

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07029

研究課題名(和文)呼吸鎖末端酵素における効率的エネルギー変換機構の普遍性と多様性の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of energy transduction mechanism in the respiratory terminal enzymes.

研究代表者

村本 和優 (Muramoto, Kazumasa)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：50305679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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。エネルギー変換の分子機構を理解するために、呼吸鎖末端酵素ファミリーの分子構造と機能の研究を行った。その結果、酵素触媒部位および水素イオン移動経路の構造的性質、酵素とその電子供与体との電子伝達の機能的特性が示された。

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, I studied molecular structure and function of the respiratory terminal enzymes. The results showed that structural property of the catalytic site and the proton transfer pathway, and functional property of the electron transfer between the enzyme and its electron donor.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理
論的解析 ナノバイオ 蛋白質 酵素 呼吸鎖 生体エネルギー変換 X線結晶構造解析 酵素反応速度

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)で放出されるエネルギーによって水素イオン(プロトン)を能動輸送する(プロトンポンプ)。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の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)には、ミトコンドリアのシトクロム酸化酵素に代表される好気呼吸を担うもの(aa_3 タイプ酵素)や細菌の微好気呼吸を担うもの(cbb_3 タイプ酵素)が存在する。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群とNOR群のゲノム解析と立体構造解析から、これらの酵素が進化的類縁関係にあるファミリーを形成し、非常によく似たコア構造(酵素機能上必須な分子構造)を持つことが明らかになった。このことは、末端酵素ファミリーにおけるエネルギー変換の分子機構が共通の動作原理に基づくことを示唆している。

aa_3 タイプ酵素は複数の複雑なプロトン輸送経路を有し、末端酵素ファミリー中で最も高いプロトンポンプ効率(電子伝達あたりのプロトン輸送数)を示す。古くから精製結晶化が試みられ、1995年に初めて結晶構造が決定された。本研究代表者は、1998年から現在まで牛ミトコンドリア由来の aa_3 タイプ酵素を用いてX線結晶構造解析を進めてきた。2010~2014年度には基盤研究Bの研究費補助を受け、 aa_3 と O_2 分子アナログとの結合構造を決定し、 O_2 還元部位の構造変化を見出した。

cbb_3 タイプ酵素は近年発見され、2010年に初めて結晶構造が決定された。 cbb_3 は、末端酵素ファミリー中で最も高い O_2 親和性と O_2 還元触媒活性を示す。また、 aa_3 と比べて単純な構造のプロトン輸送経路でプロトンポンプを行う。本研究代表者は、2010~2014年度の基盤研究Bにおいてコレラ菌由来の cbb_3 の活性測定系を確立し、 cbb_3 の電子受容効率が aa_3 と比べて顕著に高いことを明らかにした。

NORは2010年に初めて結晶構造が決定された。NORは弱い O_2 還元触媒活性を示すが、プロトンポンプ機能を持たない。本研究代表者は、緑膿菌由来のチトクロムc依存性NOR(cNOR)と髄膜炎菌由来のキノール依存性NOR(qNOR)の構造機能解析を、それぞれ2014年度と2015年度から開始した。

2. 研究の目的

aa_3 、 cbb_3 、cNOR、qNORの構造に基づいて、電子伝達機構と基質の還元触媒機構を明らかにすること、各酵素の構造と機能の比較から、電子伝達およびエネルギー変換機構の普遍的原理、機能多様性に関わる構造要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

aa_3 については、エネルギー変換機能に関わる構造変化をX線結晶解析によって高精度で決定した。さらに構造に基づいてアミノ酸残基のpKa値を計算により求めた。 cbb_3 については、電子伝達効率の特性を明らかにするため、シトクロム c_4 の酸化活性を分光法により測定した。cNORについては、電子伝達効率の特性を明らかにするため、シトクロム c_{551} およびアズリンの酸化活性を分光法により測定した。qNORについては、活性型酵素の構造を決定するため、酵素の単離・精製・結晶構造解析を行った。さらに、電子伝達機構を明らかにするため、キノールの酸化活性および活性阻害剤の効果を電極法により測定した。

4. 研究成果

aa_3 タイプ

阻害剤(シアン化物イオン)結合構造 本酵素の活性阻害剤であるシアン化物イオン(CN^-)は酸化型の酵素触媒部位に結合する。休止酸化型酵素の結晶をKCN溶液に浸すことによって CN^- 結合酸化型酵素の結晶を作製し、X線結晶解析により CN^- の結合様式、および CN^- の結合に伴う酵素構造の変化を2.0 Å分解能で決定した。その結果、 CN^- は酸化型触媒部位のヘム鉄に結合し、C-N軸がヘム面に対してほぼ垂直の結合構造であることを明らかにした。さらに、 CN^- 結合酸化型酵素と休止酸化型酵素の構造を比較した結果、休止酸化型の触媒部位に結合している過산화物イオンは CN^- と置き換わることが分かった。触媒部位以外の酵素の構造に関しては、 CN^- 結合酸化型と休止酸化型とで顕著な違いは見られなかった。〔雑誌論文3〕

