

解説

ミトコンドリアにおけるシアン耐性呼吸酵素 (AOX) の構造と機能[‡]

岩手大学 農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター
伊藤 菊一*

シアン耐性呼吸酵素 (Alternative oxidase: AOX) は、植物のみならず菌類から原生動物に広く分布するユビキノール酸化酵素である。AOXはミトコンドリアにおいて2量体として存在し、その触媒反応は二核非ヘム鉄を介した redox cycle を経て行われる。近年、寄生虫トリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) 由来の AOX (TAO) の結晶解析が行われ、AOXの分子機能をより詳細に理解できるようになった。本稿においては、AOXの構造に基づいた反応機構について概説するとともに、発熱植物を対象としたAOXの解析から得られた最近の知見についても触れたい。

1. はじめに

Alternative oxidase (AOX) はミトコンドリア呼吸鎖においてマトリックス側に位置する末端ユビキノール酸化酵素である¹⁾。AOXは植物において普遍的に存在するが、その存在は、菌類をはじめ、*Trypanosoma brucei* や *Cryptosporidium parvum* のような原生動物においても報告されている²⁾。AOXの機能としては、植物の熱産生や酸化ストレス等への環境適応、さらに、ミトコンドリアや細胞代謝における恒常性の維持などが指摘されている³⁾。これまでAOXタンパク質の結晶化が困難であったことから、その詳細な分子構造は不明のままであった

が、最近、トリパノソーマ由来のTAOの結晶構造が明らかにされ⁴⁾、その触媒反応における分子メカニズムが詳しく理解できるようになった。ここでは、ミトコンドリア呼吸におけるAOXの分子機能を

概説するとともに、植物の熱産生におけるAOXの機能についても言及したい。なお、AOXに関する総説は本稿以外にも数多く発表

されているので⁵⁻¹⁰⁾、興味のある方は参考にして頂きたい。

2. 歴史的側面からみたAOX研究

植物のミトコンドリアは複合体Iおよび2種類のロテノン非感受性NAD(P)H脱水素酵素、さらに、複合体IIによりユビキノンプールに電子が集められ、それが、複合体IIIや複合体IVを経由するチトクローム呼吸経路 (C O X 経路)、あるいは、シアン耐性呼吸酵素 (AOX) を介した呼吸に使われる (図1)。AOXを介した呼吸はエネルギー消散的であり、植物の熱産生に

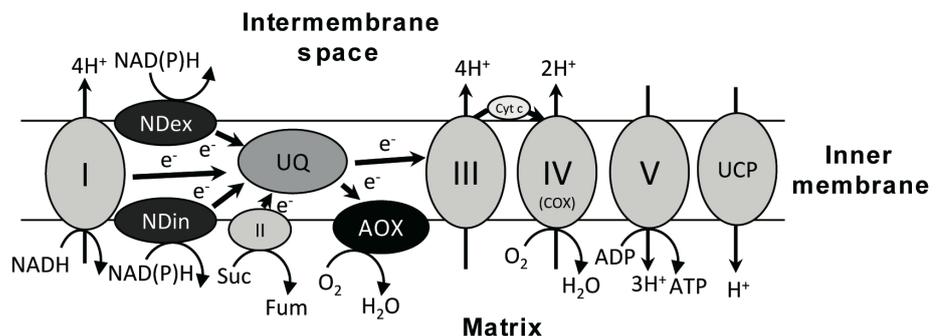


図1 植物におけるミトコンドリア呼吸鎖とシアン耐性呼吸酵素 (AOX)

ミトコンドリアにおいては、複合体Iやロテノン非感受性NAD(P)H脱水素酵素や複合体IIによりユビキノンプール (UQ) に電子が集められる。これらの電子が複合体IIIを経てCOX経路に電子が流れることにより、プロトン勾配が形成され、ATPが合成される。AOXは還元型ユビキノールから電子を受け取り、酸素に受け渡す。AOXはプロトン濃度勾配の形成には寄与しない。AOX: alternative oxidase, UQ: ubiquinone, I-V: 複合体I-V, NDex: external NAD(P)H dehydrogenase, NDin: internal NAD(P)H dehydrogenase, COX: cytochrome c oxidase, UCP: uncoupling protein, Suc: succinate, Fum: fumarate

