

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20829

研究課題名(和文)常磁性プローブを用いた呼吸鎖における電子伝達機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of respiratory electron transport chain using the paramagnetic probes

研究代表者

齋尾 智英(SAIO, Tomohide)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：80740802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のエネルギー通貨として生命になくてはならないATPを合成する酸化的リン酸化においては、複数のタンパク質を介した電子伝達機構が重要な役割を担う。その電子伝達の最終段階を担うのがシトクロム c (Cyt c)-シトクロム c オキシダーゼ (CcO) 複合体である。本研究ではCyt c-CcOによる電子伝達の分子メカニズムを明らかにするために、常磁性効果や緩和分散法などを活用した最先端のNMR法を主体とした戦略により取組んだ。その結果、酸化・還元状態に依存したCyt cの立体構造変化が明らかになり、酸化・還元状態に依存したCcOとの相互作用の制御のメカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Electron transfer (ET) process is at the heart of a number of key physiological processes, such as aerobic and anaerobic respiration. Among them, ET from Cytochrome c (Cyt c) to Cytochrome c oxidase (CcO) in mitochondrial respiration is one of the best-studied processes. In this project, we took an NMR-based approach exploiting paramagnetic effects and relaxation dispersion method, and redox-dependent structural and dynamical changes of human Cyt c were investigated. Our study identified significant redox-dependent structural changes in several regions of Cyt c. These differences would be essential for the discrimination of the redox states in Cyt c by CcO during the electron transfer. Dynamics studies by NMR identified that the region around His33 undergoes conformational exchanges, suggesting that the dynamic property of the region located far from the binding site for CcO contributes to the conformational changes upon the electron transfer.

研究分野：構造生命科学

キーワード：呼吸鎖 電子伝達 NMR 立体構造 ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

生体内のエネルギー通貨として生命になくてはならない ATP を合成する酸化的リン酸化においては、複数のタンパク質を介した電子伝達機構が重要な役割を担う。その電子伝達の最終段階を担うのがシトクロム *c* (Cyt *c*)-シトクロム *c* オキシダーゼ (CcO) 複合体である (Fig. 1)。CcO は酸素から水への還元反応と共役させてプロトンを膜外へと汲み出し、プロトン勾配を作り出す。そのプロトン駆動力を利用して ATP 合成酵素が ADP + Pi を ATP に変換する (Fig. 1)。このように Cyt *c*-CcO による電子伝達は生命活動の根幹をなす重要な機構であるにも関わらず、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかにされていない。特に、「どのようにして Cyt *c* の酸化還元状態が見分けられ、結合が制御されているのか？」や「Cyt *c* から CcO へと、2 つのタンパク質間でどのように電子が受け渡されるのか？」などの重要な問題が未解明のまま残されている。約 10 kDa の可溶性タンパク質である Cyt *c* はヘムを持ち、ヘムの中心に保持される鉄イオンによって電子の受け取り・放出を行う。ヘム中の鉄の電子状態によって Cyt *c* は酸化状態と還元状態の 2 状態をとる。Cyt *c*-CcO 間の電子伝達とその制御のメカニズムを解明するためには、Cyt *c* や CcO に対する立体構造解析、相互作用解析、複合体立体構造解析などを酸化・還元の状態に対して行い、酸化還元依存的な制御について情報を得ることが必要になる。

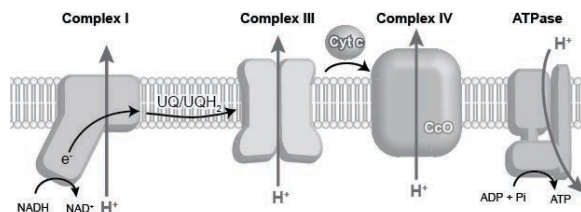


Fig. 1 呼吸鎖における電子伝達の模式図。NADH の酸化によって供給された電子は複数の分子を介して CcO へと伝達される。その最終段階を担うのが Cyt *c*-CcO 複合体である。

Cyt *c* に対する立体構造解析は歴史が古く、これまでも複数の立体構造が報告されているが、酸化・還元状態における立体構造や運動性の変化については十分に議論されていなかった。溶液中において、同じ生物種由来の Cyt *c* に対して精度の高い立体構造解析を行い、酸化・還元状態に依存した立体構造や運動性の変化を明らかにすることが必要とされていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト Cyt *c* に対する NMR 立体構造解析・ダイナミクス解析によって、どのようにして Cyt *c* の酸化状態・還元状態の差異が見分けられているのか、その詳細なメカニズムを解明することを目的とし、研究を遂行した。

3. 研究の方法

安定同位体標識されたヒト Cyt *c* を大腸菌発現系によって調製した。酸化状態ならびに還元状態のそれぞれに対して同一の溶液条件、温度条件で NMR 測定を行った。

