

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究A

研究期間：2010～2012

課題番号：22247012

研究課題名（和文）哺乳動物ミトコンドリア呼吸機構の原子レベルの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mammalian mitochondrial respiration mechanism at the atomic level.

研究代表者

吉川 信也（YOSHIKAWA SHINYA）

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40068119

研究成果の概要（和文）：ウシチトクロム酸化酵素(Cc0)の水素原子レベルのX線構造によりプロトン(H<sup>+</sup>)ポンプ経路(H経路)の4H<sup>+</sup>受容機構、時分割赤外分光解析によりO<sub>2</sub>還元中心のH経路開閉制御機構が解明された。NADH-ユビキノ還元酵素の活性酸素生成防御機構が振動分光学的に解明され、F型ATP合成酵素の2次元結晶化条件はほぼ確立された。Cc0膜貫通領域の立体構造変化のチトクロムcによる誘起が両者複合体の2次元結晶化条件により示唆された。

研究成果の概要（英文）：X-ray structure of bovine heart cytochrome oxidase at the hydrogen atom level showed that the proton-pumping pathway (H-pathway) can accept 4 protons, while the time-resolved infrared analysis showed that the open/closed transition of H-pathway is controlled by the O<sub>2</sub> reduction site. The mechanism of suppression of reactive oxygen production by NADH-ubiquinone reductase has been proposed vibrationally spectroscopically. The 2D crystallization conditions for FoF1ATP synthase has been essentially established. The induction of conformational changes in the transmembrane region of Cc0 by cytochrome c was discovered during the 2D crystallization of the complex of the two proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
2011年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2012年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	340,000,000	10,200,000	44,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：生体エネルギー変換、膜タンパク質、金属タンパク質、X線結晶構造解析、振動分光解析

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象はタンパク質の駆動する化学反応と見ることができる。タンパク質の機能(どのように化学反応を駆動するか?)は機能中心を構成する原子の空間配置と電子状態(化学反応性)の化学反応の進行に伴う変化を追跡することによって(原子の挙動として捉えることによって)解明することができる。原子配置は結晶構造解析、

電子状態は分光学(アミノ酸残基の電子状態の解析には赤外分光学が必須)的解析により決定することができる。しかし、水溶液中のタンパク質に適用できる赤外分光装置が開発されていなかったため、「原子レベルの機能解明」は研究開始当初までは不可能であった。

ミトコンドリア呼吸系は巨大な4種の膜タンパク質複合体酵素により駆動されており、それぞれ

は全く異なる反応によって駆動されるプロトンポンプである。したがって、ミトコンドリア呼吸機構解明(生命科学の最重要研究課題の一つである。)にはこれら全ての酵素の機能解明が必要である。さらにミトコンドリア内膜には極めて高濃度にタンパク質が集積され、種々の相互作用の存在が推定されているため、上述の4種の酵素間の相互作用を原子レベルで解明することも必要である。「原子レベルの機能解明」のためには、水素原子レベルの結晶構造解析が不可欠である。しかし、これら4種の酵素は巨大で複雑な組成と構造の膜タンパク質複合体であり、精製結晶化が極めて困難であるため、NADH-ユビキノ還元酵素と  $F_0F_1$ ATPase については、サブユニットの欠損のない酵素の立体構造さえも決定されていなかった。応募者は申請時直前に、サブユニットの欠損のない  $F_0F_1$ ATPase と NADH-ユビキノ還元酵素との2次元結晶化に成功し、チトクロム酸化酵素の水素原子レベルの構造解析が可能な分解能に近い X 線回折強度データを得ていた。一方、種々の酸化還元・配位子結合状態の 1.8 Å 分解能の X 線構造からチトクロム酸化酵素の反応機構に関する種々の新知見を得ていた。さらに、水溶液系に適用できる超高分解能赤外分光装置が開発されたこと等によって、ミトコンドリア呼吸系全体のエネルギー変換機構の原子レベルの解明を現実的な研究課題と認識するに至った。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリア呼吸機構を解明するためには、呼吸系を駆動する4種のプロトンポンプ酵素の機能と酵素間の相互作用とを、それらに關与する原子の配置を結晶構造解析法、化学反応性を振動分光法によって決定し、原子の挙動として(原子レベルで)捉えることが必須である。我々はチトクロム酸化酵素の 1.4 Å 分解能の X 線構造を決定し NADH-ユビキノ還元酵素と  $F_0F_1$ ATPase の2次元結晶化に成功していた。本研究ではチトクロム酸化酵素の機能を水素原子レベル(0.8 Å 以上)の構造解析と、独自に開発された水溶液中のタンパク質にも適用できる超高感度装置による赤外分光解析とにより原子レベルで解明し、他の2酵素の結晶構造を 2.8 Å 分解能で決定する。さらに、これら酵素を共結晶化し結晶構造解析により相互作用機構を解明する。こうしてミトコンドリア呼吸機構の全容の解明のための重要な足がかりを作る。

## 3. 研究の方法

**チトクロム酸化酵素**：結晶中で種々の反応中間体を低温捕捉し、水素原子レベル(0.8 Å 分解能以上)で X 線構造を決定する。(これにより、プロトンポンプ経路が同定できるであろう。)一方、超高感度時間分解赤外分光装置により、 $O_2$ 還元反応に伴う赤外吸収変化を追跡する。このとき、機能中心のアミノ酸を部位特異的に同位体標識し、X 線構造と関連付ける。得られた実験結果から理論解析により

