

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650016

研究課題名(和文)サブユニット特異的部分同位体ラベル化による巨大膜蛋白質の構造解析

研究課題名(英文)Structural Characterization of Subunit-Specific Isotope Labelled Membrane Bound Protein

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のエネルギー生産器官であるミトコンドリアにおける電子伝達機構を解明するため、その電子伝達系の中樞を担うシトクロム酸化酵素について、NMRによる解析を可能なように安定同位体ラベルし、さらにこの酵素をナノディスク化することにより、生体内に近い膜結合状態での詳細な構造解析を実現することを試みた。バクテリア由来のシトクロム酸化酵素のナノディスク化再構成の結果から、巨大分子量膜結合蛋白質であっても安定同位体ラベルとナノディスク化で詳細な構造解析が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：To discuss the electron transfer mechanism in the respiratory chain in mitochondria, the reconstitution of an isotope labelled key enzyme, cytochrome c oxidase, into the nano-disc, a mimic of membrane in cells, has been examined, which allows us to measure the high resolution NMR spectra of the membrane-bound proteins under the physiological condition. The expression, purification and reconstitution of the bacterial cytochrome c oxidase into the nano-disc were confirmed, leading to the high resolution structural analysis of high molecular weight membrane bound proteins.

研究分野：生物無機化学

キーワード：シトクロム酸化酵素 ナノディスク 呼吸鎖電子伝達系 NMR MSP

1. 研究開始当初の背景

生体内における重要な反応の多くは膜蛋白質が関与しており、しかもその多くは複数のポリペプチド鎖(サブユニット)から構成される複合膜蛋白質である。このような高分子量複合膜蛋白質の構造・機能解析は、生命現象の分子論的理解には必須であるにもかかわらず、その巨大な分子量により、その分子論的機能解析の基本となる詳細な立体構造を決定することが非常に困難である。さらに、生体膜と結合していることから、精密な構造・機能解析には可溶化の過程が必要であり、この可溶化のための多くの界面活性剤の非特異的な結合が必要で、さらに見かけの分子量は大きくなることで、得られる情報は極めて限られているのが現状である。我々はこれまで、細胞内のエネルギー生産を担うミトコンドリアにおいて、ATP合成を駆動する電子伝達系(図1)に注目し、その末端酵素で巨

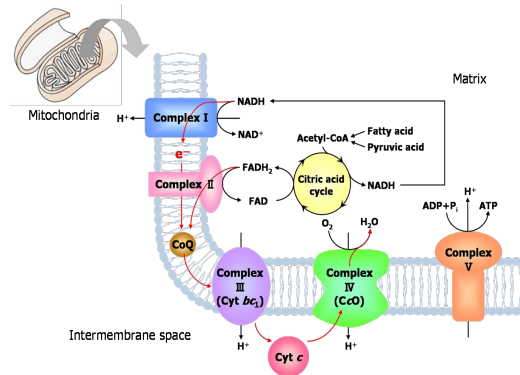


図1 ミトコンドリアにおける呼吸鎖

大な膜蛋白質であるシトクロムc酸化酵素の構造・機能解析を進め、独自の可溶化法とNMR測定条件で、巨大な分子量にもかかわらず、その電子受容体であるシトクロムcとの相互作用の同定に成功し、シトクロムc酸化酵素-シトクロムc複合体形成に伴う構造変化による電子伝達制御機構を提唱してきた(Sakamoto et al., *PNAS*, 2011)。この電子伝達制御機構について、さらに知見を深めるためには、シトクロムcの結合によるシトクロムc酸化酵素の構造変化を詳細に追跡することが必須であるが、分子量42万のシトクロムc酸化酵素からNMRによって得られる情報は非常に限られ、また、結晶中ではシトクロムcの相互作用部位付近に隣接するシトクロムc酸化酵素分子が位置していることから複合体の結晶化についても、不可能な状況である。

