

令和元年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04173

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達複合体の動的構造解析と電子伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Dynamic Structural Characterization of Electron Transfer Complex in Respiratory Chain of Mitochondria and Its Electron Transfer Regulation Mechanism

研究代表者

石森 浩一郎 (Ishimori, Koichiro)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20192487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のエネルギー生産に重要な酸素分子の水への還元は、ヘムを含む電子伝達蛋白質であるシトクロムcから膜結合蛋白質であるシトクロムc酸化酵素に電子が伝達されることで進行する。この電子伝達反応の分子機構を生体内に近い環境で検討し、その効率的な反応の進行には、シトクロムc酸化酵素とその周囲の膜構成成分との相互作用や、蛋白質構造の過渡的な変化である「構造的揺らぎ」、少数のアミノ酸残基による特異的な蛋白質間相互作用、さらには電子伝達経路における疎水的な環境が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトクロムcからシトクロムc酸化酵素への電子伝達が阻害されれば、細胞のエネルギー源であるATPの生産が停止してしまうことから、その電子伝達反応の制御機構の解明は生命の化学的理解には必須であり、また、蛋白質中の電子の流れを制御することができれば、生体分子を利用した電子素子の開発にもつながる。本研究では、複雑な構造である蛋白質間を電子がどのようにして効率的に伝達されていくのかについて、その蛋白質の分子構造に基づいて議論することで、生体分子における電子の流れの制御機構の一端を明らかにしようとするものである。

研究成果の概要(英文)：One of the essential biological processes, the four-electron reduction of molecular oxygen to water molecules in the mitochondrial respiratory chain, is promoted by the electron transfer from cytochrome c, a typical heme-containing electron transfer protein, to membrane-bound cytochrome c oxidase. In this study, we examined the electron transfer reaction under the physiological conditions and revealed that the interactions between the proteins and lipids in the membrane, structural fluctuations, transient structural changes, of the proteins, the specific protein-protein interactions mediated by a few amino acid residues, and hydrophobic environment in the electron transfer pathways are the crucial factors to effectively promote the electron transfer reaction from cytochrome c to cytochrome c oxidase. These observations and discussion would contribute to the understanding of the molecular regulation mechanism for the inter-protein electron transfer reaction in vivo.

研究分野：生物無機化学

キーワード：シトクロムc シトクロムc酸化酵素 ミトコンドリア呼吸鎖 ナノディスク 電子伝達 TCS 構造揺らぎ 電子伝達経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアにおける呼吸鎖は、多くの蛋白質が互いに相互作用しながら非常に高い効率で細胞内エネルギー通貨である ATP を生産している酸素呼吸生物の主なエネルギー生産システム (図 1) である。図 1 に示すように、この呼吸鎖では、解糖系 (Citric acid cycle) で得られた NADH や FADH<sub>2</sub> を電子運搬体としてミトコンドリア内膜に存在する蛋白質複合体 I (Complex I) あるいは、複合体 II (Complex II) に電子を与え、これらの蛋白質複合体は、さらにその電子をシトクロム bc<sub>1</sub> 複合体 (Cyt bc<sub>1</sub>: 複合体 III、Complex III) に伝達し、最終的に可溶性のヘム蛋白質であるシトクロム c (Cyt c) によりシトクロム c 酸化酵素 (CcO: 複合体 IV、Complex IV) に受容されることで終結する。この CcO に受け渡された電子は、分子状酸素の四電子還元消費され、水分子が生成する。このような電子伝達過程と共役してミトコンドリア

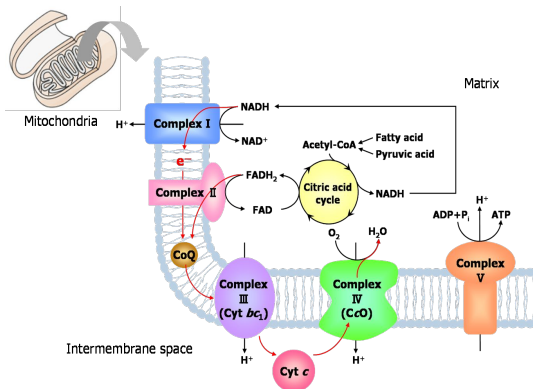


図 1 ミトコンドリアにおける呼吸鎖

のマトリックス部分から膜間部へと水素イオンの能動的輸送が起こり、その結果生じる膜間部の水素イオン濃度差の化学ポテンシャルを用いて ATP 合成酵素である複合体 V (Complex V) により ATP が合成される。

