

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18488

研究課題名(和文)呼吸鎖末端酸化酵素シトクロム bd の基質複合体構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of cytochrome bd oxidase complex with substrate

研究代表者

仲庭 哲津子(Nakaniwa, Tetsuko)

大阪大学・たんぱく質研究所・特別研究員(RPD)

研究者番号：80569070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は呼吸鎖電子伝達系の主要な膜蛋白質群である膜蛋白質複合体シトクロムbd (Cytbd)と基質との新規な複合体構造を高分解能で決定し、低酸素条件下という特異的な環境で働くCytbdの電子伝達機構の詳細を原子レベルで解明することである。本研究では基質との高品質共結晶の作製と得られた高品質結晶の損傷を抑えた回折強度測定に向けた解決策を実施し、最高回折分解能4.8Å分解能の回折強度データを収集することが出来た。その回折強度データを収集し、分子置換による初期位相の決定ならに構造構築、精密化を行ったが、基質部分の電子密度部分など新規な構造知見を得るには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The cytochrome bd oxidases (Cytbd) are terminal oxidases that reduce molecular oxygen to water, avoiding the production of reactive oxygen species. In addition to their contribution to the proton motive force, they mediate viability under oxygen-related stress conditions. Here I aimed at the decision of the Cytbd complex structure with substrate. In this study, I made cocrystal of high quality and carried out the X-ray measurement that held the damage of the crystal. As a result, I succeeded in collecting the data of the highest resolution of 4.8Å. It was determined in the initial phase by molecular replacement and then carried out the structure construction and refinement. However, it was not possible to obtain a novel structure knowledge.

研究分野：構造生物学

キーワード：呼吸鎖電子伝達系 シトクロム末端酸化酵素 構造生物学 結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

生物のエネルギー代謝で ATP の多くを産生する中心部では細胞膜に埋まったいくつかの膜蛋白質が働く。この膜蛋白質の集合体を呼吸鎖電子伝達系と呼ぶ。呼吸鎖電子伝達系は呼吸鎖複合体の電子伝達の酸化還元反応によって遊離されるエネルギーを用い、ADP と無機リン酸から ATP を合成する反応であり、真核細胞内のミトコンドリア内膜あるいは原核細胞の形質膜においてみられる。これらの細胞膜では、電子伝達系によって膜の内外のプロトンの電気化学ポテンシャル差が形成され、これを利用して ATP 合成酵素が ATP を合成する。近年の X 線構造解析技術の進歩により、真核生物のミトコンドリアの呼吸鎖は 3.5Å 以上の原子分解能で構造決定されている (R. Baradaran *et al.* Nature (2013), S. Iwata *et al.* Science (1998), G. Kurisu *et al.* Science (2003), T. Tsukihara *et al.* Science (1996))。ミトコンドリアの呼吸鎖は複合体 (NADH 脱水素酵素複合体), 複合体 (シトクロム *bc₁* 複合体), 複合体 (シトクロム酸化酵素複合体) の 3 種の疎水性の高い膜蛋白質で構成される。また、生体膜中には移動可能な電子運搬体(ユビキノン, シトクロム *c*)があり、これを使って NADH から複合体 ユビキノン, 複合体 シトクロム *c*, 複合体 ,そして分子状酵素の順に酸化還元電位に従って電子の流れが起こる。この電子伝達系の過程に共役して、これらの呼吸鎖複合体はプロトンを膜間腔に汲み出す。このプロトンの電気化学ポテンシャル差を駆動力として、複合体 (ATP 合成酵素)により、ATP が合成される(図 1)。この反応機構はミトコンドリアだけでなくバクテリアなど他の生物でもごく基本的な仕組みは同じである。さらに呼吸鎖の膜蛋白質群はすでに全ての立体構造が明らかになっていると思われがちであるがそうではない。実は、近年の生物ゲノム解析より、ヒトのミトコンドリアには一組の呼吸鎖酵素群()しか存在していないのに対して、バクテリアの呼吸鎖は複数の末端酸化酵素を保持していることがわかってきた。すなわち、バクテリアは複数の多様な電子伝達経路を通気や栄養条件など生育環境に応じて使い分けることによって生存していると考えられる。そこで本研究では、このバクテリアに特異的な末端酸化酵素に注目し、その中でも呼吸鎖の主要な膜蛋白質群の中で唯一構造が明らかになっていないシトクロム *bd* 型キノール酸化酵素(以下、Cyt*bd* 複合体)に着目し、その結晶構造の決定を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、呼吸鎖電子伝達系の主要な膜蛋白質群の中で唯一結晶構造が明らかにされていない膜蛋白質複合体 Cyt*bd* の基質との新規な複合体構造を決定し、低酸素条件下と