2. 研究の目的

NMRによる構造解析においては、結晶化が不要ではあるものの、巨大な分子量の壁を克服する必要がある。一般には分子量数万を超える蛋白質においては、NMRによる詳細な蛋白質全体構造の解析は不可能であるものの、部位特異的な安定同位体の導入と高分子量蛋白質解析用のNMRパルスシーケンスを用いることで、相互作用部位の同定など、局所

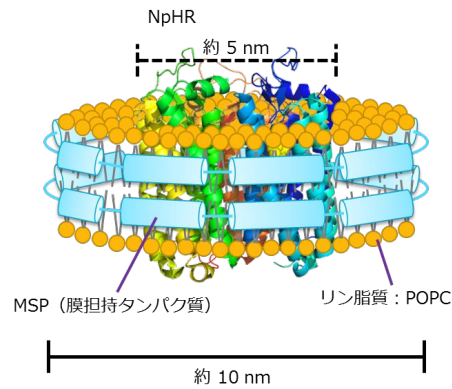


図2 ナノディスク化再構成蛋白質

的な構造解析であれば巨大蛋白質においても可能になりつつある。そこで本研究では、複合蛋白質の特定のサブユニットの特定部位のみ安定同位体を導入する技術を確認し、巨大分子量の複合蛋白質においても詳細な立体構造解析が可能な手法を開発することを最終的な目的とする。さらに細胞内膜結合環境を再現できるナノディスク(図2: 本研究室でそのナノディスク化に成功したNpHRの例)の技術を活用して、生体内で機能している環境下での膜結合蛋白質の構造について、NMRを用いて詳細に検討する。本研究課題では、これまで我々のグループによって先導的に研究が進められているシトクロムc酸化酵素について、その電子伝達機構の分子論的な解明に必要な構造情報を得るための新たな方法論の開発を試みる。

3. 研究の方法

蛋白質試料の調製 これまで本研究者らは高等動物、特にウシのシトクロムc酸化酵素を用いて、その電子供与体であるシトクロムcとの相互作用解析を行ってきたが、ウシ由来の酵素はサブユニット数13、二量体としての分子量は40万を超える蛋白質であることから、その構造情報は限られており、さらにそのナノディスク化を検討したが、蛋白質の膜貫通断面が大きく、従来のナノディスクではその半径を超え、ナノディスク化は不可能であった。そこで、ナノディスクの足場蛋白質であるMSPに挿入部分を導入することで、そのナノディスクとしての半径を15nm以上にするように設計したが、拡張したMSPではその構造が不安定化し、再現性良くナノ

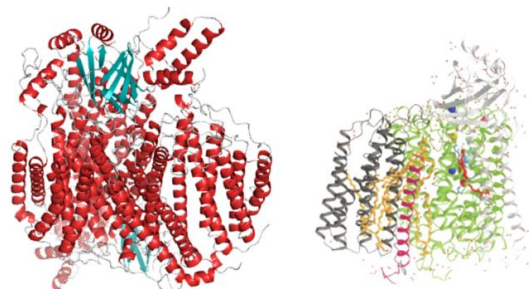


図3 ウシ由来CcO(左)と紅色細菌由来CcO

ディスクを得ることはできなかった。そこでサブユニット数が3で膜貫通断面が10 nm以下に抑えられると予想できるバクテリア由来のシトクロム *c* 酸化酵素に注目した。本研究で最初に用いたバクテリア由来のシトクロム *c* 酸化酵素は紅色光合成菌 *Rhodobacter sphaeroides* 由来(図3右)で、次年度はコレラ菌由来のシトクロム *cbb3* を選択した。ナノディスク化再構成 ナノディスク化再構成法については、本研究者らの研究室で用いている手順に従って進行させた。まず、シトクロム *c* 酸化酵素のナノディスク再構成の予備実験として、本研究者らの研究室で新たにヘム蛋白質であると同定されたPGRMC1についてそのナノディスク再構成化を行い、そのナノディスク再構成化条件の最適化を検討した。構造解析的手法 構造解析については種々のNMR測定を行うことで、多面的な構造情報を得ることを試みた。従来から相互作用部位の同定に用いてきた¹H-¹⁵N HSQC法による化学シフト摂動法、巨大分子量蛋白質との相互作用部位も同定可能な過渡的飽和交差法(TCS法)に加え、蛋白質の動的特性の解明に威力を発揮する緩和分散法についてもその測定を試みた。

