

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21295

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系超複合体形成は末端酵素の反応性に影響を与えるか？

研究課題名(英文) Does the mitochondrial respiratory supercomplex formation affect the reactivity of the respiratory terminal oxidase?

研究代表者

柳澤 幸子 (YANAGISAWA, SACHIKO)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：60557982

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)：ミトコンドリア呼吸鎖複合体は各複合体が一定比率で集合した「超複合体」を形成する。超複合体形成が呼吸鎖末端酸化酵素(CcO)の活性中心の電子状態に与える影響を振動分光法により調べ、超複合体形成の意義を化学反応性の観点から明らかにする事を目的とした。単独で存在するCcOと超複合体形成時の共鳴ラマンスペクトルを比較し、活性中心の電子状態に違いがあるか調べた。還元型とCO型の超複合体のラマンスペクトルから、鉄-Hisと鉄-COの伸縮振動を検出した。CO型において極めて微小な振動数とスペクトルの違いが見出され、ここでの構造変化は、調節因子の結合時に見られる活性の上昇を伴う構造変化とは異なる事が示された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial respiratory supercomplex consists of respiratory complexes with a constant rate. Implication of the respiratory supercomplex formation for reactivity has been considered through investigation of the heme electronic states of the respiratory terminal oxidase (CcO) by vibrational spectroscopy. Resonance Raman spectra of supercomplex, CcO monomer and the mixture of the supercomplex components have been compared to see if there are any difference in their electronic states. In those of reduced form and fully reduced CO-bound form in supercomplex, vibrational modes of Fe-His and Fe-CO were observed. It has been suggested that this tiny structural alteration observed in the supercomplex formation is different from the one accompanying elevation of reactivity through binding of regulatory factor to CcO.

研究分野：生物物理

キーワード：呼吸鎖超複合体 ミトコンドリア 呼吸鎖電子伝達系 チトクロム酸化酵素 振動分光法

1. 研究開始当初の背景

<チトクロム酸化酵素>チトクロム酸化酵素(CcO)はミトコンドリア内膜にある呼吸鎖電子伝達系末端酸化酵素で、4つの酸化還元中心(Cu<sub>A</sub>, ヘム a, ヘム a<sub>3</sub>, Cu<sub>B</sub>)をもち、酸素還元反応と膜を隔てたプロトン(H<sup>+</sup>)能動輸送反応を共役して行う(図1)。形成されたH<sup>+</sup>濃度勾配(ΔμH<sup>+</sup>)を利用しATP合成酵素が働き、またΔμH<sup>+</sup>が十分あれば酸素還元反応がおきないという呼吸調節機構がある。この呼吸調節機構も、酸素還元とH<sup>+</sup>ポンプの共役機構も不明である。CcOの巧みな調節機構のトリガーは蛋白質の構造変化であると考えられる事から、最近その存在が報告された、呼吸鎖複合体が一定の割合で集合した「超複合体」形成は蛋白質構造に影響し、CcOの反応性を調節しうるのではないかと考えた。

<超複合体>ミトコンドリア呼吸鎖複合体はそれぞれ膜中で独立に在ると考えられてきたが、超複合体の存在が2000年に報告され(Schäggerら, *EMBO J.* 2000, 19, 1777-)、19Å分解能の電子顕微鏡構解析の報告もある(Althoffら, *EMBO J.* 2011, 30, 4652-)。この超複合体の構造を単離精製された各複合体の結晶構造と比べると完全には一致しない。特にCcOでは結晶構造で二量体形成上重要なサブユニットVIbの構造が異なっている(図2)。また、超複合体の組成としてCcOが2つよりも1つの方が安定で牛心筋由来の超複合体は複合体I:複合体III:複合体IVの割合が1:2:1あるものが最も多く存在することが報告されている。報告された超複合体構造の分解能の低さを考慮する必要はあるが、複合体間、または超複合体形成に必要な脂質や蛋白質との相互作用が、各複合体の構造を変えることは十分起こりうる。一方、超複合体形成の理由は不明である。

