

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288072

研究課題名(和文) ナノディスクを利用したミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達機構の解析

研究課題名(英文) Functional and Structural Characterization of Electron Transfer Reactions in Mitochondria Respiratory Chain Utilizing Nanodisc

研究代表者

石森 浩一郎 (Ishimori, Koichiro)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸鎖電子伝達系末端のシトクロムc酸化酵素(CcO)を、生体膜モデルであるナノディスクに埋め込み、界面活性剤可溶化系よりも生体内に近い環境下でのCcOの機能を検討するとともに、ドッキングシミュレーションにより、これまで実験的には検討できなかったCcO上のシトクロムc(Cyt c)相互作用部位についても、その構造化学的知見を得ることに成功した。さらに、電子伝達機構を制御するうえで重要な蛋白質の構造揺らぎについて検討を行い、Cyt cは構造揺らぎが抑制された部分でCcOと相互作用することが示された。以上の結果から、Cyt cからCcOへの電子伝達反応を制御する動的な構造要因について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We reconstituted cytochrome c oxidase (CcO) into a biomembrane model, nanodisc, to characterize its functions in the absence of detergents. The resonance Raman spectra revealed that the reconstitution of CcO into the nanodisc increases the oxygen affinity, leading to efficient reduction of dioxygen to water molecules. To discuss interactions regulating the electron transfer (ET) reactions, we examined the cytochrome c (Cyt c) interaction site on CcO by docking simulation. Unexpectedly, electrostatic interactions do not contribute to the stabilization of the complex, but regulate the binding orientation of Cyt c on CcO. Instead, hydrophobic interactions are the primary factors to stabilize the complex, and the dehydration associated with the formation of the hydrophobic interactions is the key process to facilitate the complex formation. On the other hand, the structural fluctuations are suppressed in the CcO interaction site on Cyt c, which would also characterize the ET reaction.

研究分野：生物無機化学

キーワード：シトクロムc酸化酵素 シトクロムc ナノディスク 電子伝達反応 ヘム MSP ドッキングシミュレーション 構造揺らぎ

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、酸素呼吸生物の主なエネルギー生産システム(図1)であり、多くの蛋白質が互いに相互作用しない。

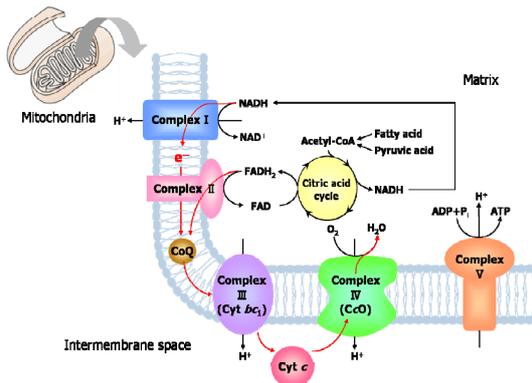


図1 ミトコンドリアにおける呼吸鎖

か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。この呼吸鎖では、図1に示すように、解糖系(Citric acid cycle)で得られた NADH や FADH₂ がミトコンドリア内膜に存在する蛋白質複合体(複合体 I: Complex I、複合体 II: Complex II)に電子を与え、これらの電子はシトクロム bc₁ 複合体(Cyt bc₁: 複合体 III、Complex III)に伝達され、最終的に可溶性ヘム蛋白質シトクロム c (Cyt c) を介してシトクロム c 酸化酵素(CcO: 複合体 IV、Complex IV)に受容される。CcO に受け渡された電子は分子状酸素と反応することで消費され、分子状酸素は4個の電子を受け取ることで水に変換される。さらに、このような電子伝達過程において生じるエネルギーを利用して Complex I、Complex III、Complex IV では、電子伝達と共役したミトコンドリア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の水素イオン濃度の差による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) が駆動され、ATP が合成される。つまり、ミトコンドリアの呼吸鎖においては、その電子伝達で生じるエネルギーを用いて ATP を合成していると考えられる。

