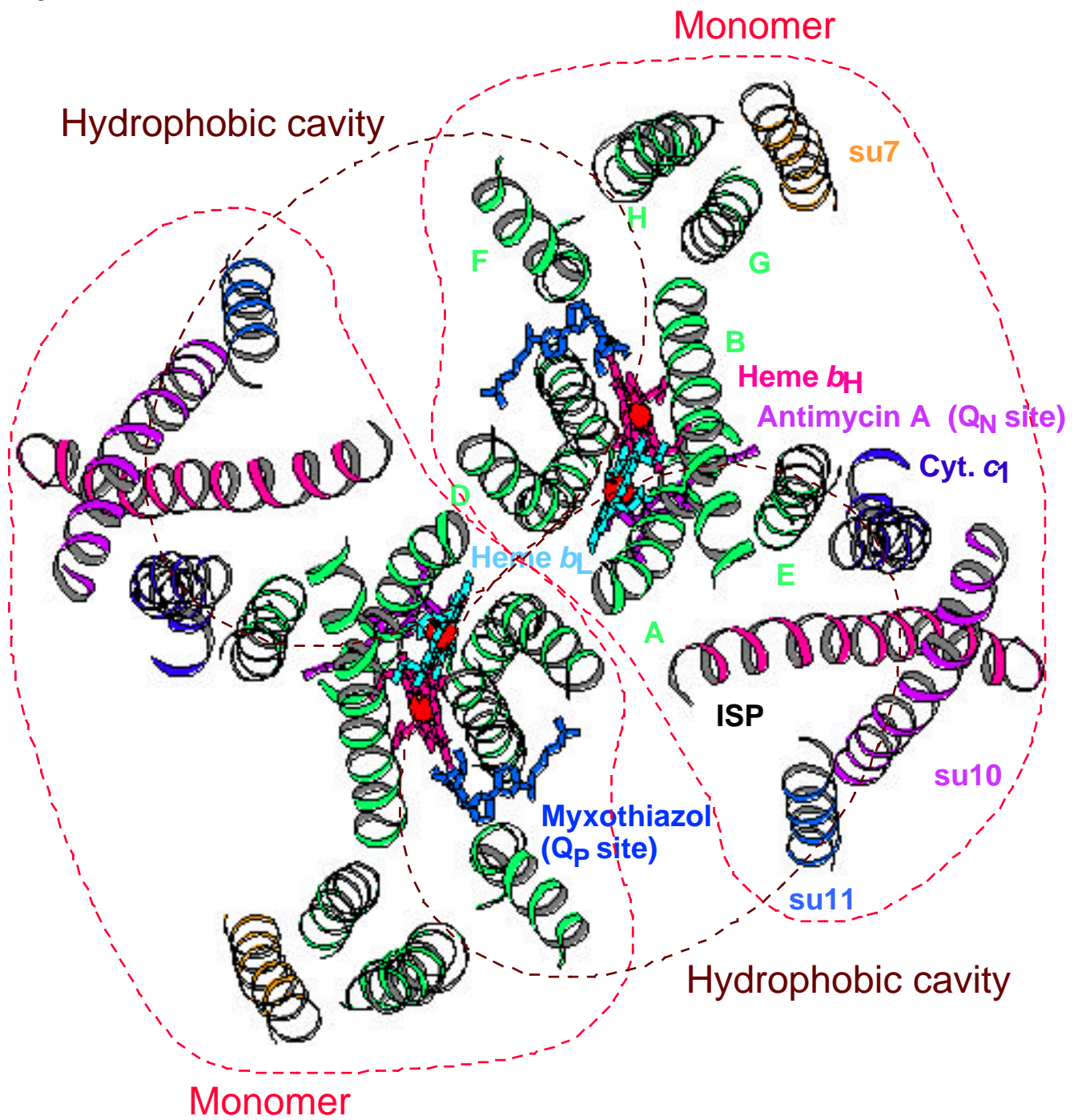


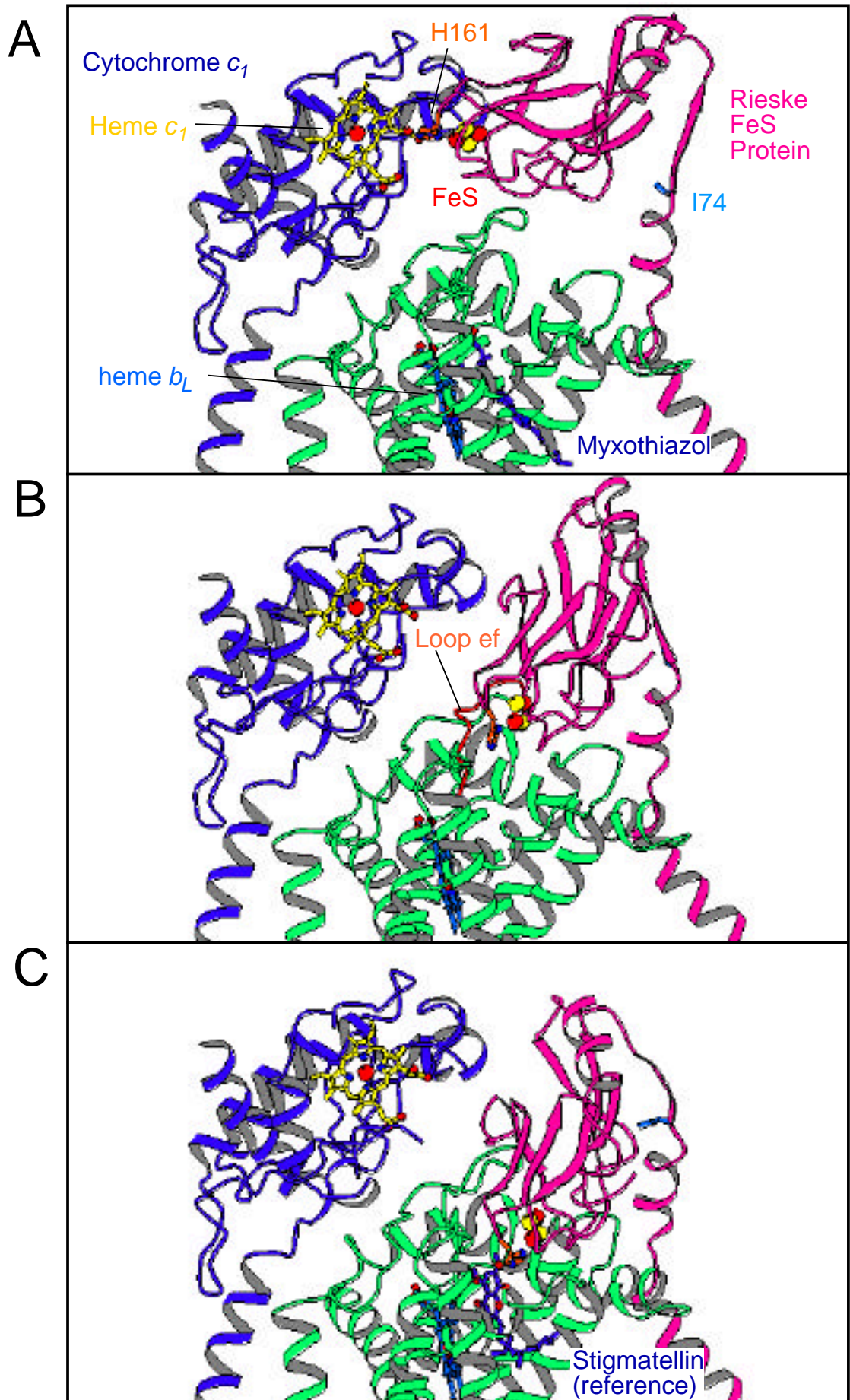


a

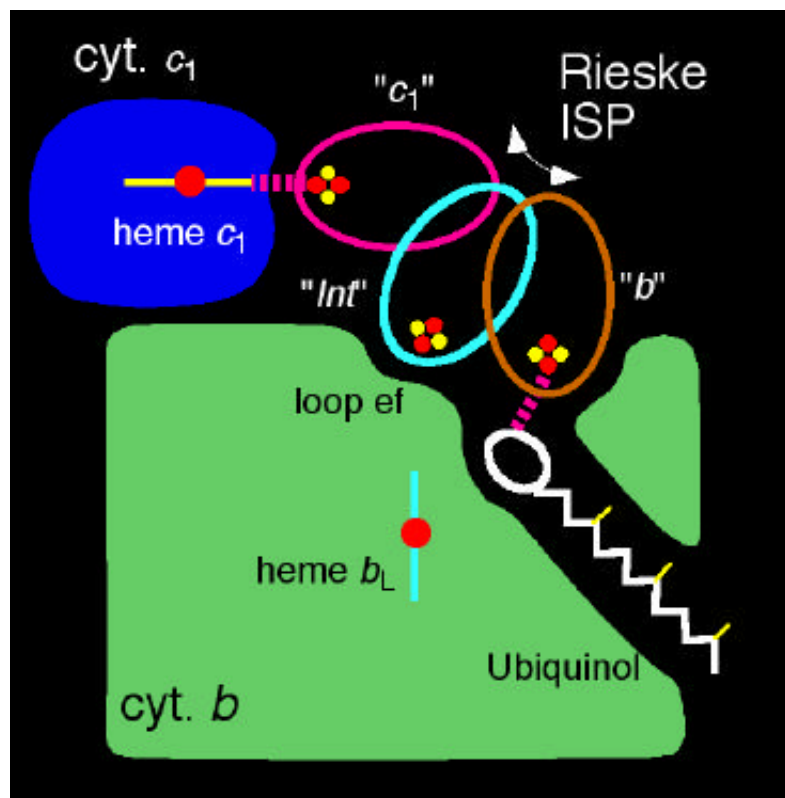


b





a



b

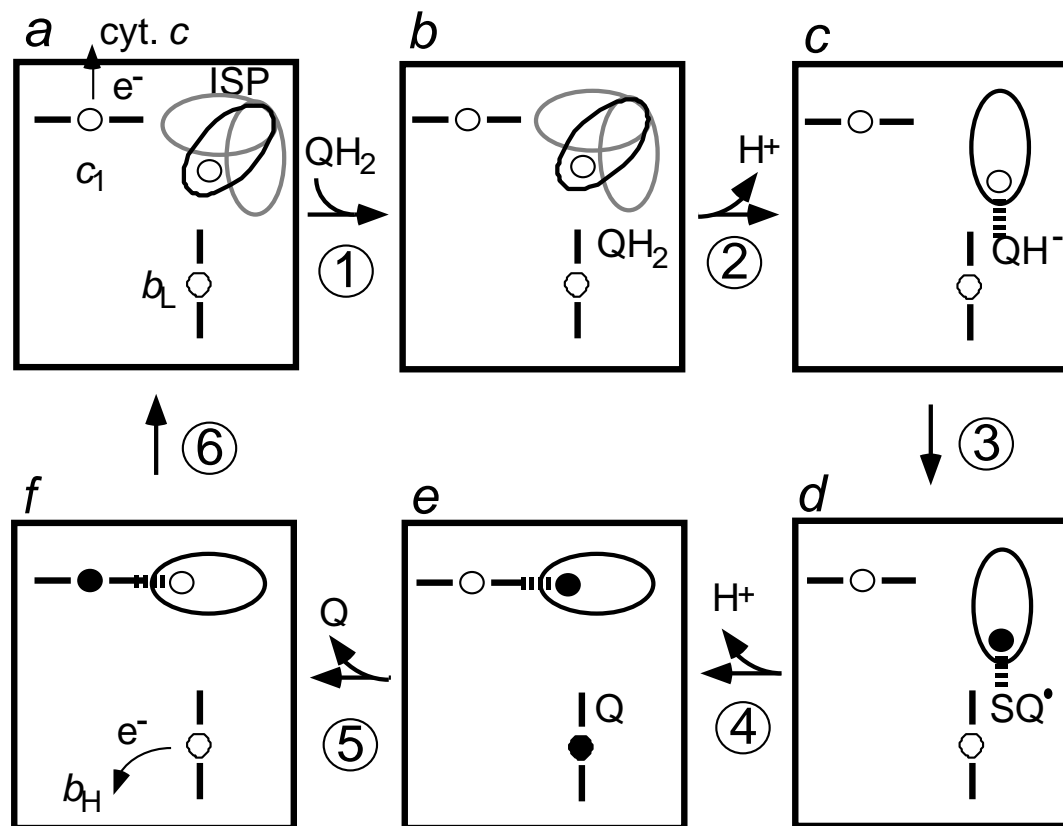


図1. ミトコンドリアの電子伝達系の概念図

Suc: コハク酸

Fum: フマル酸

cyt.c: シトクロムc

図2.

(a) キノンサイクルの仕組み

(b) ユビキノンの酸化還元反応

ISP: リスケ鉄 硫黄蛋白質

図3. ウシ心筋ミトコンドリア由来シトクロムbc<sub>1</sub>複合体の全体図 (P6522構造)

