

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K03794

研究課題名(和文)チトクロム酸化酵素はプロトンポンプ反応を局所的な構造変化で達成できるか

研究課題名(英文) Does Cytochrome c Oxidase control proton-pump mechanism by small structural changes?

研究代表者

神谷 克政 (Kamiya, Katsumasa)

神奈川工科大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：60436243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：地球上に酸素が大量に出現して以降、生物は酸化酵素や酸素添加酵素等のタンパク質を獲得し、酸素を使った有機物の燃焼や水酸化ができるようになった。本研究の目的は、地球上の生物が酸素を使うために進化の過程で獲得したチトクロム酸化酵素等のタンパク質が酸素を効率的に使うことができる構造基盤を解明することである。研究の結果、チトクロム酸化酵素には、タンパク質表面付近の構造のわずかな歪みがタンパク質内部にある酸素分子の輸送経路まで伝わることを示唆された。また、ステロイドホルモンを合成するチトクロムP450について、基質結合部位の空間的な形の違いが酸素添加の能力の違いを生み出す仕組みを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのチトクロム酸化酵素は、進化の過程で細菌などの原核生物がもつ酵素に付加的なサブユニットが加わったため、近年ではサブユニット付近の結合を狙った抗菌剤の創薬標的の1つとしても注目されている。本研究で得られた知見は合理的な抗菌剤の開発に寄与することが期待される。また、ステロイドホルモンを合成するチトクロムP450に対して得られた本研究の知見は、ステロイドホルモンの過剰産生で起こる疾患に対する選択性の高い阻害剤の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Since the advent of abundant oxygen on Earth, organisms have acquired proteins such as oxidative enzymes and oxygen-addition enzymes, enabling the combustion of organic matter and hydroxylation utilizing oxygen. The aim of this study is to elucidate the structural basis that enables proteins such as cytochrome oxidases, which were acquired through the evolutionary process for organisms on Earth to use oxygen, to efficiently utilize oxygen. As a result of this study, it was suggested that minor distortions in the structure near the surface of cytochrome oxidase can propagate to the internal oxygen molecule transport pathway within the protein. Furthermore, for cytochrome P450 that synthesizes steroid hormones, we clarified the mechanism by which differences in the spatial shape of the substrate binding site generate differences in oxygen addition capabilities.

研究分野：計算生物物理学

キーワード：チトクロム酸化酵素 分子動力学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に酸素が大量に出現して以降、生物は、酸素の高い酸化力を如何にして使えば生命活動を行えるかという観点で進化してきた。実際、生物は酸化酵素や酸素添加酵素等のタンパク質を獲得し、酸素を使った有機物の燃焼や水酸化ができるようになった。酸化酵素の重要な例の1つはチトクロム酸化酵素である。高等生物のチトクロム酸化酵素はミトコンドリアの内膜に存在し、グルコースなどの有機物から取り出した電子を用いて酸素分子を水分子に還元する酸素還元反応とプロトンポンプ反応を共役させる。この酵素は細菌から真核生物まで広く存在し、酸素を電子受容体とする呼吸鎖の末端酸化酵素である点が共通である。特にヒトのチトクロム酸化酵素は、細菌などの原核生物がもつ酵素に付加的なサブユニットが加わっているため、近年では抗菌剤の創薬標的の1つとしても注目されている。これまでのX線構造解析から、酸素還元に伴う同酵素の構造変化は局所的であることが示唆されている。そこで申請者は、構造変化が局所的であることが酸素還元反応により放出される自由エネルギーをポテンシャルエネルギーに効率的に変換させることを可能にする鍵であると考えた。一方、酸素添加酵素の重要な例の1つとしてチトクロム P450 がある。この酵素は、基質を酸化し、生成物に酸素原子を挿入する反応を触媒する。この酵素は生物界に広く分布し、その生理的機能は生物種によって様々である。ヒトの場合は、コレステロールや胆汁酸、ステロイドホルモンの生合成や、薬物・異物の代謝に関わるため、医学、薬学分野においても重要視されている。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、地球上の生物が酸素を使うために進化の過程で獲得したチトクロム酸化酵素等のタンパク質が酸素を効率的に使うことができる構造基盤を解明すること、これにより酸素を使うタンパク質の反応機構がなぜ高効率なのかという疑問に対する答えを探求することである。

3. 研究の方法

チトクロム酸化酵素のX線構造解析によれば、この酵素の酸化還元や基質結合などに伴う構造変化は分子内部の限られた領域のみで生じ、ドメインが動くような変化は起こらないことが示唆されていた。このような硬い構造の下では、酸素還元反応により放出される自由エネルギーを系の運動エネルギーではなくポテンシャルエネルギーに変換させやすいことが想定される。非常に興味深いことに、最近、ヒトのチトクロム酸化酵素に対する新規の活性阻害剤が発見され、阻害剤結合型酵素のX線構造も決定された。その結果、この阻害剤は、酸素還元反応やプロトンポンプ反応の活性部位ではなく、それらを含むコア構造の表面に結合すること、すなわちアロステリックな阻害剤であることがわかった。本酵素の特徴である「硬い構造」の下で、この阻害剤の作用機序を明らかにすることは、酸素還元反応とプロトンポンプ反応の高効率な共役機構の解明に重要な知見を与えることが期待される。そこで、アロステリック阻害剤を含めたチトクロム酸化酵素の構造を分子シミュレーションの手法により詳細に解析し、酵素の立体構造に生じる変化や機能阻害との関係性を調べた。

チトクロム酸化酵素などの酸化酵素や酸素添加酵素等のタンパク質は、その共通の特徴として、ヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体を活性中心に持つヘムタンパク質である。本研究では、酸素添加酵素のヘムタンパク質の重要な例の1つであるチトクロム P450 にも着目した。哺乳動物におけるステロイドホルモン合成には6種類のチトクロム P450 が関わる。いずれの酵素も、基質であるステロイド分子がヘム近傍に結合し、特定の炭素原子が活性酸素種と反応することで一原子酸素添加反応が進行する。X線構造解析によれば、基質結合部位の空間的な形状が各酵素で異なることが示唆された。この空間的な形状と機能との間の相関関係を解明することが、基質分子と酸素添加を受ける炭素原子の選択性の解明や、酵素が合成するステロイドホルモンの過剰産生で起こる疾患に対する選択性の高い阻害剤の開発の鍵になる。本研究では、ステロイド 11 β -水酸化酵素 P450₁₁ (CYP11B1) とアルドステロン合成酵素 P450_{aldo} (CYP11B2) の2つのステロイドホルモン生合成酵素に対し、分子シミュレーションの手法によりヘム周りの活性中心の立体構造を詳細に解析し、空間的な形状と機能との間の相関関係を調べた。

4. 研究成果

ヒトのチトクロム酸化酵素は13種のサブユニットから構成される複合体である。このうちサブユニット1からサブユニット3までの3つのサブユニットは原核生物である細菌から真核生物であるヒトまで広く保存されており、このコア構造で酸素還元反応とプロトンポンプ反応が起こる。最近発見されたアロステリック阻害剤は、コア構造とヒトが持つサブユニットとの境界

面に結合する。阻害剤結合型チトクロム酸化酵素の X 線構造解析によれば、阻害剤が結合することで顕著な構造変化は同定されなかった。一般に、エフェクターがアロステリック部位に結合したシグナルは、結合部位から活性中心までの構造を順番に変化させることで伝搬されると考えられるため、X 線結晶構造解析で直接同定することが難しい。そこで本研究では、分子動力学法を用いて阻害剤結合型チトクロム酸化酵素であるホロ酵素とアポ酵素の構造を詳細に比較した。具体的には、13 サブユニットからなる単量体のチトクロム酸化酵素の計算モデルを CO 結合還元型 X 線構造に基づいて構築した。ここで、このモデルでは、チトクロム酸化酵素の酸素還元中心を形成する補欠分子族 (ヘム a₃) と銅イオン (CuB) は共に還元型、酸素還元中心に至る電子の移動経路上にある銅イオン (CuA) と補欠分子族 (ヘム a) は共に酸化型であり、CO 分子は除いてある。このチトクロム酸化酵素の計算モデルを phosphatidylcholine と phosphatidylethanolamine が 1:1 からなる脂質二重層に埋め込み、全体を水和させることで、生体内の条件を模倣した系を作成した。このように作成した計算モデルに対して、阻害剤を結合させた場合とさせなかった場合の 2 通りのシミュレーションを実行し、その結果を比較することで、タンパク質の立体構造にどのような変化が生じるか、その変化は機能阻害とどのような関係にあるのかを調べた。