呼吸鎖における電子伝達反応は、このように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、なぜ特定の蛋白質間でのみ特異的に電子伝達が起こるのか、酸素の還元反応やプロトンポンプ機能と電子伝達反応はどのように相関しているのかなど、基本的な分子機構については構造化学的にほとんど説明されていない。これは、関与する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、その構造化学的な検討が遅れていることに起因している。特に、高等動物の CcO では連携研究者の吉川教授などのグループにより、最近になってその高分解能の結晶構造が報告されたばかりで、電子伝達機構を解明する上で重要な電子伝達複合体の構造解析については、高分解能で詳細な実験的な検討は行われて

はいない。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本研究等々の成果(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108, 12271)が世界初である。

2. 研究の目的

本研究課題ではこの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、かつエネルギー生産にとって重要であると想定されているシトクロム c (Cyt c) によるシトクロム c 酸化酵素(Complex IV: CcO)への電子伝達過程(図1・下)について、原子座標レベルでの電子伝達複合体の構造を解明することで、その制御機構を明らかにすることを目標とする。具体的な達成目標としては、

1. 呼吸鎖末端電子伝達反応における特異的蛋白質認識機構と蛋白質間電子伝達経路の解明
2. 呼吸鎖末端電子伝達反応を制御する蛋白質の動的特性

を設定する。特に、本研究では、このような膜結合蛋白質における分子論的解析を、従来の界面活性剤可溶化ではなく、生体内細胞膜モデルとして近年注目されているナノディスクを用いて可溶化して行うことを目指す。生体内と同様な膜結合環境を再現するナノディスク化により、以上のような目標を達成することで、生体内でのエネルギー生産にとって必須な Cyt c から CcO への電子伝達の分子制御機構が、実際に酵素機能している状態下、原子レベルの構造分解能で解明されることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 呼吸鎖末端電子伝達反応における特異的蛋白質認識機構と蛋白質間電子伝達経路の解明

これまでの Cyt c から CcO への電子伝達反応の分子論的検討は、界面活性剤で可溶化した CcO を用いて行われてきたが、その相互作用部位には界面活性剤が結合し、本来の相互作用部位とは異なった部位での電子伝達反応を追跡している可能性がある。そこで本研究では、近年、新たに生体膜モデルとして開発された「ナノディスク」に CcO を再構成することで、より生体内環境に近い状態での Cyt c から CcO への電子伝達反応を行わせ、その相互作用部位を検討する。「ナノディスク」の作成は既に報告されているが、これまで報告されているナノディスクは直径 10 nm 程度で、これまで本研究等々が取り組んできたウシ由来の CcO の膜貫通部分の直径にほぼ等しく、ウシ由来の CcO のナノディスク化は困難である。そこで、本研究課題ではコレラ菌由来で、わずか3つのサブユニット(ウシ由来の酵素はサブユニット数13)からなる CcO を用いて、ナノディスク化を検討する。

さらに、Cyt c と CcO との間の特異的蛋白質

質認識機構については、これまで本研究者により NMR を用いてその Cyt *c* の相互作用部位が同定されてきたが、その詳細な相互作用様式については十分検討されてはいない。そこで、本研究では蛋白質複合体形成時に誘起され、蛋白質複合体形成において熱力学的に重要な意味を有する脱水和に注目し、その熱力学的特徴から相互作用の機能的意義を明らかにする。さらに、Cyt *c* 側からの相互作用の検討だけではなく、CcO 側の相互作用部位についてもその同定を試みる。CcO は分子量 40 万を超える膜結合蛋白質であり、実験的な構造化学的研究は困難であるため、ドッキングシミュレーションによる理論計算から、その相互作用部位を検討する。