いう特異的な環境で働く Cyt*bd* の電子伝達機構の詳細を原子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究最大の課題は、Cyt*bd* 複合体結晶の高分解能化である。本研究計画では結晶の高品質化に向けた対策を実施する。膜タンパク質の結晶化成功の鍵を握っているのが界面活性剤の選択である。そこで界面活性剤の選抜はイオン交換カラムでの脱離をさけるため、非イオン性界面活性剤を中心に 8 種類選抜し、基質を加えた結晶化サンプルを用いてスクリーニングを行う。また Cyt*bd* 複合体のさらなる均一化を目的としたアフィニティタグ導入による結晶作製、高品質結晶の損傷を抑えた回折強度データ測定、さらには得られた結晶を用いて新規な脱水法や高圧凍結方法などを実施する。また耐熱性シアノバクテリア発現系を用いた新規なコンストラクトによる結晶性の改善を並行して実施する。以上の工程より、現結晶を上回る高分解能結晶を探索する。全ての系で得られた結晶の善し悪しは回折強度データの分解能によって判断する。最終的には位相決定用の重原子データ収集を進め、native データをもとに重原子同形置換法により巨大な膜蛋白質複合体の構造解析を完遂する。しかしながら、現結晶が高分解能化出来るという保証はない。そこで、上記研究と並行して、現 6 分解能結晶の回折強度データを用いた位相決定を進め、新規 Cyt*bd* 複合体構造の決定を目指す。

4. 研究成果

先行研究において申請者は、すでに Cyt*bd* 複合体の結晶を得ており、6Å 分解能の回折強度データを収集しているが、詳細な反応メカニズムの解明には、基質結合部位のより高分解能での構造決定が必須である。しかしながら、申請者が精力的に Cyt*bd* 複合体結晶の分解能の向上に努めていた矢先、Cyt*bd* 単体の結晶構造決定が欧州のグループよりなされた。そこで、本研究では基質との複合体結晶のさらなる高分解能構造決定 (3Å 分解能以上) を目指し、基質との高品質共結晶の作製ならびに、得られた高品質結晶の損傷を抑えた回折強度測定に向けた解決策 (下記 (1)-(6)) を実施した。まずは (1) 結晶の分子パッキング向上を目指した LCP 法による結晶化を行った。その結果、微結晶を得ることに成功し (図 1)、大型放射光施設 SPring-8 にて回折測定を試みたところ、8.0 Å 分解能のデータを得るに留まった。次に (2) 高品質結晶を損傷することなく回折強度データ測定を行うための結晶凍結方法と