シミュレーションの結果、阻害剤の結合によりタンパク質全体に大きな構造変化は生じないことがわかった。しかしながら、阻害剤がチトクロム酸化酵素に結合した場合のみ、結合部位の近傍にあるヘリックス TM2 が折れ曲がること示唆された。ヘリックス TM2 は蛋白質内部にある酸素還元中心への酸素分子の輸送経路に隣接していることから、TM2 の折れ曲がりにより酸素分子の輸送経路が狭くなることが示唆された。この結果は、本酵素の特徴である「硬い構造」の下で、構造のわずかな歪みがタンパク質内部にある酸素分子の輸送経路まで伝わるような部位がタンパク質の表面に存在することを示している点で非常に意義深い。さらに、TM2 は酸素還元反応に伴うプロトンポンプ反応の鍵として考えられているヘム a にも隣接している。このことから、TM2 の折れ曲がりにはヘム a を介したプロトンポンプ反応にも影響を与えることが示唆されるが、この点については今後の課題の 1 つである。

ヒトの CYP11B1 と CYP11B2 は、それぞれコルチゾールとアルドステロンの合成の最終段階の反応を触媒する。この 2 酵素は、どちらも 479 アミノ酸残基から構成され、31 残基のみが異なる近縁なタンパク質である。X 線構造解析より、2 酵素の基質結合部位はヘムを含む同一のアミノ酸残基によって形成されている。このため、2 酵素の触媒反応には共通点が多い。すなわち、(1) 11-デオキシコルチコステロンを共通の基質として認識する、(2) 11-モノ水酸化を主要な活性にもつ、(3) 18-モノ水酸化を副次的な活性にもつ、という特徴がある。しかしながら、2 酵素には触媒能の差異もある。すなわち、(1) CYP11B2 は 11-, 18-ジ水酸化で CYP11B1 より高い活性をもつ、(2) CYP11B2 のみ 2 回目の 18-水酸化触媒能をもち 3 ステップの触媒によりアルドステロンを生成する、という特徴がある。そこで本研究では、構造がよく似た CYP11B1 と CYP11B2 が触媒能の差異を生み出す構造基盤を明らかにするため、2 酵素の基質結合部位の構造を分子動力学法を用いて詳細に解析した。具体的には、CYP11B1 の基質複合体の結晶構造は決定されていないため、基質複合体 CYP11B1 の計算モデルは阻害剤である (S)-ファドロゾール結合型 CYP11B1 に基づいて構築した。CYP11B2 の計算モデルは基質複合体の結晶構造に基づいて構築した。さらに、高分解能で結晶構造が決定されている変異型 CYP11B1 (阻害剤であるメチラポン結合型) に基づいて、変異型 CYP11B1 の基質複合体の計算モデルも構築した。これら 3 つの計算モデルに対して分子動力学計算を実行し、3 酵素間の構造の差異を同一の基質条件下で比較した。

その結果、基質結合型 CYP11B1 と CYP11B2 の基質結合部位に触媒能の差異を生み出す空間的な形状の差異が存在することがわかった。すなわち、CYP11B2 の基質結合部位の空間が、基質がヘムに対して位置を 3 ほどスライドできる程度に野生型 CYP11B1 と変異型 CYP11B1 より広いことがわかった。この基質のスライドにより、基質内で 3 ほど離れた炭素原子のそれぞれがヘム鉄に近づくポジショニングをとることが可能となり、CYP11B2 でのみ 2 回目の 18-水酸化触媒が可能になることが示唆された。さらに、このような空間的な形状の差異を生み出す重要な残基は、基質結合部位に隣接する Arg120 と Glu310 であることが示唆された。すなわち、CYP11B1 では両者のアミノ酸の間にイオン結合が形成されることがわかった。さらに、変異型 CYP11B1 では野生型よりも安定なイオン結合が形成されることが示唆された。一方、CYP11B2 ではイオン結合が形成されず、それぞれのアミノ酸は部分的に水和されていることがわかった。これらの基質結合部位の空間的な構造の差異を明らかにしたことは、それぞれの酵素に選択性の高い阻害剤の開発に役立つことが強く期待される。これらの阻害剤は、コルチゾールあるいはアルドステロンの過剰産生が引き起こすクッシング症候群や原発性アルドステロン症の治療において有効な治療法の一つになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mukai Kuniaki, Sugimoto Hiroshi, Kamiya Katsumasa, Suzuki Reiko, Matsuura Tomomi, Hishiki Takako, Shimada Hideo, Shiro Yoshitsugu, Suematsu Makoto, Kagawa Norio	4. 巻 3
2. 論文標題 Spatially restricted substrate-binding site of cortisol-synthesizing CYP11B1 limits multiple hydroxylations and hinders aldosterone synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Research in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 192 ~ 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crstbi.2021.08.001	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 Nishida Yuya, et. al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34771-y	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向井 邦晃、杉本 宏、神谷 克政、香川 憲夫
2. 発表標題 アルドステロン・コルチゾール合成の構造生物学
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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