

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440050

研究課題名(和文)シトクロムbd型呼吸鎖末端酸化酵素の構造と環境応答の解明

研究課題名(英文)Atomic structure of cytochrome bd-type terminal oxidase in the respiratory chain and response to environment.

研究代表者

坂本 順司 (Sakamoto, Junshi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：80175364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陽性好熱菌Geobacillus thermodenitrificans K1041株のシトクロムbd型メナキノール酸化酵素について、発現・菌培養・精製条件などを改良した結果、海外の協力者との共同研究としてのX線結晶構造解析により、原子レベルの高解像度立体構造を解明することができた。呼吸鎖末端のシトクロムbd型酸化酵素として世界初の成果であり、従来から知られていたヘム-銅酸化酵素とも他のいずれのタンパク質とも構造が全く異なっていた。

研究成果の概要(英文)：With improving the conditions of gene expression, host cell culture, and enzyme purification, we have succeeded in getting a highly resolved stereostructure of cytochrome bd-type menaquinol oxidase in respiratory chain of Gram-positive thermophilic bacterium Geobacillus thermodenitrificans K1041 strain, based on a collaboration with X-ray crystallography technique by foreign researchers. This is the first atomic structure of cytochrome bd-type oxidase and does not resemble to the heme-copper oxidases or any other known proteins at all.

研究分野：生体エネルギー学

キーワード：シトクロム 呼吸鎖 好熱性細菌 グラム陽性菌 生体エネルギー変換 電子伝達系 結晶構造 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸素呼吸において O_2 を利用する分子レベルの実体は、呼吸鎖電子伝達系の末端で働く酸化酵素(オキシダーゼ)である。呼吸鎖の主な酸化酵素には2つのグループがある。1つはヘム-銅酸化酵素であり、もう1つはシトクロム bc_1 型酸化酵素である。

このうちヘム-銅酸化酵素には、ヒトのミトコンドリアで働くシトクロム c 酸化酵素が含まれるため、極めて詳細に研究されていた。原子レベルの立体構造も、真核生物と原核生物にまたがる多くの種の酵素についてすでに解明されていた。これに対しシトクロム bc_1 型キノール酸化酵素は、真核生物には存在しないものの、その分布は細菌と古細菌にまたがり、発酵生産に使われる有用菌から感染症の原因となる病原菌まで広く存在しており、生物界全体としてはヘム-銅酸化酵素に匹敵するほど普遍性の高い酸化酵素である。またシトクロム bd は、アミノ酸配列を見る限り、ヘム-銅酸化酵素とまったく類縁性が認められない、隔絶したグループである。

このシトクロム bd のサブユニットIには、基質であるキノールが結合すると考えられる「Q-ループ」と呼ばれる領域がある。シトクロム bd には、このQ-ループ領域の長いLタイプと短いSタイプがある(これらタイプの名称は、申請者がかつての論文で提唱)。大部分の生物はこのうちSタイプの酵素をもっているのに対し、グラム陰性菌(プロテオバクテリア)の一部はLタイプの酵素をもっている。シトクロム bd ではLタイプがマジョリティーである。ところがシトクロム bd の研究は、遺伝子組み換えの技術がそろっている大腸菌の酵素、すなわち特殊なタイプであるLタイプのユビキノール酸化酵素にかなり集中しており、その知見には偏りがある。**最大の問題点の1つは、研究活動が世界的にかなりLタイプに偏っているにも関わらず、いまだ原子レベルの立体構造が結果的に1つも解かれていなかったことにある。**

(2) 申請者はこれまでシトクロム bd に限らず、ミトコンドリアとは異なるタイプの呼吸鎖酵素を微生物からいくつも発見し、生化学的・分子生物学的に研究してきた。その中にグラム陽性菌のシトクロム bc_1 型メナキノール酸化酵素がある。これは、先行した大腸菌を代表とするプロテオバクテリア以外では、初めての報告だった。それまで、細胞膜画分の酸化還元差スペクトルなどから、好アルカリ菌など他のグラム陽性菌でも存在が示唆はされていたが、酵素の実体として明確に同定したのは我々が最初である。まずは好熱性バシラス属細菌で見い出したが、その後工業的にも重要なコリネ型アミノ酸生産菌でも同定し、またサブユニット構成や機能の詳細な解析も行な