(2) 呼吸鎖末端電子伝達反応を制御する蛋白質の動的特性

これまでの電子伝達反応の構造的、機能的解析から、電子伝達反応はその蛋白質の静的な構造だけではなく、過渡的に変化する構造の揺らぎによっても大きな影響を受けることや、ある一定の過渡的な構造になってはじめて電子伝達が誘起される動的構造が制御する機構も提唱されている。そこで本研究では、Cyt *c* と CcO の電子伝達反応において、蛋白質の動的構造がどのような意義を有するのかを検討するため、Cyt *c* の主鎖ペプチドの NMR シグナルの緩和分散解析を行い、電子伝達複合体における蛋白質間相互作用部位の動的な構造的特徴を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 呼吸鎖末端電子伝達反応における特異的蛋白質認識機構と蛋白質間電子伝達経路の解明

シトクロム *c* 酸化酵素のナノディスク化 これまで本研究者が研究対象としてきたウシ由来の CcO は膜貫通部位の直径が 10 nm を超える可能性もあるため、これまでに報告されているナノディスクでは再構成できない可能性がある。そこで本研究ではサブユニット数が 3 個で少なく、膜貫通部位の直径が 8 nm 程度に抑えることが可能なコレラ菌由来の CcO (*cbb*₃) のナノディスク化を検討した。

本研究者らによって確立されたナノディスク化の手法により、ナノディスク化蛋白質 MSP を用いることで、*cbb*₃ のナノディスク化を試みたところ、図 2 の SDS 電気泳動像

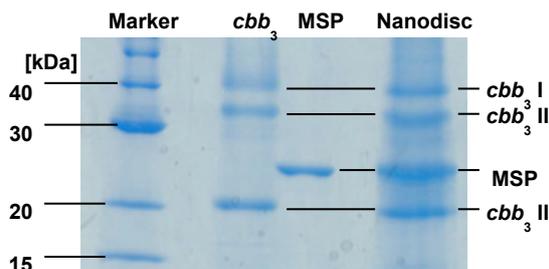


図 2 ナノディスク化した CcO の SDS 電気泳動結果 *cbb*₃I, *cbb*₃II, *cbb*₃III はそれぞれ *cbb*₃ のサブユニット I, II, III に対応する。

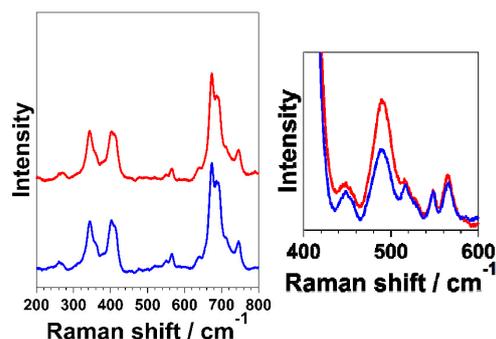


図 3 ND-*cbb*₃ の共鳴ラマンスペクトルヘム骨格振動領域(左)と Fe-CO 振動領域(右) いずれも上がナノディスク化 *cbb*₃、下が界面活性剤可溶性 *cbb*₃

に示されるように *cbb*₃ の各サブユニット、MSP が同時に溶出する画分が得られ、*cbb*₃ のナノディスク化 (ナノディスク化 *cbb*₃: ND-*cbb*₃) に成功したことが示された。ここで得られた ND-*cbb*₃ のヘム近傍構造を検討するため、共鳴ラマンスペクトルを用いて検討したところ (図 3)、ヘムの骨格振動領域のラマン線については、界面活性剤可溶化とナノディスク化 *cbb*₃ で大きな変化はないものの、酸素分子のモデルである一酸化炭素 (CO) がヘム鉄に結合した場合のヘム鉄と CO との間の伸縮振動のラマン線は、ND-*cbb*₃ のほうが明らかにその強度が大きく、これはラマンスペクトル測定の際のレーザー光による CO 解離が少ない、すなわち、ヘム鉄の CO に対する親和性が強いことを意味している。今後、ナノディスク化による機能変化についても ND-*cbb*₃ の酸素親和性の測定等を行うことにより、さらに検討を進める予定である。

電子伝達複合体形成反応の熱力学的解析 CcO のナノディスク化と並行して、Cyt *c*-CcO 間の電子伝達複合体形成を制御する相互作用についても検討を行った。これまでの本研究者の結果から、Cyt *c*-CcO 間電子伝達複

