

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06092

研究課題名(和文)ウシ心筋チトクロムc酸化酵素の反応中間体の精密結晶構造解析

研究課題名(英文)Fine structures of reaction inter-mediate of bovine cytochrome c oxidase

研究代表者

月原 富武(Tsukihara, Tomitake)

兵庫県立大学・理学研究科・特任教授

研究者番号：00032277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：チトクロムc酸化酵素(CcO)は呼吸鎖末端酵素で、酸素の還元を担っている。酸素還元反応の際に分子内を電子が伝達されるのに同期して、プロトンが能動輸送される。酵素反応サイクル中の中間体及び中間体類似の構造を決定して、この酸素還元に伴う電子移動とプロトン能動輸送の同期の仕組みの解明を目指している。

酸素還元は6種の反応中間体、R、A、P、F、O、Eを経て段階的に進行する。これらの反応中間体のうちすでに構造決定していたR以外のA、P、F、O、E中間体の構造を決定し、反応サイクル中の6中間体全ての構造を決定した。これらの構造に基づいてプロトン能動輸送機構を提案している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チトクロムc酸化酵素(CcO)は呼吸鎖末端酵素で、酸素の還元とそれに同期したプロトンの能動輸送によってエネルギーを生産している。我々は長年酸素還元・プロトン能動輸送の仕組みの解明のためにウシCcOの結晶構造解析を行ってきた。

種々の反応中間体類似体等の構造解析を行い、酸素還元・プロトン能動輸送機構を提案している。この提案に対して、細菌CcOの変異体の機能解析等による多くの反論が出た。それらの反論を逐次新たな構造解析によって克服して、哺乳類に関する酸素還元・プロトン能動輸送機構としては我々の提案が認知されるようになってきた。この度の反応中間体の構造も我々の提案を一層強く支持する結果である。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome c oxidase (CcO) reduces molecular oxygen (O₂) to water, coupled with a proton pump. Electrons for the O₂ reduction are transferred from cytochrome c in the positive side phase of the inner mitochondrial membrane to the O₂ reduction site. The O₂ reduction is performed via a catalytic cycle consisting of six stages, R, A, P, F, O and E. Four electrons are transferred from cytochrome c to CcO to reduce an O₂ molecule. Each electron transfer to the O₂ reduction site coupled with one proton active transfer across the mitochondrial inner-membrane. We have determined bovine CcO structures in various states to elucidate the coupling mechanism of the O₂ reduction and proton pumping.

In the present study structure of R-state was re-refined to improve quality of its structure, and crystal structures of A-, P-, F-, O- and E-states of CcO were successfully determined at high resolution. These structures support a proton pumping mechanism via H-pathway that has been proposed by us.

研究分野：生物物理学、蛋白質科学、蛋白質結晶学

キーワード：チトクロムc酸化酵素 膜蛋白質 呼吸酵素 X線結晶構造解析 立体構造 プロトン能動輸送 酸素還元 生体超分子

1. 研究開始当初の背景

チトクロム c 酸化酵素(CcO)は呼吸によって得た酸素を還元してエネルギーを獲得する蛋白質である。研究対象にしているウシの CcO は13種のサブユニットからなる大きな生体超分子であり、精緻な構造変化によって化学反応を精密に制御する蛋白質の典型例である。我々は1970年代末より本酵素の構造研究をおこなって来て、酸素還元反応に伴う構造変化によって、生体膜を横断するプロトン能動輸送を行う仕組みを提案している。一方、細菌の CcO の生化学的研究によって我々の主張するプロトン能動輸送機構に対する反論が欧米の研究者によって展開されている。我々は、ウシ CcO の様々な状態の X 線結晶構造解析によって、少なくとも哺乳類酵素においては説の妥当性が認められるようになってきた。反応中間体の更に精密な構造解析を行なって精緻な構造変化によって、機能する分子機械として蛋白質の見事な姿を如実にする事が期待されている。