っていた。

2. 研究の目的

(1) 微生物の呼吸鎖は、全体として多様なタイプの酵素を含んでいるだけではなく、単一の種にも複数の電子伝達経路が含まれ分岐している。本研究では第1に、分岐した呼吸鎖におけるシトクロム bd の役割分担と、経路選択調整の詳細なメカニズムを、GFPをプロモーター活性のレポーターとして用いた手法で解明することとした。モデル生物としてアミノ酸生産能を持つグラム陽性菌 *Corynebacterium glutamicum* を使う。この菌では、シトクロム bd を含む多くの呼吸鎖酵素のプロモーターに GFP 遺伝子をつないだりコンビナントをすでに約 10 個作製しており、十分な蛍光強度が得られる事が分かっている。そこで培養中の通気・栄養条件やビタミン・金属塩濃度などに対する応答を計測する。経時的な測定が可能である本手法の利点を生かし、候補となる転写調節因子の二重ミュータントも作製し、この調節のメカニズムを明らかにする。

(2) 第2に、X線結晶構造解析を行なうことにより、このユニークな酵素のエネルギー共役の分子メカニズムを解明することを目的とした。好熱性バシラス属のシトクロム bd では、ドイツ、マックスプランク生物物理学研究所のハルトムート=ミヘル教授との共同研究で、以前から構造解析に適した結晶が得られ、3つのヘム鉄間の距離も算出されている。最近のデータでは $1 \& 2 = 18.27 \text{ \AA}$ 、 $1 \& 3 = 13.81 \text{ \AA}$ 、 $2 \& 3 = 10.98 \text{ \AA}$ と更新されており、期間内に分子全体の原子構造を解明する。

(3) 当初シトクロム bd は特殊な菌だけが持つ脇役のような酵素だと見られていたが、病原菌や土壌菌、極限環境微生物、古細菌などにもあり、主流のヘム-銅酸化酵素と匹敵するほど広く分布している。特に、これまで「偏性嫌気性」と考えられてきた病原菌も、このシトクロム bd による酸素呼吸でごく低分圧の O_2 を使い、エネルギーを獲得していることが分かってきた。

大腸菌のシトクロム bd は、欧米や我が国の研究者が精力的に研究し成果を上げてきたが、未だ立体構造は解明されていない。遺伝子工学的な実験も多数なされているが、立体構造が不在のため、詳細な反応メカニズムに関しては隔靴搔痒の感が否めない。原子レベルの立体構造の解明では、シトクロム c 酸化酵素を中心とするヘム-銅酸化酵素が先行している。哺乳類から細菌まで多くの生物種由来の分子および A, B, C 3つに分類されるファミリーのすべてで解かれたのと同対照的である(最新は共同研究者のミヘル教授らによる C ファミリーの解明)。膜タンパク質の結晶化と構造解析には、

材料の選択がクリティカルである。系統的に大腸菌から遠いグラム陽性菌の *bd*、特にタンパク質の安定性が期待される好熱菌の酵素を用いた研究に期待が高まっていた。応用面では、病原菌の *bd* は宿主のヒトや家畜のシトクロム *c* 酸化酵素とは構造がまったく異なることから、*bd* に特異的な阻害剤を見いだせば、病原菌の「息の根を止める」新しい分子標的抗菌薬を開発する基礎となる。

(4) また、シトクロム *bd* による電子伝達経路と他の経路との役割分担や調節機構は詳しく解明されていない。GFP レポーター遺伝子による電子伝達経路の選択的調節の解明は、まず、感染症の治療や予防の観点から重要である。コリネ型細菌に近縁なグラム陽性菌には結核菌やジフテリア菌・ライ菌などがあり、バシラス属やその近縁菌にも重要な病原菌が多いので、宿主動物の内部環境への応答を解明する必要がある。さらに、生態系の様々なニッチにおける微生物の役割を明らかにする上で、 O_2 分圧をはじめさまざまな条件が異なる自然環境で呼吸鎖酵素がどう使い分けられているかを知ることが役立つ。

3. 研究の方法

(1) GFP を用いた分岐呼吸鎖酵素の使い分けのモニタリング。グラム陽性菌を含め微生物の呼吸鎖には複数の末端酸化酵素があり、電子伝達の経路は分岐している場合が多い。次ページの表にあるように、ゲノムデータからも広範な微生物で 2~7 個以上の分岐が確認されている。大腸菌やグラム陽性菌も含め、シトクロム *bd* 型キノール酸化酵素も他のヘム-銅酸化酵素と共存し、生育条件によって使い分けられている。そこでシトクロム *bd* を含む呼吸酵素群の役割分担を詳細に解明するため、各酵素やサブユニットのプロモーター配列に GFP 遺伝子をライゲートし、プロモーター活性のレポーターとして利用する。