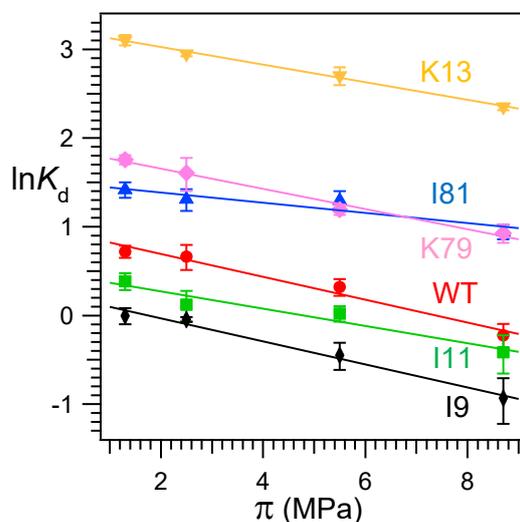


図 4 野生型 (WT) と変異体における複合体形成の解離定数の浸透圧依存性

表 1 変異 Cyt *c* の複合体形成における体積変化と脱水和水分子数

Cyt <i>c</i>	ΔV_w (ml mol ⁻¹)	N_{H_2O}
WT	-314 ± 37	17 ± 2
I9A	-317 ± 29	17 ± 2
I11A	-246 ± 46	14 ± 3
K13A	-241 ± 12	13 ± 1
K79A	-278 ± 24	15 ± 1
I81A	-139 ± 41	8 ± 2

合体形成においては、その NMR による相互作用解析 (Sakamoto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 12271) から、これまでの静電的相互作用だけではなく、疎水的相互作用についても、その重要性が指摘されてきた。本研究では、Cyt *c* - CcO 間の電子伝達複合体形成反応の熱力学的特徴を検討するため、電子伝達反応の定常状態での Michaelis-Menten 解析の結果をもとに、その電子伝達反応中間体である Michael 複合体の形成に重要な相互作用の同定とその熱力学的意義を、相互作用形成に伴う脱水和を検討することで明らかにした。まず、各相互作用の熱力学的意義の検討のため、Cyt *c* 側の CcO 相互作用アミノ酸残基に系統的に変異を導入した変異 Cyt *c* を作成し、その CcO に対する電子伝達活性を種々の浸透圧下で測定することにより、脱水和によるエントロピー変化を通して、相互作用形成が複合体形成反応に対してどのような熱力学的寄与をするのか、明らかにした。今回、注目した相互作用に参与するアミノ酸残基は表 1 に示した通りで、いずれも既に報告した NMR による相互作用解析から、CcO との複合体形成時に静電的相互作用することが示され、このうち

Lys13 や Lys79 などの Lys 残基は変異させることにより、その CcO に対する親和性が大きく低下することが報告されていることから、静電的相互作用部位としては重要であると考えられていた。しかし、図 4 や表 1 に示すように、Lys13 や Lys79 の変異体における脱水和水分子数は 13 あるいは 15 個程度であり、これらの Lys 残基の置換によって減少する脱水和水分子数は 5 個以下となって、疎水性相互作用残基である Ile81 に変異を導入した場合の約 10 個の減少に比べると変化が小さい。このような相互作用部位のアミノ酸残基の置換による脱水和水分子数の変化から、これらの Lys 残基が関与する静電的相互作用は、Ile 残基が関与する疎水性相互作用に比べ、Cyt *c* - CcO 複合体形成反応におけるエントロピー変化を通じた熱力学的寄与は小さく、電子伝達複合体形成の主要な熱力学的駆動力は疎水性相互作用であることを意味している。