立体構造解析のために、600 MHz または 800 MHz NMR 装置を使用し、各種三重共鳴測定、3次元 NOESY 測定を行った。NMR 測定から得られた NOE 情報から距離の束縛条件を取得し、化学シフト情報に基づいた二面角予測プログラム TALOS+ の計算により二面角の束縛条件を取得した。酸化状態 Cyt *c* はヘム中の鉄イオンが 3 価となり常磁性を示し、タンパク質中の観測核に由来する NMR 信号は常磁性シフトを含んだ値になる。この常磁性シフトは常磁性中心からの空間的な位置情報を持っているため、立体構造解析に有効な情報を与えうるが、一方で二面角の情報を得るためには常磁性効果の影響を取り除いた化学シフト値を得る必要がある。そこで磁化率テンソル解析を行い、

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{ox}} - \delta_{\text{red}} = \delta_{\text{CS}} + \delta_{\text{PCS}} + \delta_{\text{D}}$$

によって常磁性効果の影響を取り除いた反磁性の化学シフト (δ_{D}) を算出した。得られた束縛条件に基づいて、構造計算プログラム CYANA によって立体構造計算を行った。

タンパク質の運動性やコンフォメーション平衡を調べるために、NMR 緩和分散法を適用した。800 MHz NMR 装置を用い、6°C にて測定を行った。

CcO との相互作用部位、相互作用様式を調べるために、NMR 滴定実験を行った。安定同位体標識された Cyt *c* に CcO を滴定し、Cyt *c* の NMR 信号における摂動を観測した。

4. 研究成果

還元状態の Cyt *c* の立体構造は 1890 個の距離情報と 58 個の二面角情報に基づいて計算され、主鎖 RMSD 0.49 Å で決定された。酸化状態の Cyt *c* の立体構造は 1833 個の距離情報と 65 個の二面角情報に基づいて計算され、主鎖 RMSD 0.58 Å で決定された (Fig. 2)。

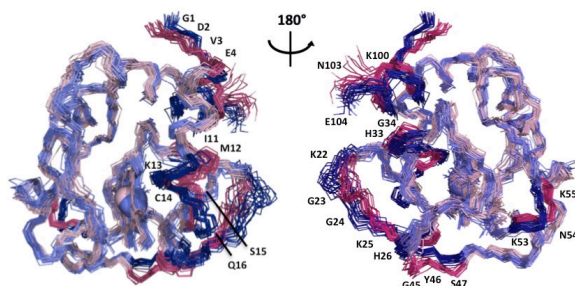


Fig. 2 Cyt *c* の溶液立体構造。酸化状態 Cyt *c* (青) と還元状態 (ピンク) の重ね合わせ。それぞれ 20 個の立体構造を重ね合わせている。

全体構造は酸化状態・還元状態で共通しているものの、いくつかの領域において酸化還元状態に依存した立体構造の差異が観測された (Fig. 3). 特に loop 3 (残機番号 23-28) から

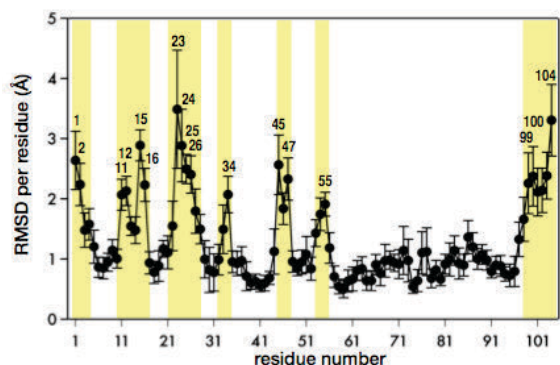


Fig. 3 酸化状態と還元状態の立体構造の差. 主鎖 RMSD を残機番号に対してプロットしている.

は最も大きな差がみられ、酸化還元状態に依存した立体構造変化が示唆された. Loop 3 は、酸化状態と還元状態の反磁性化学シフトの比較においても大きな差が観測されており、決定された立体構造における局所構造の差をサポートしている (Fig. 4). Loop3 の領域は、先行研究によって CcO との相互作用面に位置していることが示されていることから、酸化還元状態に依存した loop 3 の立体構造変化が CcO との相互作用の制御に重要であると考えられる. CcO との相互作用面においては loop 3 以外の領域からも化学シフト変化が観測されており、相互作用面の広範な領域においても、酸化還元状態に依存した局所構造や運動性の変化が起こる可能性が示唆された (Fig. 4).

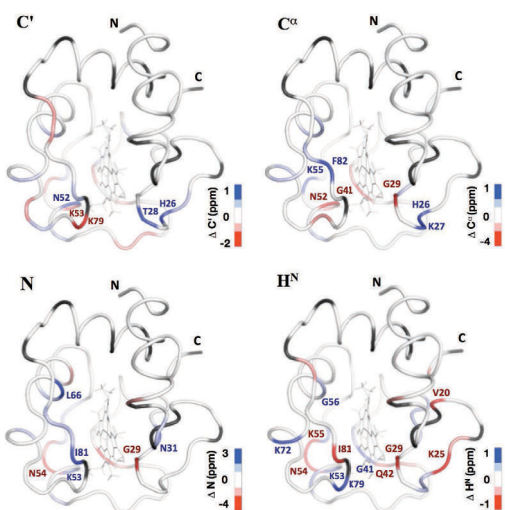


Fig. 4 酸化状態と還元状態での化学シフト差. 酸化状態の化学シフトについては、常磁性シフトの影響を差し引いた反磁性化学シフトを用いて比較されている.