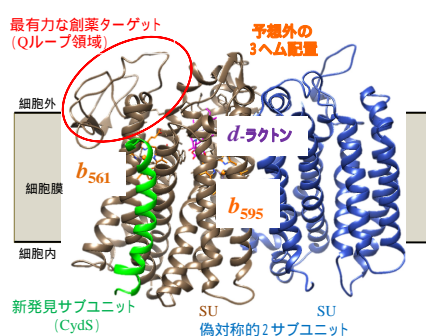
アミノ酸生産菌 *C. glutamicum* において、すでに約 10 個のプロモーターに対してレポーターをつないだりコンビナント細胞を構築しており、測定に十分な蛍光強度を持つが確認できている。プロモーター活性のレポーターとしては、従来からアルカリホスファターゼやホースラディッシュパーオキシダーゼが利用されているが、これらに比べ GFP では *in situ* 蛍光測定が可能である利点を生かし、速い時間経過の経時測定も行う。通気条件や炭素源・ビタミン等の豊富さ、呼吸酵素に使われる Fe や Cu を初めとする金属塩の濃度変化や添加への応答など多岐にわたる条件を調べる。増殖速度に比べて、呼吸鎖経路の転換がどれくらいの速度で起こるか解明する。

(2) 好熱菌シトクロム *bd* 型酸化酵素の大量

調製と結晶構造解析。すでに構造解析が進みつつある好熱性バシラス属細菌のシトクロム *bd* 型メナキノール酸化酵素について発現ベクターの変更やプロモーターの改変、培養条件のコントロールなどにより、発現量の増加を図る。精製条件についてもさらなる改良を進める。現在の方法ではわずかながら不純なタンパク質が残存しているので、クロマトグラフィーの条件等を検討して純度を上げる。また、界面活性剤の置き換えを検討する。現在用いている *n*-ノナノイル *N*-メチルグルカミドと *n*-デカノイル *N*-メチルグルカミドの等量混合物は本酵素の精製に適しているが、タンパク質や塩の濃度によっては低温で析出するという問題点があった。そこで他の膜タンパク質の結晶化に有効だった *n*-ドデシル *D*-マルトシド等にも置き換えてみる。ドイツのミヘル教授とは頻りにメールで打ち合わせている上、学会や先方の研究所で会い親しく打ち合わせ、好熱菌シトクロム *bd* の共同研究を継続することを確認し合った。

4. 研究成果

(1) グラム陽性好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 株のシトクロム *bd* 型メナキノール酸化酵素について、発現プラスミドの再構築、および高発現株の形質転換条件、形質転換後のコロニー選抜法、培養時の通気条件などの改善により発現量の増加を達成した上、当該酵素の精製条件・手順の改良をした結果、高純度の精製酵素を高収率で得ることができるようになった。この精製酵素について、上述のドイツの協力者との共同研究により X 線結晶構造解析を行い、原子レベルの高解像度立体構造を解明することができた。呼吸鎖末端のシトクロム *bd* 型酸化酵素として世界初の成果であり、従来から知られていたヘム-銅酸化酵素の構造とは全く異なっていた。



主な新知見を列挙する：

シトクロム *bd* に 3 つのヘムが含まれていることは以前から知られており、またその中心鉄原子間距離が互いに 10 Å 以上離れていることも申請者とミヘル教授のかつての共同研究でわかっていたが、その詳細な配

置が今回の研究で解明された。特にヘム b_{595} が膜内の深い水準にあることは予想外の知見である。また、当初ヘム d と推定されていた分子が、実は予想外のヘム d ラクトンであることが判明した。

主要なサブユニットが2つであること(図中の SUI (CydA)と SUII (CydB))はわかっていたが、サイズは小さいながら第3のサブユニットが会合しており、CydS と名付けた。この“S”は、申請者の姓 Sakamoto と、共同研究先の主要な実験者の姓 Safarian に共通な頭文字からの命名である。数年前、大腸菌のシトクロム bd でも第3のサブユニットが同定され CydX と名付けられた。同様の役割を果たすとは推定されるが、一次構造上の類似性は認められない。

主要サブユニット SUI と SUII がともに、膜貫通ヘリックスを9つずつ持つことが確定した。これまでの膜トポロジー推定ツールでは、アルゴリズムによって推定結果が食い違っていたが、本研究で決着した。さらに重要なことは、両サブユニット相互のアミノ酸配列は類似性がかなり低いにもかかわらず、その立体構造の間にはかなり高い2回回転対称性があることである。分子進化的には、ホモ二量体から分岐で生じたヘテロ二量体だと推測できる。