電子伝達に伴う構造変化 O_2 還元反応過程での電子伝達に伴い、触媒部位を含めた4つの金属部位では酸化還元状態が変化する。酸化還元に伴う構造変化を明らかにするため、全ての部位が酸化状態にある酵素(休止酸化型)と全てが還元状態の酵素(還元型)のX線結晶解析をそれぞれ1.5 Åと1.6 Å分解能で行った。その結果、酵素内部(触媒部位付近)にあるマグネシウムイオン結合部位と接する水分子のクラスター構造の酸化還元に伴う構造変化を決定した。構造変化が電子伝達経路の僅かな構造変化と共役することから、水分子の動きは電子移動と共役したプロトン輸送機能を担うことが示唆される。〔雑誌論文2 学会発表 10, 20〕

酵素反応中間体の構造 O_2 還元反応の過程では、還元(R)型の触媒部位に O_2 が結合し、O-O結合が開裂した後、4つの電子が触媒部位へ段階的に移動する。それに伴い酵素反応中間体(A, P, F, O, E, R)が順次生成される。各中間体は分光学的手法により同定されている。P-F, F-O, O-E, E-Rの各遷移はプロトンポンプを伴う。一方で、休止酸化型の触媒部位への電子移動ではプロトンポンプは起こらない。還元型酵素結晶と O_2 を反応させ、結晶の可視吸収スペクトル測定

によりO型を確認し、1.6 Å分解能での結晶構造解析を行った。その結果、還元型触媒部位には存在しなかった2個の酸素原子がO型の触媒部位に結合しているのが確認された。この酸素原子の構造は休止酸化型の触媒部位に結合している過酸化イオンの構造とは異なっていた。さらに、休止酸化型構造では見られなかった水分子がO型の触媒部位付近に観測された。〔学会発表16〕

プロトン移動経路のpKa解析 牛ミトコンドリア由来の aa_3 タイプ酵素にはマグネシウムイオン1個とナトリウムイオン1個が含まれる。これまでに、これらのイオン結合部位が酸素還元反応と共役したプロトン輸送に関与することが示唆されている。一方で、細菌由来の aa_3 タイプ酵素にはナトリウムイオンに替わってカルシウムイオン1個が含まれる。本研究では、これらのイオンのリガンド分子のプロトン化状態を理解するため、pKa解析を行った。その結果、マグネシウムイオンのリガンドである2つのカルボキシル基と、ナトリウムイオンまたはカルシウムイオンのリガンドである1つのカルボキシル基は脱プロトン化状態であることが示唆される。〔学会発表3〕

cbb_3 タイプ

電子伝達の特性 末端酵素ファミリーの電子伝達の特性を比較するため、コレラ菌由来の cbb_3 タイプ酵素と牛ミトコンドリア由来の aa_3 タイプ酵素について O_2 消費速度と電子伝達体酸化速度を測定した。電子供与体としてアスコルビン酸、メディエーターとしてTMPDを用いて、 O_2 消費速度を測定した結果、 cbb_3 は aa_3 と比べて顕著に高い O_2 消費速度を示し、速度は中性領域で高くアルカリ領域で低くなることが分かった。 aa_3 の電子伝達体としてウマ由来のシトクロム c 、 cbb_3 の電子伝達体としてコレラ菌由来のシトクロム c_4 を用いて、還元型電子伝達体の酸化速度を測定した結果、 aa_3 は cbb_3 と比べて高い酸化速度を示し、速度は aa_3 では酸性領域で高く、 cbb_3 では中性領域で高くなることが分かった。電子伝達速度を比べた結果、 aa_3 ではシトクロム c の方がTMPDよりも顕著に高くなることが分かった。一方、 cbb_3 ではTMPDの方がシトクロム c_4 よりも高くなることが分かった。〔学会発表13〕

NO還元酵素

cNORの電子伝達の特性 末端酵素ファミリーの電子伝達の特性を比較するため、cNORによるシトクロム c_{551} (Cyt c_{551})およびアズリン(Az)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。電子供与体としてアスコルビン酸、メディエーターとしてTMPDを用いて、cNORによるNO消費速度と O_2 消費速度を測定した結果、pH 7.0、25 °Cにおける電子伝達速度はNOでは 12 s^{-1} 、 O_2 では 6.0 s^{-1} であった。 O_2 を電子受容体としてcNORによる還元型Cyt c_{551} と還元型Azそれぞれの酸化速度を吸光度変化により測定した結果、pH 7.0、25 °CにおけるCyt c_{551} 酸化反応の速度論的パラメーターは $k_{\text{cat}} =$