(a) 二量体をその2回回転軸に垂直、膜に平行な方向から見た図

(b) 二量体をその2回回転軸方向から見下ろした図。膜貫通ヘリックスおよび阻害剤を示した。二量体  
の間に疎水的な大きな空間があり、一方の単量体のQ<sub>p</sub>結合部位(ミクソチアゾールが結合している)と  
もう一方のQ<sub>N</sub>結合部位(アンチマイシンAが結合している)は同じ疎水空間に面している。

図4. シトクロムb及びシトクロムc<sub>1</sub>に対するISPの膜外ドメインの相対的な動き

A: "c<sub>1</sub>"ポジション(ウシbc<sub>1</sub>複合体P6522構造)。Q<sub>p</sub>結合部位中のミクソチアゾールも同時に示した。  
"c<sub>1</sub>"ポジションからInt"ポジション及びInt"ポジションから"b"ポジションへの回転軸に近いIle74と  
Gly137も図中に示されている。

B: "Int"ポジション(ウシbc<sub>1</sub>複合体P65構造)。リスケ鉄-硫黄蛋白質の膜外ドメインはシトクロムb  
のループefの上に結合している。

C: "b"ポジション(ニワトリbc<sub>1</sub>複合体と阻害剤スティグマテリンの複合体)。Q<sub>p</sub>結合部位中のスティ  
グマテリンはリスケ鉄-硫黄蛋白質のHis161と水素結合している。

図5. 三状態モデルの模式図

(a) 3つのポジションでのISPの膜外ドメインの位置を模式的に表したもの。ヘムとリスケ鉄 硫黄クラ  
スターの間の点線は水素結合を示唆している。

(b) 我々の三状態モデルに基づいたユビキノン酸化機構

: 還元状態の金属中心

: 酸化状態の金属中心