2. 研究の目的

チトクロム c 酸化酵素(CcO)は呼吸鎖末端酵素で、酸素の還元とそれに同期したプロトンの能動輸送を担っている。本酵素は 反応過程で微細な構造変化によって反応を精密に制御する蛋白質の典型例である。反応サイクルの幾つかの中間体の構造に基づいて、H-パスプロトンポンプ機構を提案している。更なる中間体構造の精密構造解析を行い、反応機構の全容を解明するのが本研究の主題である。CcOに限らず、反応中間体構造解析における最大の問題点は、複数の構造が混ざり、それをいかに分離して個々の構造を同定するかである。本研究では構造の混ざりを解く方法確立して中間体構造の全容を明らかにして、プロトンポンプ機構を完結させる。この研究は、精巧な機構で働く蛋白質の典型としての CcO のプロトンポンプ機構の解明にとどまらず、蛋白質機能解明のための精密な結晶構造解析法を開拓するということでも意義深い研究である。

3. 研究の方法

本酵素の酸素還元中心はヘム a₃ と CuB で構成されている。酸素還元は6種の反応中間体、R, A, P, F, O, E を経て段階的に進行する。これまでに R や A 中間体類似物の他、反応サイクルにはない休止酸化型などの構造を決定している。プロトンポンプ機構の全容を解明するためには、全ての中間体の構造が求められる。本研究では、既に決定している構造をさらに精密に決定し、新たに P, F, O などの中間体の構造を決める。CcOに限らず反応サイクルの中間体の構造決定では、結晶中で互いに構造が少し違っている複数の中間体の構造が混ざる。この混ざりの中から、如何にしてそれぞれの正確な構造を決定するかが大きな問題になる。これを克服する解析法確立して、各種中間体の構造解析を行う。具体的には以下の結晶構造解析を行い、反応機構の解明を行う。(1)還元型結晶の1.60オングストローム分解能での混ざりを解いた構造解析、(2)P及びF中間体結晶の1.70オングストローム分解能での混ざりを解いた構造解析、(3)O及びE中間体結晶の1.8オングストローム分解能での混ざりを解いた構造解析、

