

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03646

研究課題名(和文)ATP合成に関わるミトコンドリア呼吸鎖超複合体とATP合成酵素の高分解能構造解析

研究課題名(英文)High-resolution structural analysis of mitochondrial supercomplex and ATP synthase involved in ATP synthesis

研究代表者

伊藤 恭子(新澤恭子)(Shinzawa-Itoh, Kyoko)

兵庫県立大学・生命理学研究科・特任准教授

研究者番号：70206316

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 13,520,000円

研究成果の概要(和文):ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、III、IVは電子伝達に伴いプロトン能動輸送を行い、そのプロトン駆動力により複合体VはATPを合成する。又複合体I、III、IVは、超複合体を形成している。ウシ心筋ミトコンドリア膜から無傷で精製した超複合体と各複合体の機能と構造を比較し、それらの複合体間の相互作用を構造と機能から解明を試みた。これまで複合体の2量体構造解明が進められてきたが、ミトコンドリア内では単量体が活性型として機能し、カルジオリピンを介して複合体と相互作用していることを見出した。超複合体中の複合体のラマン分光法による解析から超複合体形成に伴う大きな構造変化はない事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2量体結晶構造が詳細に解明されてきた複合体は、膜内及び超複合体内では単量体で存在し、単量体が活性型である事を示した。単量体結晶のX線結晶構造はカルジオリピンが複合体の2量体形成ではなく複合体との相互作用に関わることを示した。超複合体と各複合体混合溶液の振動分光光学解析は会合が活性中心の大きな構造変化を伴わない事を示した。また、高い呼吸活性を示すが、比較的飽和度が低く短鎖の脂質を含む流動性のある膜内で、密度を及び電子伝達体の割合を高くすることにより超複合体形成を伴わないで効率の良いATP合成を可能にしているショウジョウバエの適応は、ミトコンドリア内でのATP産生調節の多様性を示した。

研究成果の概要(英文):Mitochondrial respiratory complex I, III and IV organized into super complex convert energy from a series of electron transfer into a proton electrochemical gradient, harvested by complex V for synthesis of ATP. The structure and functions of the super complex and each respiratory complex, purified from bovine heart to retain their original structure and functions, were compared. In all crystals reported to date, bovine complex IV exists as a dimer. Based on the structural and functional comparison of the monomer and dimer, we propose that the monomer is the activated form. Two cardiolipins are located at the interface region in the super complex. The visible resonance Raman spectra of purified reactive super complex and mixture of its individual components enabled us to discuss the detailed active site structures, but no detectable differences were observed. This indicates that the formation of a super complex did not markedly change the structure or electronic state of heme.

研究分野：生物化学

キーワード：呼吸鎖超複合体 ATP合成酵素 ミトコンドリア 呼吸鎖電子伝達系 複合体

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に存在する複合体 I (NADH ユビキノン酸化還元酵素)、複合体 III (チトクロム bc₁ 複合体)、複合体 IV (チトクロム酸化酵素) が電子伝達に伴ってプロトンをミトコンドリア内膜の内側から外側へと能動輸送しプロトンの濃度勾配を形成する。そのプロトンの濃度勾配を利用し F₀F₁-ATP 合成酵素 (複合体 V) が ATP を合成している。これらは生体エネルギー産生において非常に重要な働きを担っているため、個々の酵素複合体の X 線結晶構造解析や単粒子構造解析が行われ、複合体 I, III, IV は原子レベルの全体構造が報告されてきている。我々は全ての複合体の 2 次元又は 3 次元結晶化を行い、中でも複合体 IV 2 量体の X 線結晶構造解析については、酸化還元や配位子結合に伴う構造変化等を 1.8 Å 分解能以上で捉え構造に基づく反応機構の解明を勢力的に進めてきた。しかし、ATP 合成を行う複合体 V は単粒子構造解析による全体構造が発表されたが、真の原子レベルの全体構造は解明されていない。

(1) 超複合体

-各呼吸鎖複合体間の相互作用-

複合体 I, III, IV はミトコンドリア膜中で制約された超 4 次構造である超複合体を形成している。どのように相互作用して機能しているかを解明するために、超複合体の電子線単粒子構造解析がなされ、2016 年に 4 Å 分解能の構造が報告された (Wu ら, Cell)。しかし、相互作用を原子レベルで議論できるレベルには至っていない。我々はウシ心筋ミトコンドリアから再現性良く超複合体を精製する方法を確立した。この超複合体は複合体 I、複合体 III × 2、複合体 IV とユビキノン (Q₁₀) 6 分子を含んでおり、チトクロム c 添加により KCN 感受性の NADH 酸化活性を示した。この機能を保持した超複合体標品は、共鳴ラマン分光法による相互作用研究を可能とした (Shinzawa-Itoh K., *et. al. J. Biol Chem.* 2016)。我々はフッ素化界面活性剤を適用し複合体 IV とチトクロム c との共結晶化に成功し、2 Å 分解能での構造から両者の間の新しい結合様式を明らかにした (Shimada S., Shinzawa-Itoh K. *et. al. EMBO J.* 2017)。

(2) 複合体 V

複合体 V は親水部の F₁ については高分解能 X 線結晶構造が得られているが、疎水部 F₀ については c リング以外原子レベルでの構造解明には成功していない。我々はウシ心筋から複合体 V を特異的阻害剤であるオリゴマイシンに対する感受性を保持したまま非常に高い収率 (2 日間の精製で 300mg 程度) で精製する方法を確立した。この標品には 17 種すべてのサブユニットが確認され、この標品を用いた 2 次元結晶化 (Jiko C., *et. al. Elife.* 2015) や、LMNG (lauryl maltose-neopentyl glycol) に交換した標品を用いた単粒子構造解析を行ってきた (Hauer F., *et. al. Structure.* 2015)。精製された酵素は、3 週間以上その活性とオリゴマイシンに対する感受性を保持していた。

2. 研究の目的

ミトコンドリア内膜では、複合体 I、複合体 III、複合体 IV が超 4 次構造をとった超複合体を形成し電子伝達に伴ってプロトン能動輸送を行い、それらによって形成されたプロトン駆動力により複合体 V が ATP を合成する。本研究では、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体の精製結晶化と、ミトコンドリア膜中での機能を保持した超複合体の調製に成功してきた経験を生かし、超複合体と、複合体 V の全体および F₀ 部分について構造を明らかにし、これらのミトコンドリア呼吸鎖複合体がミトコンドリア内でどのように連携して機能し生命現象に必須である ATP 合成を行っているかを解明する。

3. 研究の方法

単離精製し、その精製された複合体を用いて複合体 I, III, IV からなる超複合体の構造と複合体 V の全体の X 線結晶構造から ATP 合成の仕組みを明らかにする。超複合体は、ジギトニンか Amphipol のような両親媒性高分子以外では各複合体へと解離しやすいので、(i) 調製法が確立されている Amphipol 標品を脂質環境へ移行、(ii) ジギトニンで可溶化された標品の安定化の検討を行い、結晶化を行う。(iii) 個々の複合体の構造をより詳細に解明し、複合体中での互いの相互作用を考察する。

複合体 V は、既に得られている長期間安定な標品を用いて、3 次元結晶化条件を網羅して検討する。既に 2 次元結晶を得る方法は確立されているので脂質を用いた環境での結晶化法も詳細に検討する。プロトンの流入を行う F₀ 部分の構造解明を目指し、膜中部分の sub-complex の調製法の確立を行う。またこの膜中部分の結晶化には脂質メソフェーズ法が最適であると考え、脂質メソフェーズ法による結晶化を行う。

4. 研究成果

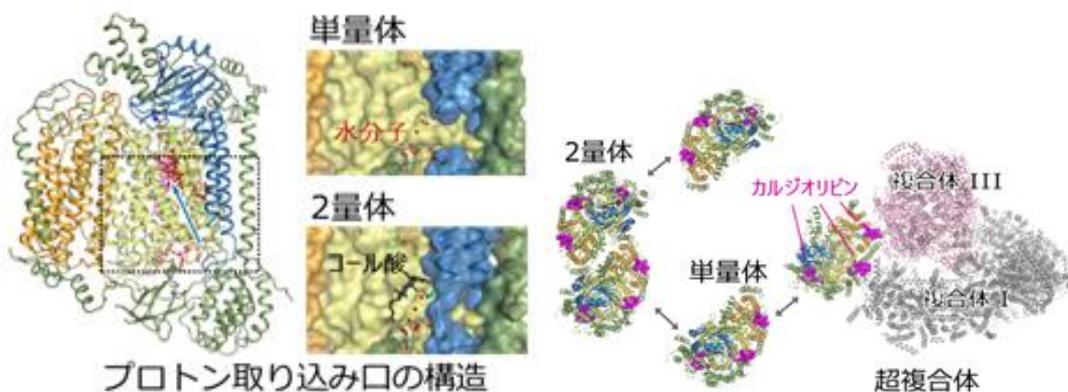
(1) 超複合体

超複合体と、超複合体を構成する複合体 I、複合体 III の 2 量体、複合体 IV 単量体をウシ心筋ミトコンドリアから、ミトコンドリア膜内での構造と機能を保持した状態で単離精製することを可能とした (Shinzawa-Itoh K., *et. al. J. Biol Chem.* 2016, Shimada S., *et. al. Protein Expr Purif.* 2018)。超複合体は膜からジギトニンを用いて可溶化後、両親媒性高分子である Amphipol に置き換えて安定化した。構成する各複合体は、界面活性剤としてデシルマルトシド (DM) を用いて精製された。これらについても超複合体との比較が可能ないように Amphipol に置き換えた標品も調製した。

① 超複合体中での複合体 IV の構造

複合体 IV の 2 量体構造は既に解明されていたが、ミトコンドリア膜中では、主に単量体及び単量体が他の複合体と会合した超複合体として存在する。Amphipol を用いることにより複合体 IV 単量体と 2 量体それぞれの状態で安定化させ、単量体と 2 量体の酵素活性を厳密に比較した。その結果、単量体の方が高い活性を示したことから、単量体は「活性型」であり、2 量体は活性化するための「待機型」である可能性が示された。

単量体酵素の結晶化に適した界面活性剤を見つけるため、有機合成の手法により幾種類もの界面活性剤を新規に創りだし結晶化を試みた所、3-オキサトリデシル- α -D-マンノシド (30M) という界面活性剤を使う事により単量体酵素の結晶を得ることに成功した。その単量体結晶の X 線結晶構造を原子レベル (1.8 Å 分解能) で決定することができた。その比較から、単量体化により酸素を水へ変換するために必要なプロトンを取り込むための入り口の構造が変化し、プロトンの取り込みが促進され、単量体化による酵素の活性化が起きることがわかった。



また、2 量体構造はカルボキシ分子が結合することによって安定化されていたことから、生体内の環境ではカルボキシに類似した生体物質が結合解離することによって、酵素の状態が「待機型」と「活性型」とに変換されると推察される。更に、単量体構造解析からは酵素に結合しているカルシウムイオンが、複合体 IV が複合体 I と III と会合し超複合体を形成するのに関わることが明らかとなった。超複合体の形成は酸素還元反応に必要な電子伝達の効率化や酵素自体の安定化に関わると考えられている。このように、単量体、2 量体、超複合体と形態を変化させて活性を制御するしくみは、生体内でのエネルギー生産のバランス制御において重要であると考えられる (Shinzawa-Itoh K., *et. al. PNAS.* 2019)。

② ラマン分光法により超複合体形成意義を探る

超複合体と構成する各複合体を Amphipol により安定化された状態で調製した。

超複合体、構成する各複合体を複合体 I : 複合体 III の 2 量体 : 複合体 IV の単量体を超複合体の存在比と同じように混合した MIX 標品、複合体 IV 単量体の Amphipol で安定化されたを準備し、複合体形成の意義を化学反応性の観点から明らかにすることを目的とし、複合体 IV の活性中心の電子状態に与える影響を振動分光法により調べることを行った。各状態の酵素複合体の還元型、C=O 結晶型のラマンスペクトルから、鉄-His と鉄-CO の伸縮振動を検出した。1.7MDa と巨大な超複合体でも精度よく微小な変化をとらえることのできるレベルでの測定が可能となった。

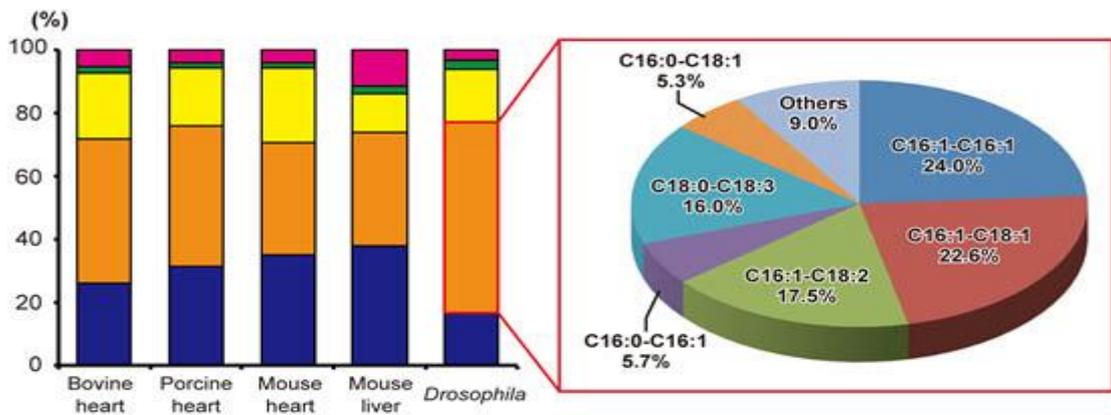
しかし、単独、または MIX 中の複合体 IV 単量体と、超複合体中で複合体 I、III と会合している状態での複合体 IV の違いを議論できるレベルでの差は認められなかった。その結果、複合体 IV には超複合体形成により、大きい構造変化が認められないことがわかった。

③超複合体を形成しない生物の適応

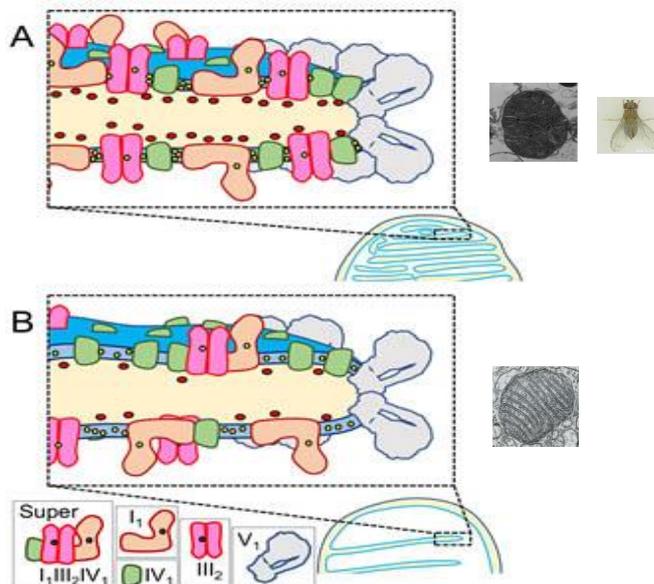
呼吸鎖複合体は哺乳類、酵母、細菌の膜の中で、超複合体を形成し、電子伝達の効率化や活性酸素の発生の抑制、各複合体の安定化に寄与していると考えられている。ウシ心臓、ブタ心臓、マウスの心臓、マウス肝臓及びショウジョウバエのミトコンドリアをジギトニンで可溶化しBN-PAGEにより可溶化された複合体を分離すると、ウシとブタでは1.7MDaの複合体I, III, IVからなる超複合体が、マウスでは1.5MDaのcomplex I, IIIからなる超複合体の存在が確認された。しかし、最も高い酸素消費活性を示したショウジョウバエのミトコンドリアでは超複合体は認められず、他の動物では認められなかった複合体Vの2量体が確認された。

各ミトコンドリアにおける、複合体IVに対する電子伝達体であるチトクロム *c* とユビキノンの定量を行ったところ、ショウジョウバエでどちらも含有量が高かった。タンパク質に対する脂質の比はショウジョウバエで最も低い値を示した。ミトコンドリアを構成する脂質の種類を求めたところ、ショウジョウバエでは他の動物に比べ C16:1-C16:1 の脂肪酸を持つホスファチジルエタノールアミン (PE) が非常に高い割合で含まれていた。

ショウジョウバエミトコンドリア内膜は複合体Vの2量体により非常に密に折りたたまれている。ショウジョウバエの飛翔を支えるATPの効率の良い供給は、超複合体を形成することなく呼吸鎖複合体が比較的流動性が高く、不飽和度が低く活性酸素により酸化がされにくいリン脂質膜中に密に存在し、電子伝達体の含有量を増やすことにより可能にしていることが考えられる (Shimada S., *et. al. Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018)



各生物種のミトコンドリア膜を構成する脂質 オレンジ：PE 右はショウジョウバエのPEを構成する脂肪酸の組成



ミトコンドリア内膜 (A;ショウジョウバエ、B:ウシ) での呼吸鎖複合体の存在様式の模式図

(2)ATP 合成酵素

ミトコンドリア膜内の各複合体 (I, III, V) の再現性良く高効率で精製する方法は論文としてまとめた(Shimada S., et.al. *Protein Expr Purif.* 2018)。

プロトンの流入を行う F₀部分の構造解明を目指し、膜中部分の sub-complex の調製法の確立を行った。この膜中部分の結晶化には脂質メソフェーズ法が最適と考え、脂質メソフェーズ法を適用し結晶化を試みたが結晶を得るまでには至らなかった。

本精製標品を膜へ再構成し、複合体 V が Ca²⁺に依存したチャネルとして働くことがイタリアのグループとの共同研究で示され、論文投稿を行った(Urbani A., et.al. *Nat Commun.* 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimada S, Maeda S, Hikita M, Mieda-Higa K, Uene S, Nariai Y, Shinzawa-Itoh K	4. 巻 150
2. 論文標題 Solubilization conditions for bovine heart mitochondrial membranes allow selective purification of large quantities of respiratory complexes I, III, and V	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Expr Purif.	6. 最初と最後の頁 33-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2018.04.015	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 Luo F, Shinzawa-Itoh K, Hagimoto K, Shimada A, Shimada S, Yamashita E, Yoshikawa S, Tsukihara T.	4. 巻 74
2. 論文標題 Structure of bovine cytochrome c oxidase in the ligand-free reduced state at neutral pH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.	6. 最初と最後の頁 92-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X17018532.	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 Li C, Nishiguchi T, Shinzawa-Itoh K, Yoshikawa S, Ogura T, Nakashima S.	4. 巻 2728
2. 論文標題 Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation states and polarity changes in carboxyl groups in a large membrane protein, mammalian cytochrome c oxidase, under turnover conditions in a sub-millisecond time resolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Bioenerg.	6. 最初と最後の頁 30131-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabbio.2018.05.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada A, Hatano K, Tadehara H, Yano N, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S.	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 J Biol Chem.	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 -