電子伝達複合体形成に重要な蛋白質間相互作用の同定

これまでの Cyt *c* - CcO 電子伝達複合体形成反応において、Cyt *c* 側の相互作用部位は、その CcO との複合体の NMR 測定や CcO との相互作用部位に変異を有する変異 Cyt *c* の電子伝達活性の検討から、アミノ酸レベルで詳細に検討が行われてきたが、CcO 側についてはその巨大な分子量と膜結合蛋白質であるため、全く検討されていなかった。本研究では、本研究者が既に報告した Cyt *c* - CcO 複合体の相互作用部位の構造情報と、相互作用部位のアミノ酸置換による電子伝達活性の変化を考慮したドッキングシミュレーションと、その構造をもとにした MM-PBSA 法の利用により、CcO 側の相互作用アミノ酸残基を同定するとともに、各相互作用の複合体形成に対するエネルギー的寄与を算出した。その結果、複合体形成反応において、大きな (> 3 kcal/mol) 結合あるいは反発エネルギーを示すアミノ酸残基は図 5 ようになった。この図からの明らかなよう

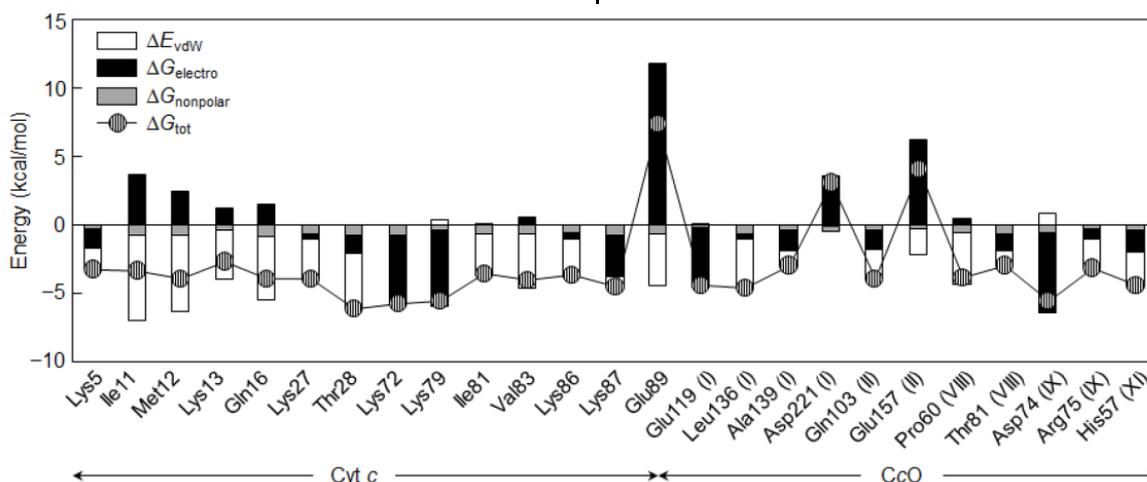


図 5 電子伝達複合体形成における各相互作用アミノ酸残基のエネルギー的寄与 $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ は疎水性残基からの脱水和エネルギー、 ΔE_{vdW} は van der Waals 接触による静電的相互作用形成のエネルギー

に、疎水性相互作用のエネルギー（疎水性アミノ酸残基の $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ と ΔE_{vdW})はほとんどの残基において負となり、複合体形成を安定化する方向である一方で、静電的相互作用形成のエネルギー（荷電アミノ酸残基の $\Delta G_{\text{electro}}$)は相互作用アミノ酸残基によって正にも負にもなり、全体としては正の値をとることから、静電的相互作用は全体としては複合体を不安定化することを意味している。つまり、前項で示した脱水和の結果と同様、Cyt *c*-CcO 電子伝達複合体形成反応における主な駆動力は疎水性相互作用であり、静電的相互作用は電荷の反発や引力を利用して Cyt *c* の CcO 場への結合の配向を制御するものの、複合体自体の安定化には寄与していないことを示している。