[‡] 解説特集「植物の呼吸」

* 連絡先 E-mail: kikuito@iwate-u.ac.jp

おけるAOXの重要性については古くから指摘されていた。AOXに関する研究は1934年に発表されたVan HerkとBadenhuizenの論文に遡ることができる¹¹⁾。この論文ではある種のサトイモ科植物の発熱組織がシアン化合物により阻害されない呼吸を有していることが記述されている。一方、発熱植物に関する論文は、1778年にLamarckにより発表された*Arum*属植物の発熱現象に関する記述が一番古いとされている¹⁾。その後、1934年に徳川生物學研究所のOkunukiが花粉の呼吸解析からシアン耐性呼吸はチトクローム呼吸経路から枝分かれした2次的な経路であることを報告している¹²⁾。また、1955年には、ヨーロッパに自生する*Arum maculatum*の発熱器官から調製したミトコンドリアがシアン耐性呼吸を持つことが示され¹³⁾、その後、単離ミトコンドリアを用いたAOX研究が大きく進展するきっかけとなった。当時のAOXに関する生化学的な研究から、当該タンパク質の反応には、フラボタンパク質が関与していないことが推定されていたが¹⁴⁾、AOXが介する酸素分子を水に還元する反応が、ヒドロキサム酸のような金属キレート剤により阻害されることが判明し¹⁵⁾、AOXの触媒する反応には遷移金属イオンが関与する可能性が指摘されていた。この点については、1990年にMinagawaらにより2価の鉄イオンがAOXの反応に必要であることが示されていたが¹⁶⁾、北米大陸に自生しているザゼンソウ (*Symplocarpus foetidus*)¹⁷⁾やヨーロッパに生育している*A. maculatum*¹⁸⁾および*Sauromatum guttatum*¹⁹⁾などの熱産生器官から得られたAOXの部分精製標品を用いた解析からは、AOX反応に関連する遷移金属イオンの同定には至らなかった。その後、2002年にシロイヌナズナ由来のAOXを大腸菌で発現させたEPRスペクトル解析の結果から、AOXが二核非ヘム鉄タンパク質であることが明らかとなり²⁰⁾、上述したMinagawaらの実験結果の重要性が再認識されることとなった。また、1995年にSiedowらは、二核非ヘム鉄タンパク質としてのAOXの反応は、同じ二核非ヘム鉄タンパク質ファミリーに属する、methane monooxygenaseやribonucleotide reductaseのR2サブユニットと同様に4つのヘリックスバンドル

構造をその活性中心に持ち、これが二核非ヘム鉄の足場になる可能性を指摘していた²¹⁾。すなわち、2つの鉄原子はAOXタンパク質の一次構造において高度に保存されているグルタミン酸およびアスパラギン酸とヒスチジン残基と相互作用し、diiron carboxylateタンパク質を形成するというモデルである。その後、このモデルは、1999年にAnderssonとNordlundにより $\Delta 9$ -desaturaseに見られる二核非ヘム鉄タンパク質のアミノ酸相互作用を考慮したモデルに修正されている²²⁾。2013年には、Kitaらのグループを中心とした研究により、トリパノソーマ由来のTAOの結晶構造が2.85 Åの分解能で解明され、その分子機構をより詳細に議論することが可能となった⁴⁾。

3. *T. brucei*から得られたAOX (TAO) の結晶構造および反応機構

TAOは、chain A及びchain Bから構成される2量体であり、ミトコンドリアに存在する膜タンパク質である(図2)¹⁴⁾。それぞれの単量体は6本の長い α ヘリックス($\alpha 1$ 鎖から $\alpha 6$ 鎖)から構成されており、chain Aの $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖が、chain Bの $\alpha 2^*$ 鎖、 $\alpha 3^*$ 鎖、および、 $\alpha 4^*$ 鎖と相互作用していると考えられる。これらの α ヘリックス鎖においてはHis-138、Leu-142、Arg-143、Arg-163、Leu-166、および、Gln-187が種々の生物種由来のAOXにおいて普遍的に保存されており、他の比較的保存性の高いアミノ酸残基(Met-131、Met-135、Leu-139、Ser-141、Arg-147、

