

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14635

研究課題名(和文)XFEL時分割構造解析によるチトクロム酸化酵素の反応機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of reaction mechanism of cytochrome c oxidase using XFEL time-resolved structure analysis

研究代表者

島田 敦広 (Shimada, Atsuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：80723874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロム酸化酵素(CcO)は呼吸で取り込んだ酸素からエネルギーを生み出すタンパク質であり、生体エネルギー生産の中心を担っている。最近、本酵素の活性を制御することで過剰なエネルギー生産や活性酸素種の発生を抑制し肥満や糖尿病の予防につながることが示唆されており、CcOの反応機構解明は創薬などへの応用も期待されている。本研究では、CcOの大型結晶を用いて、CcOの反応中間体構造を複数決定することに成功した。さらに、高輝度極短パルスX線であるX線自由電子レーザー(XFEL)を用いて、CcOの微結晶から3.0 Å分解能程度の構造データの収集と、金属中心の価数データを収集することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトクロム酸化酵素(CcO)はミトコンドリア内膜に存在しており、酸素を水へと還元することで生命活動に必須のATPを合成する駆動力を生み出す。そのため、生体エネルギー論分野において、CcOの反応機構解明は最重要課題であり続けている。また、CcOによる酸素還元反応過程でほとんど活性酸素種といった有害な物質を産生しない。そのため、CcOの酸素還元中心の構造をもとに高効率で安全な人工触媒の設計も期待される。CcOの反応機構を理解するためには、その反応中間体構造の解明が不可欠である。本研究では、初めてCcOの生理学的な反応中間体の構造を高分解能で決定した。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome c oxidase (CcO), which generates bioenergy by catalyzing O₂ for maintain biological activity, is one of the most important protein in bioenergetics field. Recently, it was reported that the regulation of CcO activity prevents the production of excess energy and reactive oxygen species, which induce type-II diabetes and obesity. In this study, I succeeded in determining the catalytic intermediate structures of CcO using huge CcO crystal. Furthermore, 3.0 Å resolution diffraction images and X-ray emission spectrum (XES) data are successfully obtained by X-ray free electron laser. Since XES shows the electron states of metal centers in CcO, I can evaluate the accurate structure of CcO based on the coordinates of atoms and electron states.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 プロトンポンプ 金属タンパク質 ヘム 酸素還元

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) シトクロム酸化酵素(CcO)はミトコンドリア内膜に存在する巨大な膜タンパク質であり、ミトコンドリアマトリクスからプロトンを内膜外へとポンプすることで、膜電位とプロトン濃度勾配を生成する(図1A)(Yoshikawa S., et al., 2015, *Chem. Rev.*)。この膜電位とプロトン濃度勾配を利用して、ATP合成酵素によって生体内の大部分のATPが合成されており、CcOは生体エネルギー変換の中樞を担っている。そのため、CcOの反応機構解明は生体エネルギー論分野における最重要課題であり続けている。CcOの反応機構を理解するためには、反応過程の生理学的な中間体構造情報が不可欠である。これまで、最高分解能1.5 Åで様々な種類のCcOの結晶構造が決定されてきたが、いずれも安定な休止酸化型か還元型の構造であり、それ以外の反応中間体構造については分光学的に捉えられているだけであり、立体構造は不明であった。

(2) CcOにはわずか数ミリ秒で完結する反応サイクル中に6つの中間体が存在していることが分光学的に示唆されている(図1B)。従来のX線は高分解能データを収集するためには数百ミリ秒から数秒の露光時間が必要であり、CcOの反応中間体構造を捉えることが難しかった。X線自由電子レーザー(XFEL)は、従来のX線の約1000分の1秒(フェムト秒スケール)のパルスを持ち、短寿命の反応中間体を捉えることが可能である(Neutze R., et al., 2000, *Nature*)。申請者は酸素アナログである一酸化炭素結合型CcOを用いて、XFELによるポンプ-プローブ時分割実験を行い、一酸化炭素がCcOへ結合する過程の微細な構造変化を解明した(Shimada A., et al., 2017, *Sci. Adv.*)。しかし、生理学的な基質である酸素を使用していないため、生理学的な反応中間体の構造決定には至っていない。最近、米国のXFEL施設であるLCLSを用いて、CcOの微結晶から酸素還元反応中間体の構造を捉えることが試みられている(Ishigami I., et al., 2019, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)。しかし、分光学的に中間体を同定できておらず、反応サイクル中のどの中間体を捉えたのか不明である。

2. 研究の目的

(1) ケージド酸素化合物を浸透させたCcO結晶を用いてポンプ-プローブ時分割構造解析を行い、生理学的な反応中間体の構造を決定する。

(2) XFELの極短パルスX線を利用しても、得られる回折像には複数の反応中間体構造が混ざることが予想される。そこで、構造多型の占有率を正確に決定する方法をSPring-8にて凍結大型CcO結晶を用いて確立する。