(2) 呼吸鎖末端電子伝達反応を制御における蛋白質の動的特性

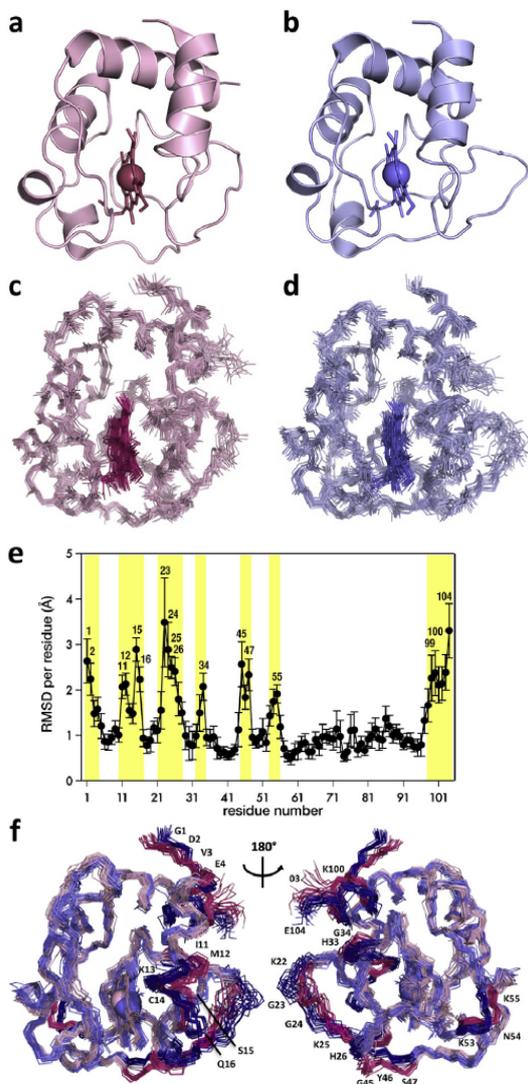


図6 Cyt *c*の立体構造 還元型(a)、酸化型(b)、還元型の20種のエネルギー最小化構造(c)、酸化型の20種のエネルギー最小化構造(d)、酸化型と還元型の主鎖構造の相違(e)、20種のエネルギー最小化構造における酸化型と還元型の構造的相違(f)

酸化型、還元型 Cyt *c*の立体構造解析 電子伝達制御機構を考慮するうえで、蛋白質の動的挙動が重要であることが近年の解析から示唆されている。このような動的挙動を解析する手法として、NMR シグナルの緩和分散解析による構造情報が注目されている。本研究では、このような緩和解析に必要な Cyt *c* の溶液中での詳細な構造決定を行った。安定同位体ラベルヒト由来 Cyt *c* の NOE 測定とその解析の結果から、還元型(図 6a, c)、酸化型(図 6b, d)の立体構造を決定することができ、また、酸化還元による構造変化は図 6e, f のような結果となった (Imai et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 469, (2016) 978-984)。酸化型、還元型、いずれの構造も既に報告されているウマ由来の Cyt *c* とは大きな構造的差異は認められないものの、酸化型と還元型においては、ループ 3 (23-28 残基) については比較的大きな構造的差異が認められ、電子伝達によりこのループ部分の構造が有意に変化することが明らかとなった。しかし、ループ 3 は、本研究者がすでに決定した CcO 相互作用部位とは離れており、電子伝達複合体形成時の相互作用部位は電子伝達に伴って、大きな構造変化を示さないことが示された。

緩和分散測定 NMR シグナルの緩和分散解析については、CPMG 法を用いた。この手法によるマイクロ秒からミリ秒の時間領域における構造的揺らぎは図 7 のようになることが明らかとなった。以前の order parameter (s^2) を用いた議論 (Sakamoto et. al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 398, (2010) 231-236) から、酸化型、還元型の Cyt *c* の主鎖構造は、いずれもピコ秒からマイクロ秒の領域での運動性が低く、強く束縛された運動しかしていないことが示されている。今回の緩和分散解析の結果からも、マイクロ秒からミリ秒の領域で化学交換による複数の構造間の遷移が観測されるのは、一