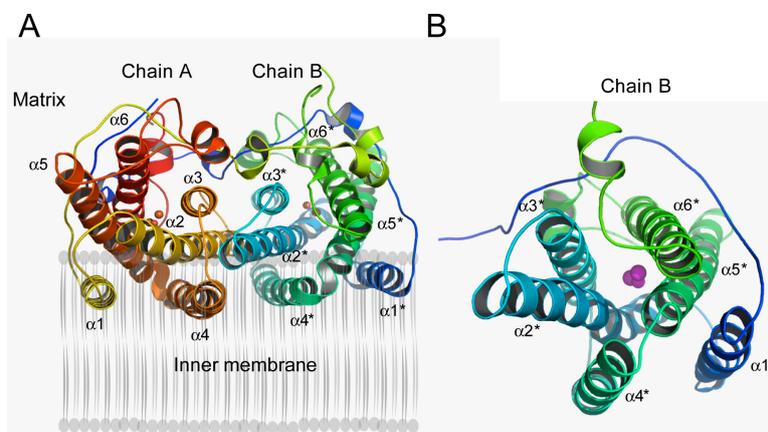


図2 トリパノソーマAOX (TAO) の構造

A TAOはミトコンドリアにおいて、chain Aおよびchain Bから成る2量体を形成する。それぞれの単量体は、6本の α ヘリックス($\alpha 1$ 鎖から $\alpha 6$ 鎖)から構成されている。B Chain Bの構造。 $\alpha 2^*$ 鎖、 $\alpha 3^*$ 鎖、 $\alpha 5^*$ 鎖、および、 $\alpha 6^*$ 鎖で囲まれたhydroxo bridgeから成る二核非ヘム鉄を紫色で示した。参考文献1より抜粋改変。

Leu-156、Arg-180、および、Ile-183) と共にAOX分子の2量体形成に関連していることが示唆される。また、TAOの結晶解析において、当該タンパク質のN末端から30残基までの領域に関しては電子密度が低く、現在のところ、その詳細な構造は明確ではないが、それぞれの単量体のN末端を含む領域は、他方の単量体に伸びている可能性が指摘されている¹⁾。一方、植物由来のAOXはTAOと比較してより長いN末端領域を有していることから、この領域は後述するようなシステイン残基を介した2量体形成の調節に関与していることも考えられる。

TAOの結晶構造の解析からは、その触媒反応に重要である二核非ヘム鉄の構造に関する情報も得られている^{1,4)}。すなわち、結晶解析によりTAOの二核非ヘム鉄における鉄原子間の距離は3.16 Åと推定されたが、これは当該領域におけるhydroxo bridge構造を形成する上で妥当な距離あると考えられる。さらに、2つの鉄原子は、AOXにおいて普遍的に保存されている4個のグルタミン酸残基 (Glu-123、Glu-162、Glu-213、および、Glu-266) との配位結合、および、2個のヒスチジン残基 (His-165およびHis-269) との水素結合により相互作用することにより、“di-iron center” と呼ばれる構造をとっている (図3)。AOXの機能におけるdi-iron centerの重要性を示す例として、我が国に自生するザゼンソウ (*S. renifolius*) から得られたAOXをヒト培

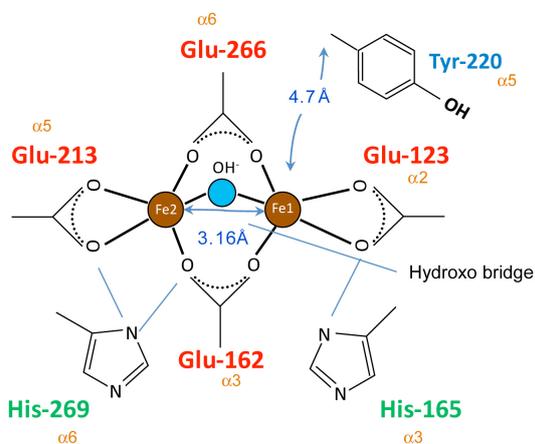


図3 AOXの活性中心を構成するdi-iron centerの構造
2つの鉄原子 (Fe1およびFe2) と4つのグルタミン酸残基 (Glu-123、Glu-162、Glu-213、および、Glu-266) が配位結合している。さらに、2つのヒスチジン残基 (His-165およびHis-269) は水素結合によりdi-iron centerを安定化している。それぞれのアミノ酸残基が位置する α -ヘリックス鎖を番号で示した。参考文献1より抜粋改変。

養細胞であるHeLa細胞で発現させた実験がある²³⁾。ザゼンソウ由来のAOXも上述したdi-iron centerを構成する4個のグルタミン酸残基と2個のヒスチジン残基を有しているが、Glu-213をAlaに置換したAOX (E213A) をHeLa細胞に導入すると、E213Aを発現しているミトコンドリアにおけるシアン耐性呼吸は著しく低下する。また、これらのHeLa細胞に呼吸鎖複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンAを添加し、活性酸素種 (ROS) の発生量を解析すると、野生型AOXの発現によりROSの発生量は有意に低下するが、E213Aを発現するHeLa細胞においてはROSの発生はコントロール区と同程度の高いレベルであることが判明した。これは、添加されたアンチマイシンAが呼吸鎖複合体IIIを阻害することでCOX経路への電子の流れがブロックされ、ミトコンドリア電子伝達系が過還元状態となりROSの発生量が増大したと考えられる。ここに新たにAOX経路が導入されると、過剰の電子がAOXを介して逃され、その結果として、ROSの発生量が低下したと考えられる。これらの結果は、AOXの触媒活性におけるdi-iron centerの重要性を示す一例である。現在、Pfamデータベース²⁴⁾には、原生物から植物および菌類まで343種の生物種から637個の配列がAOX類似タンパク質として登録されている。これらのAOX様アミノ酸配列はそのデータの精度においても様々なものが含まれているが、これらのデータの中で実際に機能性を有するAOXは、少なくともdi-iron centerを構成するアミノ酸残基が保存されていることが必要である。