呼吸鎖酵素によるエネルギー変換機構において、水素イオンの分子内通路は重要である。今回の結晶構造で、2つの主要サブユニットそれぞれに1本ずつH⁺通路の有力な候補が見取れる。いずれの候補が本当の通り道か、あるいは両方が働くのかは、興味深い今後の課題であり、部位特異的変異導入など遺伝子工学的研究の格好の標的である。

ヘム-銅酸化酵素の酸素分子還元メカニズムについては、長い論争の果てに重要な結論が得られている。すなわち、O₂分子は一挙に4電子還元されることによって、活性酸素分子種が中間体として生じることを防いでいるという結論である。今回の bd 型酵素では、活性中心の構造が前者のそれと大きく異なっているにもかかわらず、一挙4電子還元メカニズムに調和的である点は共通であり、好気呼吸の「普遍原則」が得られたと言える。

以前から酵素活性に必須だと考えられていた「Qループ」にも具体的な立体構造が判明し、基質キノールに親和性が高そうなポケットが見取れる。今後、今回の座標データに *in silico* ドッキングなどバイオインフォマティクス的手法を適用することによって、Qループなどを標的とする新規な抗菌性分子をデザインできる可能性がある。従来から構造が知られているヘム銅酸化酵素が、ヒトや家畜と微生物にまたがって分布するのに対し、 bd 型酸化酵素は動物にはなく感染症起因菌を含む微生物だけに存在するため、この酵素を特異的に阻害する物質が得られれば、副作用がなく病原菌の「息の根を止める」

創薬への応用が期待される。

(2) 一方、もう1つのグラム陽性菌であるアミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* において、すでに作成していたプロモーターに対してレポーター遺伝子をつないだ約10個のリコンビナント細胞について、測定に十分な傾向強度を持つことを確認した上で、通気条件や炭素源、ビタミンなどの豊富さ、呼吸酵素に使われる鉄や銅など金属塩の濃度変化や添加への応答など、多岐にわたる条件での違いを調べ、分岐した呼吸鎖における電子伝達ルートへのスイッチングにこれらの培養条件が影響している様子を明らかにした。

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)

Kusumoto T, Aoyagi M, Sugiyama T, Sakamoto J (2015) Monitoring the enzyme expression in a respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum* in a copper ion-supplemented culture medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **79**(2), 223-229 doi: 10.1080/09168451.2014.968089 査読有

Safarian S, Rajendran C, Müller H, Preu J, Langer JD, Ovchinnikov S, Hirose T, Kusumoto T, Sakamoto J, Michel H. Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases. *Science*. 2016 Apr 29;352(6285):583-586. doi: 10.1126/science.aaf2477. 査読有

{ 学会発表 } (計6件)

Safarian Schara, 広瀬太一郎、楠本朋一郎、下牧瀬拓郎、中垣沙也香、坂本順司、Hartmut Michel (2015) 呼吸鎖シトクロム bd 型キノール酸化酵素の最初の結晶構造と、グラム陽性病原菌の探索。日本生体エネルギー研究会第41回討論会。東京2015年12月(21~)23日。講演要旨集 pp.92-93

椎葉千尋、楠本朋一郎、坂本順司 (2014) アミノ酸生産菌のシトクロム $bcc-aa_3$ 超複合体はタイプII NADH脱水素酵素も含む拡張型である。第87回日本生化学会大会。京都2014年10月18日。

Sakamoto J, Sasaki M, Shiiba T, Kusumoto T (2014) Factors in culture medium enhancing amino acid production and switching branches of the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. 18th European Bioenergetics Conference. (Lisbon, Portugal) July 12th-17th

笹倉涼平、平井乃梨子、坂本順司 (2013) 好熱菌呼吸鎖の、特異なB型呼吸鎖酵素と基質酸性シトクロム c との複合体状態の検討。

日本生体エネルギー研究会第 39 回討論会。
静岡県コンベンションアーツセンター。12 月
19 日。要旨集 pp.104-105

佐々木みなせ、椎葉千尋、楠本朋一郎、
坂本順司 (2013) アミノ酸生産菌の分枝した
呼吸鎖酵素のスイッチングおよびアミノ酸
生産能増強に關与する因子の解明。日本生体
エネルギー研究会第 39 回討論会。静岡県コ
ンベンションアーツセンター。12 月 19 日。
要旨集 pp.62-63

稻留舞、荻野耕平、坂本順司 (2013) グ
ラム陽性好熱菌のシトクロム *bd* 型メナキ
ノール酸化酵素の活性と調製法改良。第 20
回日本生物工学会九州支部会。佐賀 12 月 7
日。講演要旨集 pp.52

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 順司 (SAKAMOTO, Junshi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号：8 0 1 7 5 3 6 4

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし