

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06162

研究課題名(和文)プロトンポンプ機構解明に向けた呼吸鎖末端酵素の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of the respiratory terminal enzymes for elucidation of the proton pump mechanism

研究代表者

村本 和優 (Muramoto, Kazumasa)

兵庫県立大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50305679

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)：ミトコンドリア内膜や細菌細胞膜にある呼吸鎖は、酸化還元反応(電子伝達)で放出されるエネルギーを利用して水素イオン(プロトン)を移動し、生命活動に利用可能なエネルギーを効率的に生産する。呼吸鎖末端酵素におけるエネルギー変換の分子機構を理解するため、ミトコンドリアのシトクロム酸化酵素と細菌由来一酸化窒素還元酵素の構造と機能の研究を行った。その結果、構造解析の分解能が向上したとともに、基質、阻害剤等との反応に伴う酵素の構造変化や、酵素の単量体化・2量体化に伴う活性制御メカニズムに関する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸鎖酵素は生体膜を介したプロトン移動による効率的なエネルギー変換を行う。ミトコンドリア呼吸鎖の代謝異常は活性酸素産生などに関係する。病原菌の呼吸鎖酵素は宿主免疫系から菌体を守る働きを担う。本研究では呼吸鎖酵素のエネルギー変換機構に関して分子レベルでの知見が得られたとともに、これらの知見は高効率なエネルギー変換素子の構築、代謝異常のメカニズム解明、病原菌に対する薬剤の創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Respiratory chains in mitochondrial and bacterial membrane transfer hydrogen ions (protons) by using energy released from the redox reaction (electron transfer), and efficiently generates energy available for the life. To understand the energy transduction mechanism of the respiratory terminal enzymes, I studied molecular structure and function of mitochondrial cytochrome c oxidase and bacterial nitric oxide reductases. The resolution of structural analysis was improved. The results showed structural changes of the enzymes depending on the reaction with the substrates and inhibitors, and indicated the regulation mechanism of enzymatic activity depending on the monomerization/dimerization of enzyme.

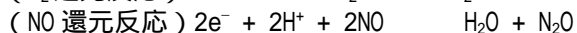
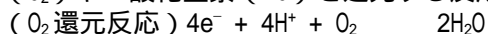
研究分野：生物物理学

キーワード：生体エネルギー 生物物理 呼吸鎖 膜蛋白質 酵素 X線結晶解析 電顕単粒子解析

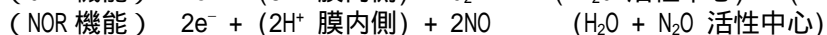
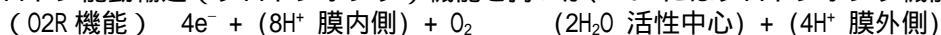
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内膜や細菌細胞膜にある呼吸鎖は酸化還元反応(電子伝達)で放出されたエネルギーを使って水素イオン(プロトン)を能動輸送する。エネルギーは膜を介したプロトン濃度勾配に変換され、ATP合成や物質輸送など重要な生命活動に利用される。呼吸鎖電子伝達系は酸化還元反応の基質群と酵素群で構成される。電子は最終的に末端酵素へ伝達され、分子状酸素(O_2)や一酸化窒素(NO)を還元する反応に使われる。



O_2 還元酵素(Dioxygen Reductase: O2R)はミトコンドリアのシトクロム酸化酵素(Cytochrome c Oxidase: CcO)に代表される末端酵素で、好気呼吸によるエネルギー生産を担う。一方、 NO 還元酵素(Nitric Oxide Reductase: NOR)は病原菌や脱窒菌などにおいて嫌気呼吸を担う。O2RとNORは分子進化上のファミリーを形成し、よく似た構造を持つ。いずれの酵素も膜貫通領域内にヘム1分子と銅(または鉄)原子から成る O_2 (または NO)還元反応の触媒部位(活性中心)と、電子伝達を担うもう1つのヘム分子を持つ。 O_2 または NO の還元反応に必要なプロトンは膜内側の溶媒領域から膜貫通領域を通して活性中心まで能動輸送される。また、O2Rは膜を貫くプロトン能動輸送(プロトンポンプ)機能を持つが、NORにはプロトンポンプ機能がない。