AOXは2分子の還元型ユビキノンから4個の電子を受け取り、1分子の酸素を2分子の水に還元するredox cycleを触媒する (図4)。すなわち、最初に、di-iron centerに酸素分子が作用し、不安定なsuperoxo錯体が生じる。これに還元型ユビキノンから電子が供給され、セミユビキノンが生じるとともに、hydroperoxo中間体を経て1分子の水が解離しperoxodiironとなる。ここにTyr-220から発生したラジカルが作用し、セミユビキノンが還元型ユビキノンに変換され、さらに、生じたoxodiironに還元型ユビキノンが作用し、水分子が解離するとともに、redox cycleが1回転し、はじめのdi-iron centerに戻るという反応である。一連のredox cycleにおいては、チロシン残基が重要な働きを有するが、TAOの結晶構造の解析から、di-iron centerを構成する2つの鉄原子の1つとの間の距離が4.7 Åと最も近接しているTyr-220がredox cycleに関与するチロシン

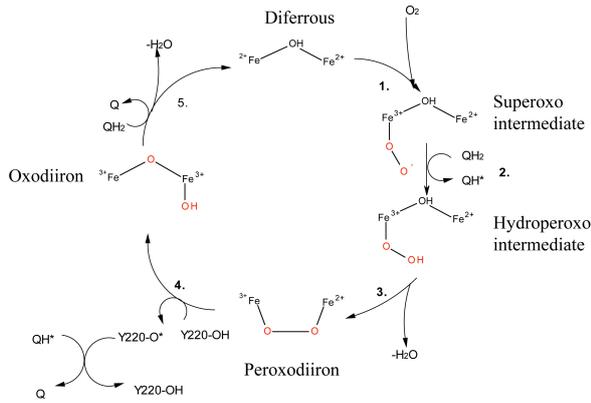


図4 AOXの触媒反応に関するredox cycle

AOXのdi-iron centerに酸素分子が作用し (1)、superoxo 錯体が生じる。さらに還元型ユビキノ (QH₂) から電子が供給され hydroperoxo 中間体が生じるとともに、QH₂はセミユビキノ (QH[•]) になる (2)。さらに、水分子が解離してperoxodiironが生じ (3)、Tyr-220から供給されたラジカルによりoxodiironが生成する (4)。その際、QH[•]は酸化型ユビキノとなる。OxodiironにはQH₂が作用し、水分子が解離するとともに酸化型ユビキノ (Q) を生じる (5)。一連のredox cycleが一回転すると、AOXの触媒する反応 O₂ + 2QH₂ → 2H₂O + 2Q が完結する。参考文献1より抜粋改変。

残基として提示されている^{1,4)}。なお、Tyr-220は植物や菌類などで報告されているAOXの一次構造において保存性が非常に高い¹⁾。

4. 植物の熱産生におけるAOXの機能制御

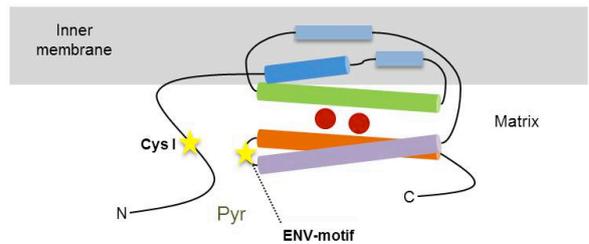
これまではAOXの構造と機能について、結晶構造が明らかにされたTAOについて説明してきた。一方、植物のAOXについては、未だにその結晶解析の成功例は報告されておらず、その詳細な分子機構には不明な点が残されているが、ここでは植物由来のAOXが有するTAOとは異なる活性調節機構について説明したい。

植物のAOXにおいては、そのN末端領域に当該分子の活性調節に関連すると考えられているシステイン残基 (Cys I) が存在する (図5A)^{25,26)}。先述したようにAOXは2量体として存在するが、単量体同士におけるCys Iを介したジスルフィド結合によりAOXはcovalently associated dimerになり、その活性が失われる。さらに、Cys Iにはαケト酸が作用し、AOXの活性を賦活化することが知られている。例えば、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序から調製したミトコンドリア反転膜小胞を用いた実験では、ピルビン酸がAOX活性を有意に活性化できることが報告されている (図5B)²⁷⁾。このようなAOXの活性化には、Cys Iのチオール基に作用したピルビン酸が形成する