3. 研究の方法

(1) XFEL施設であるSACLAにて実験を行なった。酸素結合とその代謝に伴うCcOの構造変化を捉えるためには、非凍結状態でXFELによる回折実験を行う必要がある。そこで、微結晶サンプルを高粘度媒体と混同してXFEL照射位置まで輸送する方法(SFX法)を採用して実験を行なった。

(2) CcOは過酸化水素処理を行うことでPおよびF型中間体へと変化することがCcO溶液を使用した実験でわかっている。そこで、CcOの大型結晶を用いて過酸化水素によって処理することで、反応中間体の大型結晶を調製し、調製した中間体構造をフリーズトラップすることでSPring-8にて高分解能構造データを収集した。

4. 研究成果

(1) CcO微結晶調製法の確立

回折データの分解能は結晶のサイズに比例するので、凍結大型結晶に比べてSFXで用いる微結晶では分解能の低下が予想される。CcOの微結晶を沈殿剤濃度を変更することで調整した結果、分解能は5.0 Åであった。そこで、SFX用にCcOの微結晶化法を検討した結果、高品質な大型結晶を砕いてシードとして利用することで、3.0 Å分解能

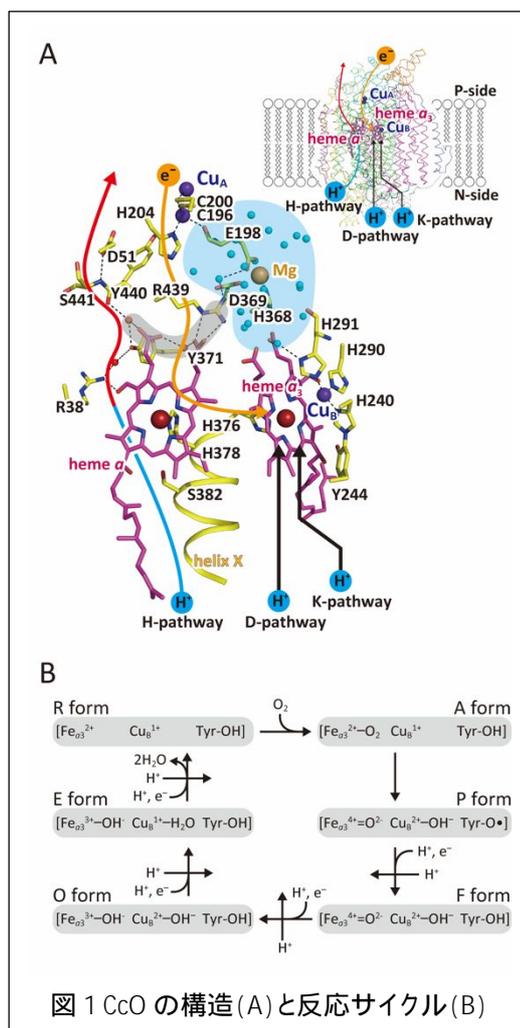


図1 CcOの構造(A)と反応サイクル(B)

のデータが得られるまでに改善することに成功した。しかし、まだ十分な分解能とは言えないため、 2.0 \AA を超える回折能が得られるように現在さらに結晶化条件の検討を行なっている。

(2) ポンプ-プローブ時分割実験法の確立

Ludovici らの報告しているケージド酸素化合物(Ludovici C., et al., 2002, *Eur. J. Biochem*) を合成し、XFEL での時分割ポンプ-プローブ実験に用いた。CcO 微結晶は温度と酸素に非常に感受性が高いため、低温嫌気環境下でのサンプル調整が必要である。そこで、低温嫌気環境で作業が可能なチャンバーを共同研究者と共に作成し、SACLA での実験に利用した。今後このチャンバーは他の SACLA でのタンパク質を用いた回折実験にも利用されることが期待される。

(3) X 線発光分光の測定

X 線回折とともに、金属の電子状態を評価可能な X 線発光分光 (XES) も同時に測定する条件を検討した。CcO の酸素還元中心はヘム鉄および銅イオンによって構成されており、CcO による酸素還元反応ではこれら金属中心から電子が順番に供給されることが示唆されている。これまでの X 線回折実験では構成原子の空間座標しか評価することができなかったため、同時に金属中心の電子状態を評価可能な XES も測定することができれば、CcO の反応機構をより精密に解析することが可能である。すでに、SACLA にて安定な休止酸化型の CcO の回折像とヘム鉄の XES を同時に測定することに成功した。現在、反応中間体の構造データと金属の電子状態データを収集するための実験条件の検討に取り掛かっているところである。

(4) P 型および F 型反応中間体の回折データの収集

SACLA での SFX 法を用いたポンプ-プローブ時分割実験と並行して、高分解能データの収集が期待できる凍結大型結晶を用いて SPring-8 にて中間体構造の決定を試みた。長辺が 0.5 mm 以上の休止酸化型 CcO の大型結晶を過酸化水素に寄って処理し、P および F 型中間体構造への変化を可視紫外吸収スペクトルから評価した。目的の中間体の蓄積を示すスペクトルを確認し凍結した CcO 結晶から、SPring-8 BL44XU にて 1.8 \AA 分解能のデータを収集することに成功した。

(5) 正確な構造多型決定法の確立

P 型および F 型中間体は休止酸化型から調製しているため、得られた電子密度には休止酸化型構造が混ざっている可能性が考えられた。そこで、電子密度の形だけでなく、温度因子に注目し、構造多型の評価を行なった。酸素還元中心は、休止酸化型では peroxide が結合しており、P/F 型中間体では酸素原子間の結合が切れて O^{2-} と OH になっていることが分光学的に予想される。そこで、それぞれの分子種を酸素還元中心に配置し、これら分子種が同等の温度因子となるように占有率を調整することで、最も妥当な休止酸化型と P/F 型中間体の占有率を決定した結果、休止酸化型は 10%、P/F 型中間体は 70%と決定された。残りの 20%は還元型構造であり、酸素還元中心にリガンドが結合していない状態であった。これは過酸化水素によって処理したことによって CcO の一部が還元された事によると考えられる。これら中間体の占有率を正確に見積もることによって、P/F 型中間体の酸素還元中心の構造を決定することに成功した(図 2)。

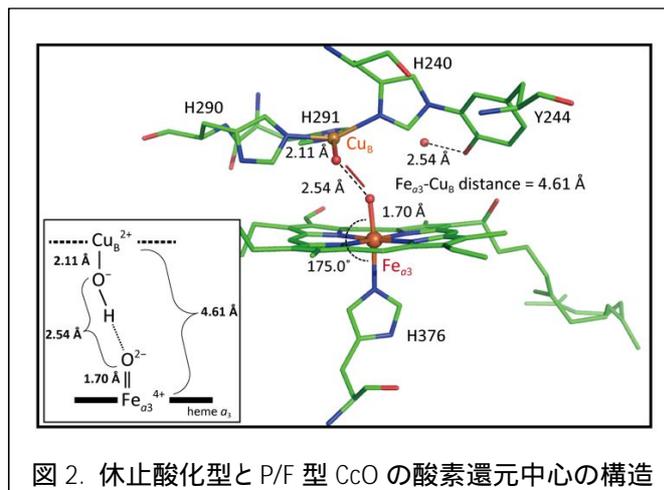


図 2. 休止酸化型と P/F 型 CcO の酸素還元中心の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueno Go, Shimada Atsuhiko, Yamashita Eiki, Hasegawa Kazuya, Kumasaka Takashi, Shinzawa-Itoh Kyoko, Yoshikawa Shinya, Tsukihara Tomitake, Yamamoto Masaki	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 Journal of Synchrotron Radiation	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Baba Seiki, Shimada Atsuhiko, Mizuno Nobuhiro, Baba Junpei, Ago Hideo, Yamamoto Masaki, Kumasaka Takashi	4. 巻 52
2. 論文標題 A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Crystallography	6. 最初と最後の頁 699 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600576719006435	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 Atsuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Structure Changes Induced by O_2 -binding Tightly Regulate the Proton-pumping of Cytochrome <i>c</i> Oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 106 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.106	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 Atsuhiko, Hatano Keita, Tadehara Hitomi, Yano Naomine, Shinzawa-Itoh Kyoko, Yamashita Eiki, Muramoto Kazumasa, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya	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 Journal of Biological Chemistry	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 無
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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shimada Atsuhiko, Etoh Yuki, Shinzawa-Itoh Kyoko, Yamashita Eiki, Muramoto Kazumasa, Tsukihara Tomitake, Yoshikawa Shinya
2. 発表標題 O ₂ -activation and unidirectional proton-pump mechanisms of cytochrome c oxidase elucidated by X-ray structures of its catalytic intermediates
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田敦広、村本和優、伊藤・新澤恭子、月原富武、吉川信也
2. 発表標題 チトクロム酸化酵素反応中間体の構造解析による、酸素還元と共役したプロトンポンプ機構の解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gyokucho Sho, Akari Miyamoto, Kazuma ashida, Kyoko Ito-Shinzawa, Astuhiko Shimada, Tomitake Tsukihara, Shinnya yoshikawa
2. 発表標題 X線照射量の違いがチトクロム酸化酵素の結晶構造へ与える影響
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田敦広、久保稔、馬場清喜、吾郷日出夫、吉川信也、月原富武
2. 発表標題 チトクロム酸化酵素によるプロトンポンプは、酸素結合によって誘起されるタンパク質内構造変化によって厳密に制御されている
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuhiko Shimada, Minoru Kubo, Seiki Baba, Hideo Ago, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa
2. 発表標題 A nanosecond time-resolved XFEL structure analysis reveals the structural changes associated with CO release from Cytochrome c Oxidase
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada Atsuhiko
2. 発表標題 O ₂ -activation and unidirectional proton transfer mechanism by cytochrome c oxidase elucidated by X-ray structures of its catalytic intermediate.
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimada, A., Kozai, D., Nishikawa, K., Fujiyoshi, Y., Sho, G., Mizutani, T. and Tani, K.
2. 発表標題 The structural analysis of cytochrome c oxidase complexed with cytochrome c using cryo-electron microscopy
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第20回日本蛋白質科学会年会にて若手奨励賞を受賞

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------