以上のように呼吸鎖における電子伝達反応は、生体内において極めて重要な機能を果たしているにもかかわらず、これらの電子伝達を行う蛋白質が多数のサブユニットからなる巨大分子量膜結合蛋白質であるため膜結合状態での単離精製が困難で、その高分解能構造情報を得る手段が非常に限られていることなどから、アミノ酸残基レベルでの機能解析や高分解能での構造解析、さらには生理的な条件に近い膜結合状態での反応解析などは実現していない。高等動物の CcO を用いたアミノ酸残基レベルでの詳細な Cyt c との相互作用研究は、これまで本研究者等の成果 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108, 12271) しか報告されてはいない。

### 2. 研究の目的

本研究課題ではミトコンドリア呼吸鎖の駆動システムである電子伝達系の制御機構、特に呼吸鎖の電子伝達反応の末端で、最もその制御機構が複雑で、エネルギー生産にとって重要であると想定されている CcO (Complex IV) について、生理的な環境に近い膜結合状態でのアミノ酸残基レベルでの機能解析と電子供与体である Cyt c との電子伝達複合体の動的構造解析と相互作用解析を行うことで、CcO への電子伝達制御機構の分子メカニズムの解明を目標とする。具体的な達成目標としては、

- (1) CcO のナノディスク化
- (2) Cyt c - CcO 電子伝達複合体の動的構造解析と相互作用解析
- (3) 電子伝達反応の制御機構の解明

を設定した。このような目標を達成することで、この呼吸鎖末端で分子状酸素を水に還元する CcO への電子伝達の分子制御機構が原子レベルの構造分解能で解明され、呼吸鎖における電子伝達制御システムの全貌解明につながると期待される。以上の目標を達成するためには、巨大膜結合蛋白質のナノディスク化 (達成目標 1) を実現し、このような CcO 試料を用いて、電子伝達複合体における相互作用部位の決定と反応に必須な相互作用の同定、さらには電子伝達複合体形成に伴う蛋白質の構造的揺らぎや運動性の変化、あるいはそれらと電子伝達活性との相関を明らかにする (達成目標 2) 必要がある。さらにこのような構造化学的情報を機能制御機構と結び付けるため、蛋白質間電子移動反応における過渡的中間体の推定とその解析、電子伝達経路のアミノ酸を置換することによる電子伝達速度や分子状酸素の還元速度の変化 (達成目標 3) を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) CcO のナノディスク化

ウシ心筋の CcO のナノディスク化については、本申請者の研究室で確立したコレラ菌由来の酸化酵素 *cbb3* での手法を応用した。ナノディスクを維持する足場タンパク質 MSP (Membrane Scaffold Protein) としては、apoA-1 由来の MSP1D1、MSP1E3D1 の他に、さらに半径の大きなナノディスクが形成可能な MSP1E3D1 をタンデムに連結した MSP(1E3D1)<sub>2</sub> についてもその利用を検討した。

- (2) Cyt c - CcO 電子伝達複合体の動的構造解析と相互作用解析

Cyt c の動的解析は本研究者らの既報 (Imai, et. al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, 469, 978) に従い、そのポリペプチド鎖アミド基の NMR 信号の緩和測定から検討した。CcO との相互作用解析には転移交差飽和 (TCS) 法を用いた。

- (3) 電子伝達反応の制御機構の解明

Cyt c から CcO への電子伝達反応においては、本研究者のこれまでの研究成果から、電子伝達複合体形成時における Cyt c のヘム近傍の疎水性残基からの脱水和水が重要であると

示唆されてきたことから、この脱水和に摂動を与える変異体を作成し、その電子伝達機能を検討するとともに、その CcO との電子伝達複合体の構造を推定した。この過渡的に形成される反応中間体である Cyt *c* - CcO 電子伝達複合体の構造は、これまで本研究者らによって化学シフト摂動法を用いて決定された相互作用残基 (Sakamoto, et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 12271) を考慮した蛋白質間ドッキングシミュレーション (Sato, et al., *J. Biol. Chem.*, **2016**, *291*, 15320) を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) CcO のナノディスク化