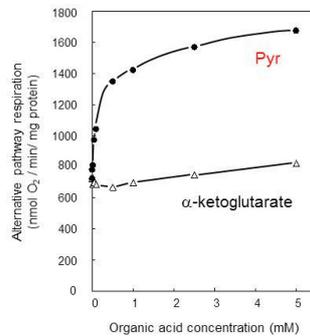
thiohemiacetal構造の関与が示唆されている (図5C)。さらに、ピルビン酸によるCys Iを介したAOXの活性化には、ENV-motifと呼ばれるアミノ酸配列が重要である。この配列はAOX分子のα5鎖とα6鎖の間に存在し、Cys I部位と空間的に相互作用できると考えられている (図5A)^{28,29)}。

それでは、植物のAOXにおけるピルビン酸のような代謝産物による翻訳後活性調節の役割は何であろうか。上述した発熱植物の一つであるザゼンソウは、氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、その肉穂花序温度を20°C程度に一定の期間維持することができる恒温性を有している³⁰⁾。ザゼンソウに見られる恒温性は、肉穂花序における呼吸量の変動と密接に関わっており、外気温が低下するとその呼吸量は増大し、外気温が上昇するとその呼吸量は低下する。一方、ザゼンソウの発熱性肉穂花序におけるAOXはnon-covalently associated dimer (Cys Iが還元型として存在する2量体) として検出され、さらに、その発現量は外気温の変動に大きく影響されないことが判明している³¹⁾。また、ザゼンソウにおける熱産生は主に炭水化物をその呼吸

A



B



C

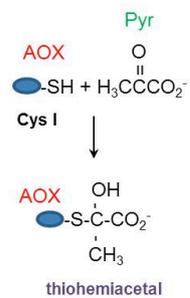


図5 ピルビン酸によるAOXの活性化

A Cys Iを有するAOXの構造。ピルビン酸 (Pyr) はCys IおよびENV-motifと呼ばれるアミノ酸配列に作用し、AOXの活性を賦活化すると考えられている。B ザゼンソウから調製したミトコンドリア反転膜小胞を用いたピルビン酸およびαケトグルタル酸のAOX活性に対する効果。参考文献27より抜粋改変。C Cys Iとピルビン酸が作用して生じるthiohemiacetal構造。

表1 発熱植物から得られたAOXのピルビン酸による活性制御

発熱植物	恒温性	AOX	CysI + CysII	ENV-motif	ピルビン酸に対する応答性	文献
<i>S. renifolius</i>	有り	SrAOX	Cys + Cys	ENV	+	Onda <i>et al.</i> (2007) ²⁷⁾
<i>S. guttatum</i>	無し	SgAOX	Cys + Cys	QDC	-	Crichton <i>et al.</i> (2005) ²⁸⁾
<i>A. maculatum</i>	無し	AmAOX1e	Cys + Cys	QNT	-	Ito <i>et al.</i> (2011) ³⁵⁾

基質にしていることから^{32,33)}、発熱組織において解糖経路により生じたピルビン酸が外気温の変動と連動しながらAOXの機能を調節している可能性も考えられる。一方で、発熱植物の中には、ザゼンソウとは異なり、恒温性を示さず、一過的な発熱現象のみを示すものも存在する。例えば、*A. maculatum*の付属体は30°C程度にまで一過的に上昇するが、外気温の変動に応じた温度調節機構は有さない³⁴⁻³⁶⁾。

それでは、恒温性をもたず一過的な発熱のみが観察される*A. maculatum*のAOXはピルビン酸によりその活性が調節されるのであろうか。この問題を明らかにするため、我々は*A. maculatum*の付属体で発現しているAOXの詳細な解析を行い、*AmAOX1a*から*AmAOX1g*と名付けられた7種類の遺伝子を同定することに成功した³⁵⁾。なお、*A. maculatum*はAOX研究史においても述べたように、シアン耐性呼吸活性がミトコンドリアに存在することが初めて示された発熱植物である¹³⁾。しかしながら、これまでAOX遺伝子に関する研究は行われておらず、我々の解析が本植物のAOX遺伝子に関する最初の事例である。これらの遺伝子産物は、ENV-motifを持っているもの (*AmAOX1a, 1b, 1c, 1d*および*1f*)、当該配列がQNTに置換されているもの (*AmAOX1e*)、および、QDTに置換されているもの (*AmAOX1g*) に分類できることが判明した。さらに、転写産物の定量的解析からは、発熱性の付属体において主に発現しているAOX分子種はQNT配列を有する*AmAOX1e*であることが突き止められた。また、*A. maculatum*の発熱性付属体から調製したミトコンドリアにおけるAOXはnon-covalently associated dimerとして存在し、当該タンパク質をnano LC-MS/MSにより解析すると、*AmAOX1e*に特異的なペプチド配列が検出されることが判明した³⁵⁾。そこで、これらENV型、QNT型、および、QDT型のAOXのピルビン酸に対する応答性をより詳細に解析するため、当該ミトコンドリアにおいてAOXを発現させ、AOX呼吸に対するピルビン酸の効果を解析した。その結果、