8.6 s^{-1} 、 $K_m = 4.0 \mu\text{M}$ であった。一方、Az酸化反応では $k_{\text{cat}} = 11.5 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_m = 19 \mu\text{M}$ であった。pHを5.0から9.0の範囲で変化させた場合、いずれのpHにおいても k_{cat} はAzの方がCyt c_{551} よりもやや高く、 K_m はCyt c_{551} の方がAzよりも顕著に低いことが分かった。pHの低下に伴いCyt c_{551} 、Azともに k_{cat} が顕著に上昇した一方で、 K_m はやや上昇した。従って、 k_{cat}/K_m はpHの低下に伴い上昇することが分かった。〔学会発表4, 14〕

qNORの結晶構造解析 活性型 qNORの高分解能構造を決定することを目的として、髄膜炎菌由来のqNORを精製し、結晶構造解析を行った。結晶化条件を検討した結果、3.5 Å分解能の電子密度図が得られた。〔学会発表1, 2, 5, 15〕

qNORの電子伝達の特性 キノールから髄膜炎菌qNORへの電子伝達に対して、キノールアナログ分子(HQNO)の結合が及ぼす効果を調べた。水溶性キノールであるメナジオール(MD)を電子供与体として用いて、MD濃度とHQNO濃度を変化させたときのNO消費速度を測定した。解析の結果、HQNOは髄膜炎菌qNORの阻害剤として働き、その阻害形式は非競合的であることが分かった。よって、qNORの電子伝達(プロトン輸送)経路の構造がHQNOの結合によって変化し、その結果阻害効果が現れることが示唆される。〔学会発表1〕

qNORの電荷移動の特性 qNOR中での電子とプロトンの移動方向について、精製された髄膜炎菌qNORを膜小胞に組み込んだ再構成系を用いて調べられた。その結果、髄膜炎菌qNORはNO還元反応に必要なプロトンを細胞質領域から取り込むことにより、膜電位を生成することが示唆される。〔雑誌論文1〕

末端酵素ファミリー

プロトン移動経路の構造解析 末端酵素ファミリーの大多数の構造において、膜貫通領域と細胞外領域との境界面は水分子クラスターを含み、プロトンの輸送経路の一部であると提唱されている。9種類の酵素の境界面構造を比較するため、分子表面計算を行った。その結果、水分子クラスターは外界の溶媒領域から隔離されており、タンパク質内部と外界とのプロトン移動には局所的な構造変化または特定のアミノ酸残基のプロトン化/脱プロトン化が必要なが分かった。〔学会発表6〕

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 3件)

1. Gonska N, Young D, Yuki R, Okamoto T, Hisano T, Antonyuk S, Hasnain SS, Muramoto K, Shiro Y, Toshi T, Ädelroth P.

Characterization of the quinol-dependent nitric oxide reductase from the pathogen *Neisseria meningitidis*, an electrogenic enzyme. *Scientific Reports* **8**, 3637 (2018).

2. Yano N[#], Muramoto K[#], Shimada A[#], Takemura S, Baba J, Fujisawa H, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S. (#equal contribution) The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome *c* oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle. *J. Biol. Chem.* **291**, 23882-23894 (2016).
3. Yano N, Muramoto K, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T. X-ray structure of cyanide-bound bovine heart cytochrome *c* oxidase in the fully oxidized state at 2.0 Å resolution. *Acta Cryst.* **F71**, 726-730 (2015).

[学会発表](計 22件)