ウシ心筋の CcO は、その膜貫通直径が 10 nm であり、コレラ菌の *cbb3* の膜貫通直径である 8 nm を大きく超えることから、直径の大きなナノディスクを形成可能な MSP(1E3D1)<sub>2</sub> の利用を試みた。種々の条件検討を行ったが、ウシ心筋 CcO をナノディスク化には至らず、一部の実験はコレラ菌の *cbb3* を用いて行うこととした。ナノディスク化した *cbb3* については、すでに本研究者らの共鳴ラマンスペクトルの結果から高い酸素親和性が示唆されていたが、酸素親和性を直接測定するには得られる精製標品の収量が少なく、その測定は困難であった。本研究では、比較的少ない試料でも再現性良く気体分子との親和性が見積もることが可能な一酸化炭素 (CO) を用いたフラッシュフォトリススを試みた。図 2 に示すように、ナノディスク化し、CO を結合した *cbb3* は、照射後 0.01 ms に観測される吸光度減少 (図 2: 赤矢印) が界面活性剤で可溶化した場合 (図 2: 青矢印) より大きく、これは照射後 0.01 ms 以内に多くの CO 分子が再結合したことを示している。つまり、ナノディスク化した *cbb3* の方が、界面活性剤で可溶化した状態よりもより高い CO 親和性を有することを意味しており、このような結果は、*cbb3* の酸素親和性は生体膜成分との相互作用により高く保たれていることを示唆している。

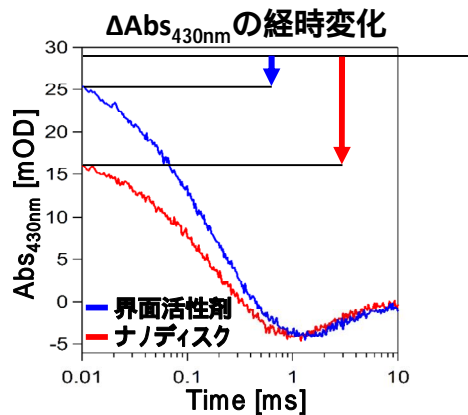


図 2 照射による CO 結合 *cbb3* から CO の解離とその再結合

##### (2) Cyt *c* - CcO 電子伝達複合体の動的構造解析と相互作用解析

これまでの我々の研究から Cyt *c* から CcO への電子伝達反応においては、Cyt *c* 構造における抑制された「構造的揺らぎ」が重要であると示唆されてきた (*Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **2010**, *398*, 231)。そこで本研究では、相互作用部位付近に位置し、Cyt *c* において、そのヘムとチオエーテル結合を形成することにより蛋白質全体の構造揺らぎを抑制していると想定されている Cys14 を Ala に変異させ、この変異により構造的揺らぎを増大させることで、CcO への電子伝達活性がどのように変化するのか、構造的及び機能的検討を行った。NMR による緩和分散解析の結果からは、この Cys の変異による CcO との相互作用部位周辺での「構造的揺らぎ」の大きな変化は認められず、CcO への電子伝達活性についても有意な低下は観測されなかった。一方、本研究者による Cyt *c* の主鎖アミド基の NMR 信号の緩和解析からは、Cyt *c* の CcO 相互作用部位から離れたアミノ酸残基である His33 にも比較的大きな「構造的揺らぎ」が観測され、この部位が Cyt *c* 全体の「構造的揺らぎ」において何らかの意義を有することが示唆されていた。そこで、この His33 の動きを水素結合の形成によって制限しているアミノ酸残基である Thr102 を Pro に置換することで、主鎖構造と水素結合に摂動を与えた変異体を作成し、その CcO への電子伝達活性を測定した結果、電子伝達速度が約 50% に低下することが明らかとなった。つまり、この His33 と Thr102 間の水素結合によって His33 の動きが制御され、効率的な CcO との電子伝達反応が進行すると考えられた。以上の結果は、Cyt *c* における「構造揺らぎ」の抑制はヘムを固定しているチオエーテル結合のひとつではなく、相互作用部位から離れた領域の動的性質によって制御されていることを示している。

一方、Cyt *c* - CcO 複合体における相互作用解析については、これまでの化学摂動法 (CS) を用いた結果からは、想定されるよりも多くのアミノ酸残基が相互作用していると示され、過渡的、二次的な影響を受けたアミノ酸残基まで含まれている可能性があった。そこで本研究では、より直接的な相互作用部位を決定するため、TCS 法を用いて検討を行った。その結果、Cyt *c* 表面の 4 つのアミノ酸残基 (図 3) で NMR 信号の強度減少が確認され、結晶構造解析から示されたアミノ酸残基だけでなく、ヘム近傍の疎水性残基 (Ile81) やヘムから遠い正電荷残基 (Lys88) でも相互作用している