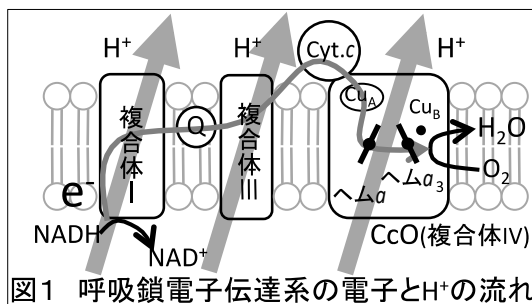
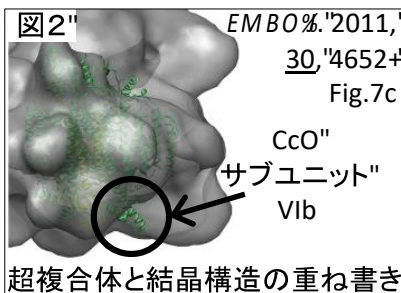


図1 呼吸鎖電子伝達系の電子とH<sup>+</sup>の流れ



※本研究が始まってから2016年に4Å分解能の構造が報告された。(Wuら, *Cell*,

2016,167, 1598-)

以下は本研究に関わるCcOの反応および構造研究を示す。

<酸素還元反応中間体>1993年、反応開始から種々の時刻のCcOの可視共鳴ラマンスペクトルをもとにヘム鉄と基質である酸素の結合様式が決定された(Oguraら, *JACS*, 1993, 115, 8527-)。それは酸素還元中心であるヘム a<sub>3</sub>の配位構造が、Fe<sup>2+</sup> + O<sub>2</sub> → Fe<sup>2+</sup> · O<sub>2</sub> → Fe<sup>5+</sup> = O → Fe<sup>4+</sup> = O → Fe<sup>3+</sup> · OH → Fe<sup>3+</sup>と変化するというものである。

<結晶構解析>ウシ心筋CcOの最初のX線結晶構造は1995年にTsukiharaらによって2.8Å分解能で報告された(*Science*, 1995, 269, 1069-)。その後、種々の状態についてより高分解能のX線結晶構造が報告され、H<sup>+</sup>ポンプ経路が提案された(Yoshikawaら, *Science*, 1998, 280, 1723-他)。分解能を上げる努力はその後も続いている。

<時間分解構解析>CcOは高品質結晶調製法が確立されている数少ない膜蛋白質の1つで、X線自由電子レーザーによる時間分解X線結晶構造解析実験も進められている(SACLA課題番号2014A8036)。初の無損傷X線結晶構造が1.9Å分解能で報告された(Hirata, Shinzawa-Itoら, *Nat. Methods*, 2014, 11, 734-)。一方、高輝度高感度赤外分光装置が開発され、水溶液中CcOの一酸化炭素(CO)光解離に伴う時間分解赤外分光解析が報告された(Kuboら, *JBC*, 2013, 288, 30259-)。CcOにおける酸素還元反応の時間分解赤外分光測定が行われ酸素還元反応に共役するプロトンポンプ機能の解明を目指した研究がおこなわれている。

このようにCcOは結晶構造解析と振動分光解析の両手法において盛んに研究がなされており、複雑系の研究を行う上で多くの基本情報が蓄積されている。

2. 研究の目的

ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系末端にあるチトクロム酸化酵素(CcO)は、膜への再構成や膜電位の存在、溶液のpH等蛋白質を取り巻く環境の変化が、蛋白質内部にある活性中心の電子状態に影響する事がこれまでの研究で示唆されている。一方、呼吸鎖複合体が一定比率で集合した「超複合体」の電子顕微鏡構解析は、超複合体中CcOの構造は単離精製した結晶中とは異なる事を示した。本研究では呼吸鎖超複合体形成がCcOの活性中心の電子状態にどのような影響を与えるのか、振動分光法により調べ、呼吸鎖超複合体形成の意義を化学反応性の観点から明らかにしたい。

<着眼点-CcOの活性中心構造>CcOのX線結晶構造はヘム鉄の酸化還元またはCO等の配位子の結合によりヘム側鎖やヘム近傍のα-helix構造が異なる事を示した(Tsukiharaら, *PNAS*, 2003, 100, 15304-他)。この事を支持する結果が時間分解共鳴ラマン分光法によっても検出された。すなわち、CO光解離後時間