O2Rの構造機能研究は国内外において長年行われてきた。ミトコンドリア CcO の構造解析に関しては、1995年に最初の構造が決定されて以来、CcOの酸化状態が異なる構造やCcOに阻害剤が結合した構造などが報告されてきた。一方で、NORの構造機能研究の蓄積はまだ浅い。緑膿菌シトクロム c 依存性 NOR (cNOR) の構造は2010年に初めて決定された。また、髄膜炎菌キノール依存性 NOR (qNOR) の構造は2016年に4.5 Å分解能で報告された。本研究代表者は、1998年以来ウシ心筋ミトコンドリア CcO の構造機能研究に携わり、おもに X 線結晶構造解析を行ってきた。また、2014年度からは NOR の構造機能研究も開始した。2010~2017年度には基盤研究 B および基盤研究 C の研究費補助を受け、CcO および NOR の構造機能研究を進めてきた。

2. 研究の目的

O2RとNORの構造機能を詳細に比較解析することにより、エネルギー変換の動作原理やエネルギー効率に関わる構造要因の解明につながると期待される。本研究では、CcOの反応中間体やNORの活性型高分解能構造など、プロトンポンプ機構に重要な構造を決定することを目的とした。

3. 研究の方法

CcOについては、ウシ心筋ミトコンドリアから単離精製し結晶化した標品を用いて、SPring-8 BL44XU ビームラインを利用した X 線回折実験を実施し、エネルギー変換機能に関わる構造変化を結晶解析によって高精度で決定した。cNORについては、緑膿菌由来の精製標品およびシトクロム c_{551} およびアズリンを用いて、分光法による活性測定を行った。qNORについては、大腸菌で発現させた髄膜炎 qNOR の精製標品を用いて、電極法による活性測定、および上記ビームラインを利用した X 線結晶解析と低温電子顕微鏡を利用した単粒子解析による構造決定を行った。

4. 研究成果

CcOに関する研究成果

(1) 構造解析の分解能向上 最初の CcO 構造の分解能は2.8 Åであったが、本研究代表者らはこれまで分解能向上を目指して X 線結晶解析実験の条件検討を進め、2016年には1.5 Å分解能の構造を報告した。本研究では、結晶凍結条件などを改良することにより分解能をさらに1.3 Åにまで向上させた。その結果、酵素中のアミノ酸の側鎖構造や酵素に結合しているリン脂質の構造、水分子の配置がより詳細に明らかになった。〔発表論文1、学会発表1,2〕

(2) 単量体・2量体の構造機能 CcOの機能単位は単量体であるが、これまでに得られた結晶構造中ではCcOは2量体として存在していた。一方、ミトコンドリア膜を穏やかな条件で可溶化すると、CcOは単量体または他の呼吸鎖酵素と会合した超複合体状態として得られ、超複合体中のCcOは単量体として存在する。2量体 CcO と単量体 CcO を両親媒性高分子である Amphipol により安定化し活性を測定した結果、単量体は2量体よりも高い活性を示すことが明らかになった。さらに、新規に合成された界面活性剤(3-oxatridecyl-β-D-mannoside)を用いることにより単量体 CcO の結晶が得られた。単量体 CcO 結晶の構造を1.85 Å分解能で解析し2量体構造と比較した結果、2量体構造の会合面には可溶化の際に添加されたコール酸が結合して2量体を安定化しているのに対し、単量体構造の該当部位にコール酸は存在しなかった。さらに、2量体構造ではコール酸の結合によりプロトン輸送経路を形成する水素結合ネットワークが途切れることから、これが2量体化による活性低下の原因であると考えられる。従って、ミトコンドリア膜においてもコール酸と類似の生理活性物質が2量体化を引き起こし、活性を制御している可能性