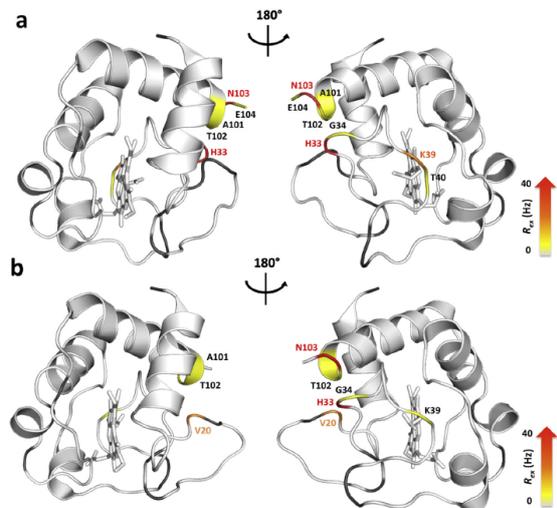


図7 Cyt *c*における構造的揺らぎ (Conformational Exchange) 還元型(a)、酸化型(b) R_{ex} は化学交換の速度を示す

部のアミノ酸残基に限られ、Cyt *c* は電子伝達蛋白質特有の柔軟性の低い動的構造を有することが示された。しかし、全体的には構造的揺らぎは小さいものの、His33 といったループ 3 の領域や、Asn103 が位置する C 末端付近には交換速度が 2500 s⁻¹~4000s⁻¹ 程度の二状態間の遷移が観測され、Cyt *c* においても特定の領域には構造的揺らぎが存在することが明らかとなった。しかも興味深いことに、これらの構造的揺らぎを示した部位は、酸化型と還元型で構造的差異が大きく観測される部位 (図 6e, f) と一致しており、Cyt *c* の電子伝達に伴って構造変化する部位に構造的揺らぎが局在していることを意味している。つまり、ループ 3 や C 末端領域は CcO との相互作用部位からは遠いものの、構造的にその揺らぎが大きく、電子伝達に伴うヘムの電荷の変化やそれに伴う軸配位子周辺の構造変化を鋭敏に反映すると考えられた。

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. Sato, W., Hitaoka, S., Inoue, K., Imai, M., Saio, T., Uchida, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Yoshizawa, K., Ishimori, K., 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、2016, in press
2. Imai, M., Saio, T., Kumata, H., Uchida, T., Inagaki, F., Ishimori, K., 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.

[学会発表] (計 6 件)

(招待講演のみ記載)

1. Koichiro Ishimori, Osmotic Pressure Effects Reveals a Specific Dehydration-induced Hydrophobic Electron Transfer Structure Comprising Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 17 日~20 日、Honolulu (USA)
2. Koichiro Ishimori, Analysis of Interactions in the Electron Transfer Complex between Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase using Osmotic Pressure, 227th ECS Meeting, 2015 年 5 月 26 日~28 日、Chicago (USA)
3. Koichiro Ishimori, Electron Transfer

Mechanism from Cytochrome *c* to Cytochrome *c* Oxidase in Mitochondrial Respiratory Chain, 8th International Conference on Porphyrin and Phthalocyanine (ICPP-8), 2014 年 6 月 22 日~27 日、Istanbul (Turkey)

4. 石森浩一郎, 呼吸鎖末端におけるシトクロム *c* からシトクロム *c* 酸化酵素への電子伝達機構—構造変化による電子伝達制御—, 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日~13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
5. 石森浩一郎, 構造変化による蛋白質間電子伝達の制御機構、第 26 回生物無機化学夏季セミナー、2013 年 8 月 23 日~24 日、阿字ヶ浦クラブ (茨城県・ひたちなか市)
6. Koichiro Ishimori, Key Interactions and Regulation Mechanism for Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cytochrome *c* Oxidase, 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (Canbic-4) 2013 年 5 月 21 日~25 日、Parry Sound (Canada)

[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) 研究代表者

石森 浩一郎 (Koichiro Ishimori)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：20192487

(2) 研究分担者

内田 毅 (Takeshi Uchida)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：30343742

(3) 研究分担者

齋尾 智英 (Tomohide Saio)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：80740802