4. 研究成果

バクテリア由来シトクロム酸化酵素の発現形の構築 バクテリア由来シトクロム *c* 酸化酵素としては、当初、紅色光合成細菌由来の酵素を選択し、その大量発現系と精製系の確立を試みた。この紅色光合成細菌由来の酵素は、従来から共同研究を行ってきたアメリカ合衆国イリノイ大学のRobert Gennis教授の研究室に大学院生を派遣して、その発現や精製方法に関する情報を得てきたが、本研究者の研究室では発現自体には成功したものの、その発現効率が低く、特に菌体の生育速度が遅いため、十分量の酵素を得ることは非常に困難であった。特にナノディスク化再構成化過程においては、収率が大きく低下することから、最終的なナノディスク化再構成蛋白質の収量を確保するには大量の精製蛋白質が必要であった。

そのため、平成26年度からは、紅色光合成細菌の酵素同様、サブユニット3本からなるコレラ菌由来のシトクロム *c* 酸化酵素についても、その発現系と大量生成系の確立を目指した。このコレラ菌由来の酵素は兵庫県立大学の村本准教授からその発現系を譲渡いただき、その発現効率と蛋白質精製系の改良を行った。その結果、十分量の蛋白質試料が得られる目処をつけることができ、コレラ菌由来のシトクロム *c* 酸化酵素について、ナノディスク再構成化を行うこととした。

一方、コレラ菌由来のシトクロム *c* 酸化酵素は *cbb3* 型であり、ウシや紅色光合成細菌の電子供与蛋白質であるシトクロム *c* では複合体は形成するものの、電子を伝達することが

できず、その電子伝達活性を検討するには、生理的な電子供与蛋白質であるシトクロム *c4* を用いる必要がある。しかし、シトクロム *c4* の発現、精製系はこれまで報告されていないため、本研究では、シトクロム酸化酵素のナノディスク再構成化とあわせて、シトクロム *c4* の発現、精製系の確立についても取り組んだ。

シトクロム *c* の立体構造解析 ナノディスク化シトクロム *c* 酸化酵素とシトクロム *c* との相互作用を検討する際には、それぞれの精密な立体構造情報が必要である。特に、還元型シトクロム *c* の立体構造については利用できる構造情報が比較的精度の低いNMR構造情報に限られることから、まずは還元型シトクロム *c* の立体構造の決定を試みた。¹H-¹⁵N HSQC スペクトル上の各アミノ酸残基 NH のシグナルについては、その帰属が完了(図