が示唆される。〔発表論文 4、学会発表 5,7,8〕

(3) Cc0 に結合した脂質構造 Cc0 の高次構造 (2 量体、超複合体) 形成における脂質の役割を明らかにするため、単量体 Cc0 に結合するリン脂質の構造をリン原子の異常散乱効果を利用した X 線結晶解析により決定した。その結果、Cc0 の膜貫通領域表面には 3 分子のカルジオリピンが結合していることが明らかになった。これらのうち 2 分子のカルジオリピンは、単量体 Cc0 の構造を超複合体構造に重ね合わせた場合 Cc0 と他の呼吸鎖酵素との会合面に存在することから、超複合体構造形成を担うことが示唆される。〔発表論文 4、学会発表 5,7,8〕

さらに、2 量体 Cc0 の会合面に存在する脂質および界面活性剤の構造を 1.3 Å 分解能での結晶解析により決定した。その結果、2 量体会合面には脂質および界面活性剤の炭化水素鎖が疎水性相互作用により結合していることが明らかになった。2 量体形成には特異的なリン脂質の関与はなく、脂質の炭化水素鎖および上記のコール酸が関与することが示唆される。〔発表論文 1、学会発表 1,2〕

(4) O₂ アナログ分子結合構造 Cc0 の活性阻害剤であるアジ化物イオン (N₃⁻) は酸化型の活性中心に結合する。酸素還元反応過程における Cc0 の構造変化を調べるためのプローブとして N₃⁻ を用いた構造解析を行った。休止酸化型酵素の結晶を NaN₃ 溶液に浸すことによって N₃⁻ 結合酸化型酵素の結晶を作製し、X 線結晶解析により N₃⁻ の結合様式、および N₃⁻ の結合に伴う酵素構造の変化を 1.85 Å 分解能で決定した。その結果、N₃⁻ は酸化型活性中心のヘム鉄と銅原子に 1 分子ずつ結合することが明らかになった。さらに、N₃⁻ 結合酸化型 Cc0 と休止酸化型 Cc0 の構造を比較した結果、N₃⁻ の結合により活性中心のヘム分子位置がずれ動き、プロトン輸送経路を構成する水分子を介した水素結合ネットワークの構造が変化することが分かった。〔発表論文 5〕

(5) H₂O₂ 反応産物結合構造 Cc0 の酸素還元過程においては、還元型活性中心のヘム鉄と銅原子 (Fe²⁺ Cu¹⁺) に酸素 (O₂) が結合する。一方で、酸化型活性中心と過酸化水素 (H₂O₂) が反応することにより、酸素還元反応中間体と類似の化学種が生成し安定化することが知られている。そこで、休止酸化型 Cc0 結晶を電子メディエーター (フェナジンメトサルフェート) 存在下で過酸化水素と反応させ、生成した反応中間体を低温で捕捉し、X 線結晶解析により活性中心の構造を 1.8 Å 分解能で決定した。その結果、本反応中間体の活性中心のヘム鉄と銅原子の原子間距離 (4.6 Å) は、休止酸化型 (4.8 Å) および還元型 (5.1 Å) と比べて顕著に短くなることが分かった。さらに、活性中心の化学種は (Fe⁴⁺=O²⁻ HO—Cu²⁺) であることが示唆される。〔発表論文 3、学会発表 9〕

(6) O₂ 還元反応中間体構造 Cc0 の酸素還元過程においては、活性中心のヘム鉄と銅原子が酸化型 (Fe³⁺ Cu²⁺) になる反応中間体が生成する。この酸化型反応中間体は電子伝達と共役したプロトンポンプ機能を有するが、活性中心の酸化状態が同じく Fe³⁺ Cu²⁺ で既に構造決定されている休止酸化型 Cc0 にプロトンポンプ機能はない。以前にも酸化型反応中間体の構造解析を行ったが、構造の再現性と解析精度をさらに向上させるため、本研究では還元型 Cc0 結晶を酸素と反応させ、生成した反応中間体を低温で捕捉し、X 線結晶解析により活性中心の構造を 1.6 Å 分解能で決定した。その結果、休止酸化型の Fe³⁺ と Cu²⁺ には 2 原子分子 (過酸化水素イオン: O₂²⁻) が架橋しているのに対し、酸化型反応中間体では Fe³⁺ と Cu²⁺ それぞれに結合する酸素原子の電子密度が観測された。〔学会発表 3〕

(7) Na⁺/Ca²⁺ 結合部位構造 ウシ心筋ミトコンドリア Cc0 の分子表面にはナトリウムイオン (Na⁺) が通常結合する部位が存在するが、細菌の類似酵素の相当する部位にはカルシウムイオン (Ca²⁺) が結合している。また、Cc0 に結合した Na⁺ を Ca²⁺ に置換することは可能であるが、細菌酵素の Ca²⁺ を置換することはできない。さらに、Cc0 への Ca²⁺ の結合により酵素活性が阻害されることが報告されている。Cc0 の Na⁺/Ca²⁺ 結合部位の性質を明らかにするため、Na⁺ を Ca²⁺ に置換した酸化型と還元型の Cc0 構造を、それぞれ 1.7 Å 分解能で決定した。その結果、Ca²⁺ の結合は電子伝達経路の構造を僅かに変化させることが明らかになった。〔学会発表 12,13〕

NOR に関する研究成果

(8) cNOR の電子供与体酸化活性 呼吸鎖末端酵素の電子伝達の特性を比較するため、緑膿菌シトクロム c 依存性 NOR (cNOR) による電子供与体 (シトクロム c₅₅₁、アズリン) の酸化反応について、初期定常状態における速度論的解析を行った。その結果、シトクロム c₅₅₁ がアズリンと比べて優先的な電子供与体であること、cNOR 内の電子移動とプロトン移動とが共役していることが示唆される。また、酸化速度がイオン強度依存性を示さなかったことや、シトクロム c₅₅₁ の疎水性表面にあるアミノ酸変異が反応速度に影響を与えたことから、電子伝達体と cNOR との結合、および電子伝達において疎水性相互作用が重要であることが示唆される。

(9) qNOR の NO 還元活性および活性阻害 髄膜炎菌キノール依存性 NOR (qNOR) による NO 還元反応について、電子供与体としてユビキノール 1、およびメナジオールを用いて、初期定常状態における速度論的解析を行った。その結果、膜貫通領域表面の親水性アミノ酸変異が反応速度を

大きく低下させたことから、これらのアミノ酸残基がキノール結合と電子伝達に重要であることが示唆される。阻害剤を用いた速度論的解析の結果、ベンゾキノンがユビキノール1やメナジオールに対して競合的な活性阻害剤として作用することが分かった。〔学会発表 11〕

(10) qNOR の構造解析 髄膜炎菌 qNOR の機能単位は単量体であるが、その精製標品には単量体と2量体が含まれ、2量体の方が単量体よりも高い活性を示す。qNOR 単量体の X 結晶解析により、阻害剤(亜鉛)が結合した単量体構造を 3.15 分解能で決定した。また、qNOR 2量体の低温電子顕微鏡単粒子解析により、2量体構造を 3.06 分解能で決定した。その結果、2量体化がプロトン輸送経路および活性中心構造を適正化することにより活性が高くなることが示唆される。〔発表論文 2、学会発表 4,6〕

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shinzawa-Itoh Kyoko, Hatanaka Miki, Fujita Kazuya, Yano Naomine, Ogasawara Yumi, Iwata Jun, Yamashita Eiki, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya, Muramoto Kazumasa	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 2021年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100009 ~ 100009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadv.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 Jamali M. Arif M., Gopalasingam Chai C., Johnson Rachel M., Tosha Takehiko, Muramoto Kazumasa, Muench Stephen P., Antonyuk Svetlana V., Shiro Yoshitsugu, Hasnain Samar S.	4. 巻 7
2. 論文標題 The active form of quinol-dependent nitric oxide reductase from Neisseria meningitidis is a dimer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 404 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252520003656	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 該当する
1. 著者名 Shimada Atsuhiko, Etoh Yuki, Kitoh-Fujisawa Rika, Sasaki Ai, Shinzawa-Itoh Kyoko, Hiromoto Takeshi, Yamashita Eiki, Muramoto Kazumasa, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya	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 Journal of Biological Chemistry	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shinzawa-Itoh Kyoko, Sugimura Takashi, Misaki Tomonori, Tadehara Yoshiki, Yamamoto Shogo, Hanada Makoto, Yano Naomine, Nakagawa Tetsuya, Uene Shigefumi, Yamada Takara, Aoyama Hiroshi, Yamashita Eiki, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya, Muramoto Kazumasa	4. 巻 116
2. 論文標題 Monomeric structure of an active form of bovine cytochrome c oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 19945 ~ 19951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907183116	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 Shimada Atsuhiko, Hatano Keita, Tadehara Hitomi, Yano Naomine, Shinzawa-Ito Kyoko, Yamashita Eiki, Muramoto Kazumasa, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya	4. 巻 293
2. 論文標題 X-ray structural analyses of azide-bound cytochrome c oxidases reveal that the H-pathway is critically important for the proton-pumping activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14868 ~ 14879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003123	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 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

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 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第45回討論会
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 ウシミトコンドリア呼吸鎖酸素還元酵素の1.3 分解能構造が示唆する二量体化機構
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田敦広、伊藤・新澤恭子、山下栄樹、村本和優、月原富武、吉川信也
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 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto, Y. Shiro
2. 発表標題 Cryo-EM, Crystallographic and kinetic study of quinol-dependent nitric oxide reductases from Neisseria Meningitidis.
3. 学会等名 2020 World Conference on Protein Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、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活性型単量体構造
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第44回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Arif M. Jamali, C.C. Gopalasingam, R.M. Johnson, S.P. Muench, S.V. Antonyuk, S.S. Hasnain, T. Tosha, K. Muramoto and Y. Shiro.
2. 発表標題 Crystallographic and cryoEM structures of quinol-dependent Nitric Oxide Reductases from Neisseria meningitidis.
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structure Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優
2. 発表標題 Monomeric structure of an active form of respiratory oxygen reductase from bovine mitochondria
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤・新澤恭子、杉村高志、御前智則、蓼原吉輝、山本省吾、矢野直峰、花田真、中川徹也、上根史滋、山田聖、青山浩、山下栄樹、月原富武、吉川信也、村本和優
2. 発表標題 ウシチトクロム酸化酵素の活性型モノマー構造
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田敦広、村本和優、伊藤・新澤恭子、月原富武、吉川信也
2. 発表標題 チトクロム酸化酵素反応中間体の構造解析による、酸素還元と共役したプロトンポンプ機構の解明
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 村本和優
2. 発表標題 呼吸鎖電子伝達系末端酵素の構造と機能
3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jamali MMA, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y.
2. 発表標題 Steady state kinetics of quinol oxidation by nitric oxide reductase from Neisseria meningitis.
3. 学会等名 9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村本和優、伊藤・新澤恭子
2. 発表標題 ウシ心筋ミトコンドリア由来シトクロムc酸化酵素のカルシウムイオン結合構造
3. 学会等名 本生体エネルギー研究会第43回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村本和優、伊藤・新澤恭子
2. 発表標題 Calcium ion-binding structure of respiratory A-type oxygen reductase.
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/

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
研究協力者	伊藤・新澤 恭子 (Shinzawa-Itoh Kyoko) (70206316)	兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授 (24506)	

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			
英国	University of Liverpool	University of Leeds		