ENV型のAOXはピルビン酸により2倍程度にAOX呼吸を活性化することが判明したが、QNT型およびQDT型については、ピルビン酸による明確なAOX呼吸の活性化は観察されなかった³⁵⁾。従って、*A. maculatum*の発熱性付属体で発現している主たるAOXと考えられるQNT型の*AmAOX1e*はENV型のザゼンソウAOXとは異なり、ピルビン酸による活性調節を受けない分子種であることが推定される。

これまで発熱植物から得られたAOXについて、そのピルビン酸による活性制御に関する生化学的な実験が行われている知見を表1にまとめた。これら3種のいずれもサトイモ科に属する発熱植物において主に発現しているAOXは、そのピルビン酸応答性に差異があり、恒温性を示さず一過的な発熱を示す植物種において主に発現しているAOXはいずれもピルビン酸に応答しないタイプである。なお、恒温性を示す発熱植物であるハスから同定されたAOX産物はそのアミノ酸配列からコハク酸に応答する可能性が指摘されている³⁷⁾、現在のところ、ハスAOXにおけるコハク酸の直接的な活性調節を示す生化学的実験は行われておらず、表1には含めていない。現時点では、ピルビン酸を含む α ケト酸がいかなる分子メカニズムでCys-IやENV-motifに作用しAOXを活性化しているのかは不明のままであり、また、発熱植物種における α ケト酸によるAOXの解析例も多くはない。しかしながら、表1に示すように、恒温性を有さない発熱植物はいずれもピルビン酸に対する応答を示さないタイプのAOXを発現していることは興味深い点である。一方、先述したように、恒温性を示す植物の熱産生組織における呼吸は外気温の変動と逆相関を示すが、ピルビン酸によるAOX活性の調節が、ザゼンソウにおける環境温度変化と連動した呼吸代謝と密接に関連している可能性は否定できない。恒温性を有する発熱植物においてAOX機能を含む代謝フィードバック制御の全体像をより明確にするためには、ミトコンドリアのマトリックス内におけるピ

ルビン酸濃度の測定や、解糖経路に関与する酵素群の温度応答など、さらなる解析が必要である。

ところで、AOXは先述したredox cycleにより、還元型ユビキノンから電子を受け取り、酸素分子を水に還元する反応を触媒することから、ユビキノンの酸化還元レベルもAOXの活性に重要である。すなわち、たとえAOXタンパク質が一定量発現していたとしても、その基質である還元型ユビキノンの割合が小さければ、AOXはユビキノール酸化酵素として十分に機能できないからである。これまでの研究により、*A. maculatum*の発熱に発熱している付属体におけるユビキノンはそのほとんどが還元型で存在していることが示されており^{36,38)}、これは、本植物から調製したミトコンドリアにおけるAOXがnon-covalently associated dimerとして検出されること³⁵⁾とも矛盾がない。おそらく、一過的な発熱が観察される*A. maculatum*においては、炭水化物を基質とする一連の糖代謝がある時期に著しく亢進し、解糖経路の下流に位置するミトコンドリアのNADH脱水素酵素等により、ユビキノンが過還元状態に維持されるのであろう。従って、このような環境において、ミトコンドリアに対する酸素の供給が十分であるならば、本植物の発熱組織で発現しているピルビン酸非応答型のAOX (AmAOX1e)が高い触媒活性を示し、その結果として大きな代謝熱が発生していることが推定される。一方、興味深いことに、*A. maculatum*とは異なり、ザゼンソウの発熱性肉穂花序におけるユビキノンの還元レベルは、外気温の変動にも関わらず、40~50%に保たれていることが判明している³⁹⁾。現在のところ、このようなユビキノンの中程度の還元状態がいかなるメカニズムで維持されているかは不明であるが、ザゼンソウ発熱組織で発現しているピルビン酸応答型のAOXは、少なくともその基質であるユビキノンの還元レベルに着目すると、*A. maculatum*とは異なる環境で機能していることが予想される。また、先述したように、植物のAOXはCys Iを介して活性型のnon-covalently associated dimer (還元型)と非活性型のcovalently associated dimer (酸化型)の2つの状態を取ることができるが、我々の経験では、*A. maculatum*やザゼンソウの発熱組織由来のミトコンドリアにおけるAOXはいつもnon-covalently associated dimerとして検出される^{31,35)}。これは、*A. maculatum*においては、上述したようなミトコンドリアの過還元状態により説明できるが、ユビキノンが中程度の還元状態を示すザゼンソウにおいては、別のメカニズムが関与して