経過とともにヘム側鎖のラマンバンドと、ヘム鉄と軸配位子ヒスチジンの結合に由来するラマンバンド( $\nu\text{Fe-His}$ )が変化し、ヘモグロビン研究で報告された酸素親和性に換算すると100倍の変化に相当する(Oguraら、未発表データ)。特にこのHisは上述の $\alpha$ -helix上に在り、酸素の結合やヘムの電子状態を蛋白質に直接伝播出来る。ところで、この $\nu\text{Fe-His}$ はCcOがおかれた環境によっても変化する事を申請者は見いだした。可溶化CcOについて吸収スペクトルが可逆的な範囲でpHを変えると、 $\nu\text{Fe-His}$ のラマンシフト値とラマン強度に影響があった(未発表データ)。また、CcOをリン脂質二重膜に再構成して膜電位を設けると、 $\nu\text{Fe-His}$ の強度やヘム側鎖のラマンバンドが異なる事がわかった(Nomuraら、*Biochemistry*, 2014, 53, 6382-)。ヘムは蛋白質中に埋もれているが、ヘムとは直接相互作用しない蛋白質表面の構造変化が引き金となり、CcOの反応性を決めるヘム周辺の蛋白質構造の変化を導くと考えられる。超複合体形成はCcO単独に存在する場合には存在しない相互作用が形成されるため、CcOのヘム近傍構造、ひいてはヘムの反応性にも影響を与えうると考えた。実際、電子顕微鏡構造解析が単独の結晶構造解析とは異なる構造を示しており(図2)、超複合体形成の意義はCcOの反応性という観点でも調べる必要がある。生理的条件に近い超複合体形成時のCcOの構造および反応性を理解する事はCcO反応の調節機構を理解する上でも重要と言える。

### 3. 研究の方法

CcOについて、単独で存在する場合と超複合体形成時で共鳴ラマンスペクトルを比較し、活性中心であるヘムの電子状態に違いがあるか調べた。これまでに超複合体のラマンスペクトルの報告は無いので測定条件の検討からはじめた。ここで言う測定条件とは、ラマンスペクトルが測れる波長や溶液の条件で、なおかつ、測定を通して超複合体が形成されたままであり、各複合体が活性を維持した状態を言う。決定した条件で測定したラマンスペクトルは、超複合体を形成する各複合体の混合液のスペクトルや、CcOのみのスペクトルを参照として測定し比較・検討した。

<試料>試料は研究協力者である、伊藤恭子兵庫県立大准教授から提供を受けた。伊藤准教授はウシ心筋CcOの単離精製方法を確立し、再現性が高く高品質の結晶化方法も確立された(既述のCcOの結晶構造解析は全て共著者)。呼吸鎖超複合体の研究は電子顕微鏡法によるものがほとんどで、ごくごく微量の試料調製のみがなされてきたが、ラマンスペクトルの測定に必要な量を精製し、またそれが活性を持つことを確かめた上で実験を行なった。

<ラマンスペクトル測定条件>超複合体の共鳴ラマンスペクトルについては報告が無く、測定条件を検討する必要があった。測定条件とは、試料濃度、セルの形状、励起波長、1サ

ンプルあたりの測定時間、温度等である。調製一回で得られる超複合体は $10\ \mu\text{M}\times 100\ \mu\text{L}$ 程で貴重な試料であったため測定系とセル形状を工夫して測定に必要な試料を減らした。一方で一度の調製で得られるサンプル量を増やす工夫をした。

励起波長は、酸化型試料の測定では405, 413 nmを、還元型試料の測定では442 nmを、CO型試料の測定では413, 430, 590 nmをそれぞれ検討した。CO型試料の測定時には同位体COを用いてバンドの帰属を行なった。<ラマンスペクトル測定が試料に与える影響の評価方法>共鳴ラマンスペクトル測定条件を決定するにあたり、ラマンスペクトル測定前後の試料について可視吸収スペクトルの測定により活性中心部位の構造が保たれていることを、また、BN-pageにより超複合体状態を保持していることを確かめた。