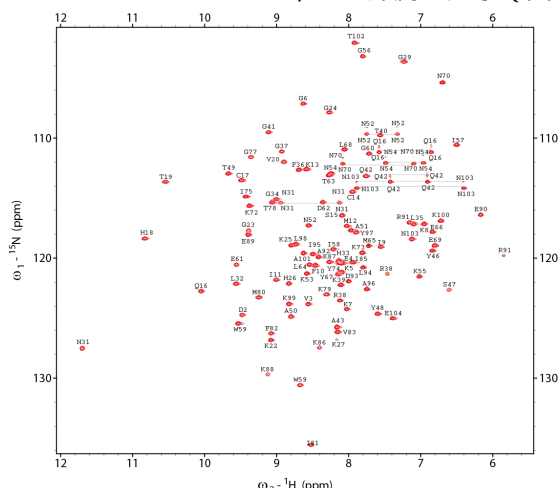


図4 還元型シトクロム *c* の¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

4) し、構造の最適化もほぼ終了したことから、相互作用解析に必要な構造情報は得られると考えられた。

蛋白質のナノディスク化再構成 ナノディスク化再構成化は収率が高い操作ではないため、その足場蛋白質となるMSPの大量精製系を構築する必要がある。そこで、MSP

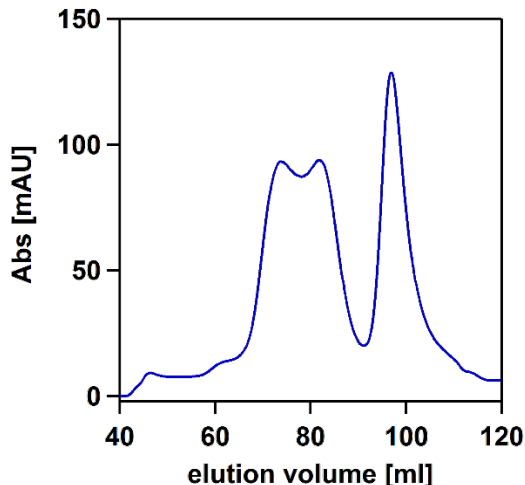


図5 MSP生成最終過程におけるゲルクロマトグラフィー

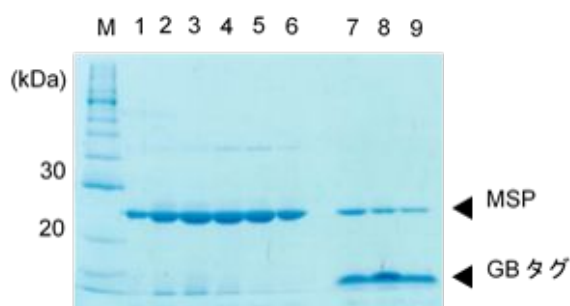


図 6 ゲルろ過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE レーン 1 - 6 は図 5 の溶出体積 64 - 84 ml の分画成分、レーン 7 - 9 は溶出体積 96-104 ml の分画成分

を再現性良く大量に単離・生成できる実験系の確立を目指した。MSP の発現ベクターや培養時間の最適化で、発現効率を上げ、そのあとの精製過程においてはカラムクロマトグラフィーの条件検討により、当初に比べ数倍の収量を得ることが可能となった。精製の最終段階ではゲルクロマトグラフィーにより精製を行い(図 5),分画成分を SDS-PAGE ゲルにより分析した結果(図 6),ナノディスク再構成化に十分な純度で MSP を得ることができ、最終的に 0.2 ~ 0.3 mM の MSP 溶液 1 mL 程度が安定的に得られるようになった。ここで得られた MSP を用いてバクテリア由来のシトクロム c 酸化酵素のナノディスク化再構成を試みたが、蛋白質の発現、精製上の問題から十分量のシトクロム c 酸化酵素をナノディスク再構成化実験に用いることができず、種々の NMR 測定に耐えるだけの純度と量のナノディスク化再構成蛋白質は得られなかった。ナノディスク化していないシトクロム c 酸化酵素では、サブユニット数のはるかに多いウシの酵素であっても、その相互作用部位が検討できるだけのシグナル分解能を有する NMR を測定可能であることから、今後、シトクロム c 酸化酵素の発現、精製の効率の向上により十分量の蛋白質試料を確保した上で、ナノディスク再構成化条件の最適化を検討することが必要である。

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)

[学会発表](計 1 件)

Ishimori, K., “Key Interactions for Electron Transfer from Cytochrome c to Cytochrome c Oxidase in Respiratory Chain: Thermodynamic Characterization of Complex Formation for Electron Transfer”, 225th Electrochemical Society Meeting (招待講演), 2014 年 5 月 11 日 ~ 2014 年 5 月 15 日, Orlando (アメリカ合衆国)

[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 (ISHIMORI KOICHIRO)
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 (UCHIDA TAKESHI)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：30343742