いる可能性もある。最近シロイヌナズナから調製したミトコンドリアを用いた解析により、チオレドキシシステムがAOXの還元に関与していることが報告されており⁴⁰⁾、ザゼンソウにおけるチオレドキシシステムとAOX活性との関連性も興味ある問題である。また、*A. maculatum*およびザゼンソウ由来の精製ミトコンドリアを用いたBlue native PAGE解析から、両植物におけるAOXはいずれもおよそ200 kDaにピークを持つブロードなバンドとして検出されることが判明している⁴¹⁾。この結果は、AOXがミトコンドリアにおいて超複合体を形成している可能性を示しているが、今のところ、AOXが他のタンパク質といかなる相互作用をしているかは明確ではない。この点については、本稿で記載したピルビン酸を含む α ケト酸による調節とは異なるメカニズムや未知の因子群が関与している可能性も考えられ、今後の大きな課題である。

5. おわりに

AOX研究は、歴史的にみれば初期の段階においては、高い発熱量を示す発熱植物を対象としたものが多かったが、現在の研究対象は、発熱植物に限らず、幅広い植物種や原生生物さらには菌類まで多岐にわたっている。特に、長く不明であったAOXの結晶構造がトリパノソーマ由来のAOXを用いて解き明かされたことは、その分子メカニズムを考える上で大きなインパクトを持つものである。一方、植物のAOXの中にはピルビン酸のような代謝産物に反応してその活性を制御できる分子種もあり、これは、AOX活性が当該タンパク質を発現している細胞における代謝と密接に関連していることを物語っている。発熱植物においては、これまではAOXの機能そのものに焦点を当てた研究が数多く行われてきたが、今後はAOXが触媒する反応に関わる基質である還元型ユビキノンの供給メカニズムや、関連する代謝産物の網羅的解析⁴²⁾など、より複眼的な研究を推進する必要がある。今後、種々の生物種を対象としたAOX研究がさらに進展し、AOXを介した呼吸調節メカニズムの理解がより深まることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した*A. maculatum*を用いた解析結果は、英国サセックス大学のAnthony Moore教授との共同研究により得られたものです。また、発熱植物を用いた

解析結果は、これまで研究室に在籍した大学院生、学部学生、研究員、研究補助員の方々の尽力により得られたものです。この場を借りて御礼申し上げます。

Received March 3, 2014, Accepted March 5, 2014,
Published April 30, 2014

参考文献

- Moore, A.L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. (2013) Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 637-663.
- McDonald, A.E. (2009) Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us? *Physiol. Plant.* 137, 328-341.
- Vanlerberghe, G.C. (2013) Alternative oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6805-6847.
- Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D.K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E.O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, A.L., Harada, S. and Kita, K. (2013) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 4580-4585.
- Affourtit, C., Krab, K., and Moore, A.L. (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 58-69.
- Jacoby, R.P., Taylor, N.L. and Millar, A.H. (2011) The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* 16, 614-623.
- Meeuse, B.I.J. (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26, 117-126.
- Hachiya, T. and Noguchi, K. (2011) Integrative response of plant mitochondrial electron transport chain to nitrogen source. *Plant Cell Rep.* 30, 195-204.
- Rasmusson, A.G., Fernie, A.R. and van Dongen, J.T. (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol. Plant.* 137, 371-382.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1997) Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703-734.
- Van Herk, A.W.H. and Badenhuizen, N.P. (1934) Respiration and catalase action in the *Sauromatum spadix*. *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* 37, 99-105.
- Okunuki, K. (1939) Über den Gaswechsel der Pollen. II. *Acta Phytochim.* 11, 27-64.
- James, W.O. and Elliott, D.C. (1955) Cyanide-resistant mitochondria from the spadix of an *Arum*. *Nature* 175, 89.
- Bendall, D.S. and Bonner, W.D. (1971) Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 47, 236-245.
- Schonbaum, G.R., Bonner, W.D., Storey, B.T. and Bahr, J.T. (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.* 47, 124-128.
- Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T. and Yoshimoto, A. (1990) Essential role of ferrous iron in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* 267, 114-116.
- Berthold, D.A. and Siedow, J.N. (1993) Partial purification of the cyanide-resistant alternative oxidase of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) mitochondria. *Plant Physiol.* 101, 113-119.
- Bonner, W.D., Clarke, S.D. and Rich, P.R. (1986) Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria. *Plant Physiol.* 80, 838-842.
- Elthon, T.E. and McIntosh, L. (1986) Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. *Plant Physiol.* 82, 1-6.
- Berthold, D.A., Voevodskaya, N., Stenmark, P., Graslund, A. and Nordlund, P. (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center. *J. Biol. Chem.* 277, 43608-43614.
- Siedow, J.N., Umbach, A.L. and Moore, A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.* 362, 10-14.
- Andersson, M.E. and Nordlund, P. (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett.* 449, 17-22.
- Matsukawa, K., Kamata, T. and Ito, K. (2009) Functional expression of plant alternative oxidase decreases antimycin A-induced reactive oxygen species production in human cells. *FEBS Lett.* 583, 148-152.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J. and Punta, M. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42, D222-230.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A. M., Rauch, G.S. and Siedow, J.N. (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria - Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* 273, 30750-30756.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. and Justine, Y.H.Y. (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* 10, 1551-1560.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Ito-Inaba, Y., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Otsuka, M., Koiwa, H. and Ito, K. (2007) Pyruvate-sensitive AOX exists as a non-covalently associated

- dimer in the homeothermic spadix of the skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *FEBS Lett.* 581, 5852-5858.
28. Crichton, P.G., Affourtit, C., Albury, M.S., Carré, J.E. and Moore, A.L. (2005) Constitutive activity of *Sauromatum guttatum* alternative oxidase in *Schizosaccharomyces pombe* implicates residues in addition to conserved cysteines in alpha-keto acid activation. *FEBS Lett.* 579, 331-336.
 29. Crichton, P.G., Affourtit, C., Albury, M.S., Carré, J.E. and Moore, A.L. (2004) Regulation of the plant alternative oxidase by pyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 164-164.
 30. Knutson, R.M. (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science* 186, 746-747.
 31. Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Koiwa, H. and Ito, K. (2008) Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiol.* 146, 636-645.
 32. Seymour, R.S. and Blaylock, A.J. (1999) Switching off the heater: influence of ambient temperature on thermoregulation by eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *J. Exp. Bot.* 50, 1525-1532.
 33. Onda, Y. and Ito, K. (2005) Changes in the composition of xylem sap during development of the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1156-1161.
 34. James, W.O. and Beevers, H. (1950) The respiration of *Arum* spadix. A rapid respiration, resistant to cyanide. *New Phytol.* 49, 353-374.
 35. Ito, K., Ogata, T., Kakizaki, Y., Elliott, C., Albury, M. S. and Moore, A.L. (2011) Identification of a gene for pyruvate-insensitive mitochondrial alternative oxidase expressed in the thermogenic appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol.* 157, 1721-1732.
 36. Wagner, A.M., Krab, K., Wagner, M.J., and Moore, A.L. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 993-1000.
 37. Grant, N., Onda, Y., Kakizaki, Y., Ito, K., Watling, J. and Robinson, S. (2009) Two cys or not two cys? That is the question; alternative oxidase in the thermogenic plant sacred lotus. *Plant Physiol.* 150, 987-995.
 38. Wagner, A.M., Wagner, M.J. and Moore, A.L. (1998) In vivo ubiquinone reduction levels during thermogenesis in araceae. *Plant Physiol.* 117, 1501-1506.
 39. Kamata, T., Matsukawa, K., Kakizaki, Y. and Ito, K. (2009) In vivo redox state of the ubiquinone pool in the spadices of the thermogenic skunk cabbage, *Symplocarpus renifolius*. *J. Plant Res.* 122, 645-649.
 40. Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K. and Hisabori, T. (2013) Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 54, 875-892.
 41. Kakizaki, Y., Moore, A.L. and Ito, K. (2012) Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* 445, 237-246.
 42. Ito, K., Takahashi, H., Umekawa, Y., Imamura, T., Kawasaki, S., Ogata, T., Kakizaki, Y. and Seymour, R. S. (2013) Metabolite profiling reveals tissue- and temperature-specific metabolomic responses in thermoregulatory male florets of *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Metabolomics* 9, 919-930.

Structure and Function of the Mitochondrial Cyanide-Insensitive Alternative Oxidase (AOX)

Kikukatsu Ito*

Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University