して高圧凍結法を実施したが、通常の凍結作業と同等程度 (6.0 Å 分解能) と大きな改善は見られなかった。(3) 凍結方法の改善として回折データ測定時の新規な脱水法を試した。この方法は結晶を水溶性高分子の水溶液中でコーティングした状態で、回折装置にマウントした後、湿度を調整したガスを吹き付ける新規な脱水法 (HAG 法) である。HAG 法を行ったところ、本結晶の水分含量が非常に高く脱水操作後には回折点が得られず、温度や時間などの条件検討を行ったが改善されなかった。次に、(4) 生物種変更による新たな結晶系の作製を進めた。一般に結晶の高分解能化には耐熱性酵素を用いると結晶中の分子パッキングが向上し、結晶成長に効果的な場合がある。生物種変更はシアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の耐熱性 Cytbd 複合体の大量発現系の構築、発現検討を行った。しかしながらごく少量の発現しか示さず、結晶化を行える量の生産には条件検討の未至らなかつた。耐熱性シアノバクテリアの発現検討と並行して、(5) 8 種の界面活性剤のスクリーニングを実施し、得られた結晶を用いて回折測定を行ったところ、Cymal 系の界面活性剤の結晶で分解能が 6.0 Å から 5.5 Å まで向上した。そこで(6) Cymal 系の界面活性剤の結晶を量産し、再結晶化に取り組むことで、より純度の高い結晶の作製を目指した。その結果、安定的に 5.5 Å 分解能の結晶を得ることに成功した。そこで得られた結晶は回折データ測定時の扱いによる損傷を回避するために、抗凍結剤の最適化ならびに結晶凍結時の脱水法の検討を重ねた。その結果、結晶凍結時の脱水効果で基質複合体結晶の最高回折分解能は最終的に 6.0 Å から 4.8 Å へ向上した (図 2)。その回折強度データを収集し、分子置換による初期位相の決定ならびに構造構築、精密化を行った。しかしながら基質部分の電子密度部など新規な構造知見を得るには至らなかつた。

図 1 LCP 結晶

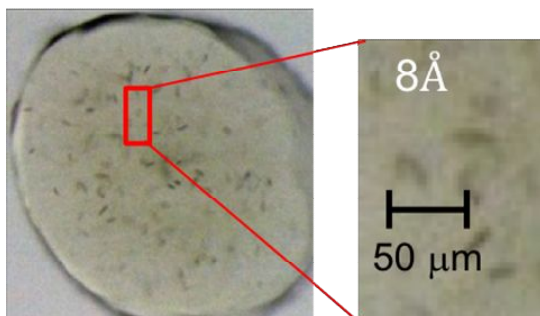
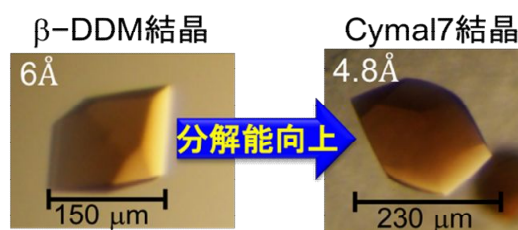


図 2 界面活性剤のスクリーニングおよび再結晶化による Cytbd 結晶の高分解能化



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Takao H, Hirabayashi K, Nishigaya Y, Kouriki H, Nakaniwa T, Hagiwara Y, Harada J, Sato H, Yamazaki T, Sakakibara Y, Suiko M, Asada Y, Takahashi Y, Yamamoto K, Fukuyama K, Sugishima M, Wada K.
A substrate-bound structure of cyanobacterial biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity. *Nature Commun.* 8: 14397, 2017. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

伏見こころ、仲庭哲津子、武藤梨沙、安田亜矢、安藤俊介、田中秀明、大岡宏造、栗栖源嗣、タイプ 1 型光合成反応中心の X 線結晶構造解析、「第 25 回 光合成セミナー 2017: 反応中心と色素系の多様性」, 2017 年 7 月 15~16 日, 兵庫県神戸市, 神戸大学

仲庭哲津子、Ratana

Charoenwattanasatien、乗岡尚子、東田怜、山野奈美、狩野竜一、藤原健太郎、大滝宏代、田中秀明、藤井律子、栗栖源嗣、深所型緑藻における新規光合成アンテナの再構成法の確立、「第 25 回 光合成セミナー 2017: 反応中心と色素系の多様性」, 2017 年 7 月 15~16 日, 兵庫県神戸市, 神戸大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲庭 哲津子 (NAKANIWA TETSUKO)
大阪大学蛋白質研究所・学振 RPD 特別研究員
研究者番号: 80569070

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者
無し

(4) 研究協力者
栗栖 源嗣 (KURISU GENJI)
大阪大学蛋白質研究所・教授
研究者番号：90294131

田中 秀明 (TANAKA HIDEAKI)
大阪大学蛋白質研究所・准教授
研究者番号：40346169