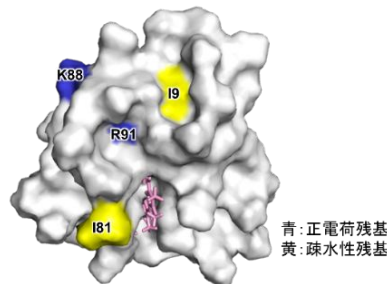


図 3 TCS 法によって決定された CcO との直接相互作用部位



可能性が示唆された。一方で、Cyt c 内部にも NMR 信号の強度減少が確認されたことから、NMR 測定時間中の Cyt c の還元による酸化型 Cyt c の NMR 信号の強度変化の可能性が考えられた。

### (3) 電子伝達反応の制御機構の解明

CcO-Cyt c 間の電子伝達経路を制御する構造的因子として、CcO と直接相互作用するアミノ酸残基である Cyt c の Ile81 残基からの脱水和に注目し、この Ile81 を Ser に置換した変異体の MD 計算を行うことで、このアミノ酸置換によって CcO-Cytc 間の蛋白質間電子伝達経路が大きな影響を受けることを見出した(図4)。さらに、この

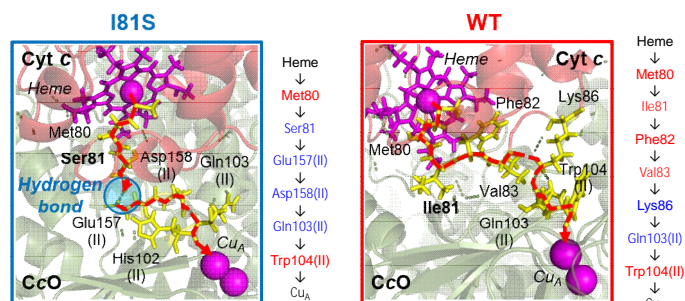


図4 MD 計算による Cyt c - CcO 電子伝達複合体における電子伝達経路 (左) 野生型、(右) Ile81 変異体

この Ile81 からの脱水和が Cyt c の構造にどのような影響を与えるのかについて、種々の分光学的手法により検討した結果、Ile81 からの脱水和により、Cyt c の構造におけるヘムの相対的位置に有意な変異が観測され、ヘム側鎖の溶媒への露出面積が増加することが示唆された。このようなヘム側鎖の溶媒への露出は、Cyt c のヘム鉄の酸化還元電位を負の方向へシフトさせる要因となり、その結果、CcO への電子伝達反応を促進すると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Shohei Konno, Kentaro Doi, Koichiro Ishimori, Uncovering Dehydration in Cytochrome c Refolding from Urea- and Guanidine Hydrochloride-denatured Unfolded State by High Pressure Spectroscopy, *Biophys. Physicobiol.*, 査読有, 16, 2019, 18-27.

DOI: 10.2142/biophysico.16.0\_18

Wataru Sato, Takeshi Uchida, Tomohide Saio, Koichiro Ishimori, Polyethylene Glycol Promotes Autooxidation of Cytochrome c, *Biochem. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects*, 査読有, 1862, 2018, 1339-1349.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.03.010

[学会発表](計 5件)

(招待講演および査読付き国際学会のみ記載)

Ishimori, K., Electron Transfer from Cytochrome c to Cytochrome c Oxidase: Formation of “Breakwater” in Electron Pathway, *Supramolecular Chemistry of Nitrogen Ligands*, 2018, invited.

Ishimori, K., Electron Transfer Pathway Analysis from Cytochrome c to Cytochrome c Oxidase under Turnover Conditions, 233<sup>rd</sup> ECS Meeting, 2018, invited.

Ishimori, K., Entropically Essential Dehydration upon Cytochrome c – Cytochrome c Oxidase Complex Formation to Prevent Electron Leaks to the Bulk Water Phase from the Protein-protein Interface, *Gordon Research Conference: Metals in Biology*, 2017.

Ishimori, K., Structural and Functional Characterization of Electron Transfer Complex between Cytochrome c and Cytochrome c Oxidase, 231<sup>st</sup> ECS Meeting, 2017, invited.

Ishimori, K., Energetic Analysis of Interactions in Electron Transfer Complex between Cytochrome c and Cytochrome c Oxidase, 229<sup>th</sup> ECS Meeting, 2016, invited.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等 <http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：内田 毅  
ローマ字氏名：(UCHIDA, Takeshi)  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：大学院理学研究院  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：30343742

研究分担者氏名：齋尾 智英  
ローマ字氏名：(SAIO, Tomohide)  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：大学院理学研究院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：80740802

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。