酸化還元状態に依存したダイナミクスの変化を検証するために、緩和分散法を用いた解析を行った. その結果、Cyt *c* の特定の領域に位置する残基において、化学交換に由来する緩和速度の増加 (R_{ex}) が顕著に観測され、

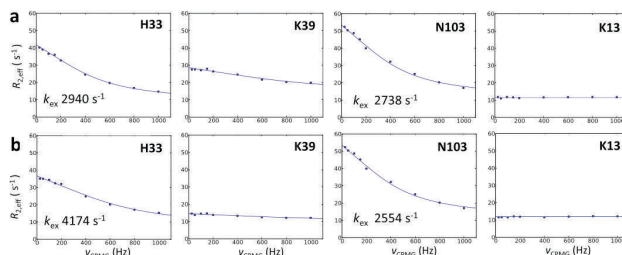


Fig. 5 還元状態 Cyt *c* (a) と酸化状態 Cyt *c* (b) に対する緩和分散解析.

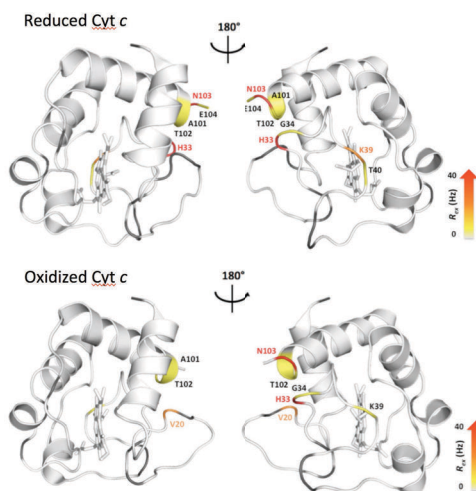


Fig. 6 化学交換による緩和速度の増分 R_{ex} のマッピング.

その領域において ms~ μ s のタイムスケールでの立体構造ゆらぎが存在することが示唆された (Fig. 5, 6). CcO との相互作用面である Cyt *c* の“前面”においては酸化・還元いずれの状態においても R_{ex} が観測されず、その領域が比較的にリジッドな状態にあることが示唆された. ゆらぎが観測された領域は CcO との相互作用面からは外れた Cyt *c* の“側面”に位置していた. この領域は酸化還元状態に依存した立体構造変化が観測され (Fig. 3), また先行研究においては、還元状態の Cyt *c* について CcO との相互作用による化学シフト変化があることが示されていたことから、Cyt *c* 側面の領域における ms~ μ s の立体構造ゆらぎが酸化還元状態に依存した CcO との相互作用に制御に参与する可能性が示唆された.

さらに本研究では、Cyt *c*-CcO 複合体の立体構造情報取得のための手法確立にも取り組んだ. 特に常磁性ランタノイドイオンを用いた NMR と ESR によって長距離間の立体構造情報を取得するための手法の確立を進めた. 今後、この常磁性ランタノイドイオンから得られる長距離情報を活用した Cyt *c*-CcO 複合体の立体構造解析の進展が期待される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① Wataru Sato, Seiji Hitaoka, Kaoru Inoue, Mizue Imai, Tomohide Saio, Takeshi Uchida, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Kazunari Yoshizawa and Koichiro Ishimori, Energetic Mechanism of Cytochrome *c*-Cytochrome *c* Oxidase Electron Transfer Complex Formation under Turnover Conditions Revealed by Mutational Effects and Docking Simulation, *J Biol Chem*, 査読有, 291, 2016, 15320-15331, doi: 10.1074/jbc.M115.708065.

② Mizue Imai, Tomohide Saio, Hiroyuki Kumeta, Takeshi Uchida, Fuyuhiko Inagaki, Koichiro Ishimori, Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome *c*, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 469, 2016, 978-984, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.079.

〔学会発表〕(計 4 件)

① 平松 蒼野, パルス ESR とガドリニウムタグを用いたマルチドメイン蛋白質 MurD の構造変化解析, 化学系学協会北海道支部 2017 年冬季研究発表会, 2017 年 1 月 18 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

② 今井 瑞依, ミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム *c*-シトクロム *c* 酸化酵素複合体における電子伝達反応の構造制御機構, 第 15 回 日本蛋白質科学会年会, 2016 年 6 月 24 日~2016 年 6 月 26 日, あわぎんホール (徳島県徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋尾 智英 (SAIO, Tomohide)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号: 80740802