(4)A 中間体の結晶構造。

4 . 研究成果

酸素還元は6種の反応中間体、R, A, P, F, O, Eを経て段階的に進行する。プロトン能動輸送経路は水チャンネルとそれに続く水素結合ネットワークとプロトンプールで構成されている。我々は、R状態で水チャンネルが開いて4プロトンがマトリックス側からプロトンプールに蓄積されると主張している。P以降の過程で電子がCuA、heme aをへてheme a₃に供給される度に1プロトンずつプロトンプールから水素結合ネットワークを介して膜間腔側に輸送される。R状態（還元型）でのみヘリックスXの構造が水チャンネルを開いた状態にする。P, F中間体の構造決定を完了し、これらの中間体の活性中心の構造とこれまで見過ごされていた多型構造を精密に決定し、専門誌に報告した。このことによってP, F中間体の構造結晶学的に確定できた。無損傷休止酸化型結晶でも再精密化を行って、活性中心の構造を確定することができた。更に、O中間体用に調製した結晶試料を解析したところ、調製法によって結晶中に少量のA中間体を含む還元型結晶、O中間体と休止酸化型を含む結晶、E中間体と休止酸化型を含む結晶が存在することが判明し、A中間体、O中間体、E中間体の構造を決定した。完全還元型結晶の再精密化を行い、プロトンポンプにとって重要な役割を果たすヘリックスXに多型構造を同定した。これらを合わせて、専門誌に掲載された。これら中間体の構造に基づいてプロトン能動輸送機構の全容を概観する事ができるようになった。更に現在、各中間体において分子内を電子が移動する際に起こる微細な構造変化を明らかにして機能解明の深化に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 K. Shinzawa-Itoh, M. Hatanaka, K. Fujita, N. Yano, Y. Ogasawara, J. Iwata, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, K. Muramoto	4. 巻 1
2. 論文標題 The 1.3-angstrom resolution structure of bovine cytochrome c oxidase suggests a dimerization mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbaadva.2021.100009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 A. Shimada, Y. Etoh, R. Kitoh-Fujisawa, A. Sasaki, K. Shinzawa-Itoh, T. Hiromoto, E. Yamashita, K. Muramoto, T. Tsukihara, S. Yoshikawa	4. 巻 295
2. 論文標題 X-ray structures of catalytic intermediates of cytochrome c oxidase provide insights into its O ₂ activation and unidirectional proton-pump mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 5818-5833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 G. Ueno, A. Shimada, E. Yamashita, K. Hasegawa, T. Kumasaka, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, M. Yamamoto.	4. 巻 26
2. 論文標題 Low-dose X-ray structure analysis of cytochrome c oxidase utilizing high-energy X-rays.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Synchrotron Radiat.	6. 最初と最後の頁 912-921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577519006805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Atsuhiko Shimada, Fumiyoshi Hara, Kyoko Shinzawa-Itoh, Nobuko Kanehisa, Eiki Yamashita, Kazumasa Muramoto2, Tomitake Tsukihara, and Shinya Yoshikawa	4. 巻 297
2. 論文標題 Critical roles of the CuB site in efficient proton pumping as revealed by crystal structures of mammalian cytochrome c oxidase catalytic intermediates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 A. Shimada, Y. Eto, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, K. Muramoto, T. Tsukihara, S. Yoshikawa
2. 発表標題 O ₂ -activation and unidirectional proton-pump mechanisms of cytochrome c oxidase elucidated by X-ray structures of its catalytic intermediates
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田敦広、月原富武、吉川信也
2. 発表標題 構造から見たチトクロム酸化酵素のH-経路を介したプロトン能動輸送機構の普遍性
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤・新澤恭子、畑中美紀、藤田和也、矢野直峰、小笠原由美、岩田淳、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優
2. 発表標題 ウシ心筋シトクロム酸化酵素の1.3オングストローム分解能構造が示唆する二量体化機構
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Shinzawa-Itoh, T. Sugimura, T. Misaki, Y. Tadehara, S. Yamamoto, M. Hanada, N. Yano, T. Nakagawa, S. Uene, T. Yamada, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, K. Muramoto
2. 発表標題 Monomeric structure of an active form of respiratory oxygen reductase from bovine mitochondria
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Shimada, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshikawa.
2. 発表標題 Intermediate structure of cytochrome c oxidase provide insights into the mechanism of unidirectional proton pump coupled with O ₂ reduction.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Mizutani, A. Miyamoto, K. Ashida, K. Shinzawa-Itoh, A. Shimada, T. Tsukihara, S. Yoshikawa.
2. 発表標題 Structure determination of reduced cytochrome c oxidase using non-frozen crystal.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 G. Syo, A. Miyamoto, K. Ashida, K. Shinzawa-Itoh, A. Shimada, T. Tsukihara, S. Yoshikawa.
2. 発表標題 Influence of differences in X-ray dose on crystal structure of cytochrome c oxidase.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 月原 富武
2. 発表標題 チトクロム酸化酵素の構造・機能研究から見た結晶学の役割
3. 学会等名 日本結晶学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomitake Tsukihara, Atsuhiko Shimada, Shinya Yoshikawa
2. 発表標題 Reaction mechanism of cytochrome c oxidase elucidated by high-resolution crystal structural analyses
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuhiko Shimada, Minoru Kubo, Seiki Baba, Hideo Ago, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa
2. 発表標題 A nanosecond time-resolved XFEL structure analysis reveals the structural changes associated with CO release from Cytochrome c Oxidase
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuhiko Shimada, Minoru Kubo, Seiki Baba, Hideo Ago, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa
2. 発表標題 Structure changes induced by O ₂ -binding tightly regulate the proton-pumping of cytochrome c oxidase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Shimada, Marika Oosaki, Ryoko Takahashi, Shigefumi Uene, Sachiko Yanagisawa, Tomitake Tsukihara, Kyoko Shinzawa-Itoh
2. 発表標題 A unique respiratory adaptation in Drosophila independent of supercomplex formation
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田敦広、矢野直峰、山下栄樹、廣本武史、伊藤-新澤恭子、吉川信也、月原富武
2. 発表標題 構造解析における動的揺らぎと構造多型の区別-CO結合還元型チトクロム酸化酵素のX線結晶構造解析の場合
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 月原富武
2. 発表標題 私の蛋白質結晶学-チトクロムcからチトクロムc酸化酵素
3. 学会等名 日本結晶学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉川 信也 (Yoshikawa Shinya) (40068119)	兵庫県立大学・生命科学研究科・特任教授（名誉教授） (24506)	
研究分担者	島田 敦広 (Shimada Atsuhiko) (80723874)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------