1. 岡本拓也、Arif Jamali、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵素の結晶化と速度論的解析 **日本生体エネルギー研究会第42回討論会** (京都,2017)
2. Jamali MMA, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y. Crystallization of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Neisseria meningitidis*. *University of Hyogo Leading Program International Symposium 2017* (Kamigohri, Hyogo, 2017)
3. 村本和優 pKa analysis of the proton transfer pathway in respiratory A-type heme-copper oxygen reductase. **日本生物物理学会第55回年会** (熊本, 2017)
4. 村本和優、大島海人、當舎武彦、城宜嗣 緑膿菌一酸化窒素還元酵素によるシトクロム *c₅₅₁* およびアズリン酸化反応の速度論的解析 **日本生体エネルギー研究会第42回討論会** (名古屋, 2016)
5. 結城力、岡本拓也、David Young、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵素の活性測定と結晶化 **日本生体エネルギー研究会第42回討論会** (名古屋, 2016)
6. 村本和優 Structural analysis of the proton transfer pathway in respiratory heme-copper oxygen reductase superfamily. **日本生物物理学会第54回年会** (つくば, 2016)
7. Inoue M, Shibata A, Imai M, Uchida T, Muramoto K, Shiro Y, Yoshikawa S, Ishimori K. Structural and functional characterization of nanodisc-reconstituted cytochrome *cbb₃* oxidase from *Vibrio cholerae*. **日本生物物理学会第54回年会** (つくば, 2016)
8. Shimada A, Yano N, Muramoto K, Yamashita E, Shinzawa-Itoh K, Tsukihara T, Yoshikawa S. High-resolution crystal structure of cytochrome *c* oxidase reveals the mechanism of highly efficient proton pumping. **日本生物物理学会第54回年会** (つくば, 2016)
9. 月原富武、島田敦広、矢野直峰、村本和優、新澤・伊藤恭子、山下栄樹、吉川信也 Detailed crystal structural studies of bovine cytochrome oxidase to elucidate the coupling mechanism of dioxygen reduction and proton pump. **日本生物物理学会第54回年会** (つくば, 2016)
10. Yoshikawa S, Yano N, Muramoto K, Shimada A, Baba J, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Tsukihara T. The Mg²⁺-containing water cluster of mammalian cytochrome *c* oxidase collects four pumping proton equivalents in each catalytic cycle. *The 19th European Bioenergetics Conference* (Riva del Garda, Italy, 2016).
11. 結城力、岡本拓也、David Young、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 髄膜炎菌由来一酸化窒素還元酵素の精製と結晶化 **第16回日本蛋白質科学会年会** (福岡, 2016)
12. 島田敦広、馬場淳平、山下栄樹、村本和優、伊藤-新澤恭子、月原富武、吉川信也 チトクロム酸化酵素の様々な反応中間体及び反応中間体類似物の構造から提唱されるプロトンポンプ機構 **第16回日本蛋白質科学会年会** (福岡, 2016)
13. 村本和優 呼吸鎖電子伝達系プロトンポンプ性酸素還元酵素の電子伝達活性 **日本生体エネルギー研究会第41回討論会** (東京, 2015)
14. Oobatake K, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y. Co-crystallization and kinetic analysis of nitric oxide reductase and electron transfer proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *3rd International Picobiology Institute Symposium* (Kamigohri, Hyogo, 2015).
15. Yuki R, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y.

Purification and crystallization of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Neisseria meningitidis*. *3rd International Picobiology Institute Symposium* (Kamigohri, Hyogo, 2015).

16. 村本和優 Structural analysis of respiratory O₂ reductase in the reaction intermediate state. **日本生物物理学会第53回年会** (金沢, 2015)
17. 大島海人、村本和優、當舎武彦、城宜嗣 緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素と電子供与タンパク質の精製及び共結晶化 **第15回日本蛋白質科学会年会** (徳島, 2015)
18. 月原富武、島田敦広、島田悟、武村秀平、馬場淳平、村本和優、山下栄樹、伊藤・新澤恭子、吉川信也 高分解能 X 線結晶構造解析によるチトクロム酸化酵素の酸素還元・プロトンポンプ機構の解明 **第15回日本蛋白質科学会年会** (徳島, 2015)
19. 馬場淳平、島田敦広、山下栄樹、村本和優、伊藤・新澤恭子、月原富武、吉川信也 シアン結合完全還元型チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析から明らかになった、活性中心を構成する heme a₃ の高い可動性 **第15回日本蛋白質科学会年会** (徳島, 2015)
20. 島田敦広、矢野直峰、武村秀平、村本和優、山下栄樹、伊藤・新澤恭子、前田友子、月原富武、吉川信也 チトクロム酸化酵素内の Mg を含む水クラスターが酸素取り込み前に4等量のプロトンを蓄積することで、高効率プロトンポンプ反応を可能にする **第15回日本蛋白質科学会年会** (徳島, 2015)
21. 江藤勇樹、島田敦広、前田友子、山下栄樹、村本和優、伊藤・新澤恭子、月原富武、吉川信也 チトクロム酸化酵素 F 型中間体の高分解能 X 線結晶構造解析 **第15回日本蛋白質科学会年会** (徳島, 2015)
22. Oobatake K, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y. Purification and co-crystallization of nitric oxide reductase and electron transfer proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *RIKEN Symposium "Metals in Biology" in Wako* (Wako, Saitama, 2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村本 和優 (MURAMOTO, Kazumasa)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・
准教授

研究者番号：50305679

{ その他 }

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/edu/kenkyuu/base20.html>