1. 著者名 Shimada S, Oosaki M, Takahashi R, Uene S, Yanagisawa S, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K.	4. 巻 1859
2. 論文標題 A unique respiratory adaptation in Drosophila independent of supercomplex formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta.	6. 最初と最後の頁 154-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2017.11.007.	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 K., Sugimura T., Misaki T., Tadehara Y., Yamamoto S., Hanada M., Yano N., Nakagawa T., Uene S., Yamada T., Aoyama H., Yamashita E., Tsukihara T., Yoshikawa S., and Muramoto K.	4. 巻 116
2. 論文標題 6. Monomeric structure of an active form of bovine cytochrome c oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	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 Urbani A., Giorgio V., Carrer A., Franchin C., Arrigoni G., Jiko C., Abe K., Maeda S., Shinzawa-Itoh K., Bogers JFM, McMillan DGG, Gerle C., Szabograve; I., Bernardi P.	4. 巻 25
2. 論文標題 Purified F-ATP synthase forms a Ca ²⁺ -dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 4341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12331-1	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 Ueno G, Shimada A, Yamashita E, Hasegawa K, Kumasaka T, Shinzawa-Itoh K, Yoshikawa S, Tsukihara T, Yamamoto M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Low-dose X-ray structure analysis of cytochrome c oxidase utilizing high-energy X-rays	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Synchrotron Radiat.	6. 最初と最後の頁 912-921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577519006805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinpei Uno, Takahiro Masuya, Kyoko Shinzawa-Itoh, Tomoo Shiba, Daniel Ken Inaoka, Masatoshi Murai, and Hideto Miyoshi	4. 巻 295
2. 論文標題 9.Oversized ubiquinones as a molecular probe for structural dynamics of the ubiquinone reaction site in mitochondrial respiratory complex I	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 2449-2463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao T, Yasunori Shintani, Takaharu. Hayashi, Hidetaka Kioka, Hisakazu Kato, Yuya Nishida, Satoru Yamazaki, Osamu Tsukamoto, Shohei Yahshirogi, Yoshihiro Asano, Kyoko Shinzawa-Itoh, Hitomi Imamura, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki, Yu-ichi Goto, Seiji Takashima	4. 巻 34
2. 論文標題 10.Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 1859-1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada A, Etoh Y, Kito-Fujisawa R, Sasaki A, Shinzawa-Itoh K, Hiromoto T, Yamashita E, Muramoto K, Tsukihara T, Yoshikawa S.	4. 巻 295
2. 論文標題 11.X-ray structures of catalytic intermediates of cytochrome c oxidase provide insights into its O2 activation and unidirectional proton-pump mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato W, Hitaoka S, Uchida T, Shinzawa-Itoh K, Yoshizawa K, Yoshikawa S, Ishimori K.	4. 巻 477
2. 論文標題 Osmotic pressure effects identify dehydration upon cytochrome c-cytochrome c oxidase complex formation contributing to a specific electron pathway formation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 1565-1578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyoko Shinzawa-Itoh
2. 発表標題 Solubilization conditions for bovine heart mitochondrial membranes allow selective purification of large quantities of respiratory complexes I, III, and V
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyoko Shinzawa-Itoh
2. 発表標題 A unique respiratory adaptation in Drosophila independent of supercomplex formation.
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤(新澤)恭子
2. 発表標題 Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel interprotein interaction mode
3. 学会等名 第19回国際生物物理学(International Union for Pure and Applied Biophysics : IUPAB)大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤(新澤)恭子
2. 発表標題 Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel interprotein interaction mode
3. 学会等名 第9回国際構造生物学会 (9th International Conference on Structural Biology) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤(新澤)恭子
2. 発表標題 ショウジョウバエのミトコンドリアにおける超複合体形成によらない独特の呼吸適応
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	柳澤 幸子 (Yanagisawa Sachiko) (60557982)	兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授 (24506)	
研究協力者	石野 恭子 (Ishino Kyoko)	兵庫県立大学 (24506)	
連携研究者	村本 和優 (Muramoto Kazumasa) (50305679)	兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授 (24506)	
連携研究者	山下 栄樹 (Yamashita Eiki) (00294132)	大阪大学・蛋白質研究所・准教授 (14401)	