### 4. 研究成果

本研究において活性測定やラマン測定が可能で、かつ活性がある高純度の呼吸鎖超複合体について共鳴ラマンスペクトルを測定することができた。酸化型試料のスペクトルでは、照射に伴い複合体IIIが光還元されていく様子が観測された。時々刻々とスペクトルが変化することから超複合体と、他の溶液条件中のCcOや複合体IIIとの比較が困難と判断した。完全還元型においては17 MDaに相当する巨大な超複合体分子の中から一つの結合であるFe-His結合に由来するラマンバンドを検出した。また、CcO単独の溶液と、超複合体の構成要素の混合液それぞれのCcO由来Fe-Hisと比較するために高分解能測定とフイッティングによる解析を行ったが、誤差の範囲で一致することが明らかとなった。

CO結合型の測定においては、複数の励起波長を検討し、430 nm励起が最も効率よくFe-CO伸縮振動に由来するラマンバンドを検出する波長であることを明らかにした。またこの波長での測定を行なったところ、Fe-C-O変角振動に由来するラマンバンドも検出可能であることがわかった。得られたFe-CO伸縮振動に由来するラマンバンドの振動数は $1\ \text{cm}^{-1}$ 程度の違いが認められた。ヘム側鎖のバンド領域に着目して比較すると、超複合体と構成要素の混合液のスペクトルに違いがあり、CcOだけでなく複合体IIIについても側鎖の構造が異なる可能性が示された。基質に酸素を添加するインドールアミン2,3 ジオキシングナーゼに、生体内反応の基質であるL-Trpが結合した場合にはCOにL-Trpが相互作用するためその影響は極めて大きく $20\ \text{cm}^{-1}$ ものシフトが観察されるのに対し、本来の基質ではないとされるが代謝可能なD-Trpが結合した場合ヘムポケットの環境変化に伴い $10\ \text{cm}^{-1}$ 程度のシフトが観察される。D-Trp結合の場合にはD-Trpは直接COとは相互作用しないので、ヘムポケットの環境変化による振動数変化と言える。このようにヘムポケットの環

境変化でかつ CO へに直接影響を与える構造変化であれば、振動数変化は大きくなるものと考えられるので、超複合体中の CcO に見られた  $1\text{ cm}^{-1}$  の変化は、CO が結合する側ではなく、軸配位子である His 側の極めて微小な構造変化を反映している可能性が高い。還元型超複合体では Fe-His の振動数が誤差の範囲で一致していたが、Fe-His はその振動数の低さから極めて微小な構造変化であれば、Fe-CO に比べて感度が低いと言える。本研究では CO 結合型超複合体では CcO の Fe-CO に由来するラマンバンドの変化に加えて、CcO 並びに複合体 III のヘム側鎖のスペクトル変化の可能性も示唆された。しかしながらいずれも極めて微小な構造変化を示すもので、結合することで CcO の活性を高くする調節因子 Higd1 が、CcO に結合したときに見られる CcO のヘム骨格のスペクトル変化とは大きく異なっていた。このことから、調節因子の結合に見られるような反応性の変化を伴う比較的大きな CcO の構造変化は超複合体形成では起こらないことが示唆された。

#### 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 2 件)

1. Kyoko Shinzawa-Itoh, Harunobu Shimomura, Sachiko Yanagisawa, Satoru Shimada, Ryoko Takahashi, Marika Oosaki, Takashi Ogura and Tomitake Tsukihara, 'Purification of active respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria enables the functional studies of supercomplex,' *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291, 4178-4184.

2. Satoru Shimada, Marika Oosaki, Ryoko Takahashi, Shigefumi Uene, Sachiko Yanagisawa, Tomitake Tsukihara, Kyoko Shinzawa-Itoh 'A unique respiratory adaptation in Drosophila independent of supercomplex formation,' *BBA-Bioenergetics*, **2018**, 1859, 154-163

[学会発表] (計 1 件)

S. Yanagisawa, A. Yamasaki, T. Nakao, S. Shimada, H. Shimomura, K. Shinzawa-Itoh, and T. Ogura, 'Resonance Raman study on respiratory Supercomplex from bovine heart mitochondria,' *6<sup>th</sup> Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry*, 2017 年 5 月 23 日~27 日、カナダ、オンタリオ (招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柳澤 幸子 (YANAGISAWA Sachiko)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授  
研究者番号 : 60557982

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

伊藤恭子 (Shinzawa-Itoh Kyoko)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授