原子レベルのプロトンポンプ機構を導く。

**NADH-ユビキノ還元酵素と  $F_0F_1$ ATPase**: 2次元及び3次元結晶化条件を最適化し、電子線および X 線構造解析により 2.8 Å 分解能で立体構造を決定し、アミノ酸側鎖の配向まで決定するとともに水素原子レベルの構造解析の足がかりとする。これらの結果に基づいて反応機構を理論的に予測する。**相互作用解析**: 上記3種の酵素間およびチトクロム酸化酵素-チトクロム c 間の共結晶化条件を確立し、相互作用機構を立体構造に基づいて解明する。

## 4. 研究成果

### (1) チトクロム酸化酵素

チトクロム酸化酵素の酸素還元反応中間体である P 型、F 型、O 型の結晶の調製法について種々検討し、休止型及び還元型との酸素還元中心の構造比較を行なった。どの中間体の酸素還元中心にも 2 当量の酸素原子が認められた。しかし、原子間距離は水素結合距離より短かったが休止型の過酸化物の酸素原子間距離より明らかに長かった。これは P 型、F 型は休止型酵素結晶を過酸化水素で処理することによって調製されているため、休止型が残存しているためであると考えられる。チトクロム酸化酵素反応中間体である P 型、F 型、O 型の構造を決定するために、混在する休止型の寄与を差し引く方法を組織的に検討した。その結果、これまで分光学的知見の全く得られていなかった  $Cu_B$  の配位構造を実験的に決定することに成功した。また、反応の進行に伴い  $Cu_B-Fe_{a3}$  間の距離が明確に変化することが認められた。この結果は本酵素の機能が酸素還元中心によって精密に制御されていることを示唆している。

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の 1.4 Å 分解能の X 線構造解析が可能な X 線回折強度データの精度を大幅に高めることに成功し、非水素原子の構造解析を行なった。その結果、酸化還元にもなつて、酸素還元中心に含まれる  $h\text{-em } a_3$  平面が併進すること、 $Cu_B$  に配位している 3 個のイミダゾール基のうちの 1 個が明らかに移動することが明らかになった。これらの変化は分子状酸素を活性酸素種を遊離させずに還元するために  $Cu_B$  の機能が精妙に制御されていることを示している。さらに、ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶の X 線回折実験のため結晶の不凍剤浸漬条件を温度因子とモザイシティーを指標として組織的に検討し、1.25 Å 分解能の構造解析が可能な回折強度データの収集に成功した。ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線回折実験条件のさらに詳細な検討により、X 線構造の分解能を酸化型/還元型それぞれ 1.8/1.9 Å から 1.5/1.6 Å に向上させることに成功した。その結果  $Mg^{2+}$  部位の配位構造と  $Cu_A$  と  $h\text{-em } a$  との間の電子伝達経路に酸化還元に伴う立体構造変化が検出された。さらに、 $Mg^{2+}$  部位を

中心として、21 個の水分子で構成されている水クラスターが分子表面とも酸素還元中心とも隔離されておりプロトンの出入りは生理的時間内には無視できること、4 当量のプロトン受容官能基がクラスター壁面に配置されていることが示された。また短い水素結合ネットワークがこの水クラスターと本酵素のプロトンポンプ経路 (H 経路) とを連結していた。これらの結果はこの水クラスターがポンプ用プロトン 4 当量を効率よく取り込み、一時保管する機能を持つことを示している。

また本研究により長年の懸案であった混合原子価 CN 結合型結晶の調製法が確立され、X 線回折実験を行い、現在構造解析が進められている。High-frequency ENDOR 解析のために設計試作したクライオグループに結晶を凍結し米国アルバートアインシュタイン医科大学に空輸し予備実験を行った。その結果、この方法は、X 線構造解析による決定が困難な遷移金属近傍の水素原子の構造解析に極めて有望であることが明らかになった。

またこれも長年の懸案であった水溶液中での赤外分光解析装置の開発が完了し、時間分解赤外分光法によるポンププローブ法の測定条件が確立し、回転セルを利用した CO 光解離後の赤外吸収スペクトルの時間変化の測定条件の確立に成功した。その結果酸素還元部位とプロトンポンプ経路との間を連結する構造が発見され、それがポンプのためのプロトンの取り込みとポンププロトンの逆流防止を実現していることを明らかにすることができた。これは時分割赤外分光法のタンパク質への応用の最初の例として注目されている。またフローセルの開発もほぼ完了した。

哺乳動物細胞を用いたウシ心筋チトクロム酸化酵素の D 経路の部位特異的変異解析により、細菌酵素ではプロトンポンプは阻害されるが酸素還元は阻害されない D 経路のアミノ酸残基の変異はウシ酵素の機能に全く影響がないことが明らかになった。この結果はウシ酵素と細菌酵素との D 経路の構造は酷似しているが機能が異なることを示す。したがって、これまでの長年の常識に反して、チトクロム酸化酵素も創薬のターゲットになることが示された。

#### (2) NADH-ユビキノ還元酵素

本酵素の 2 次元結晶化条件については残念ながら画期的な進歩は見られなかったため、現在 2 次元結晶重層による 3 次元結晶化を検討している。また本酵素の FMN の共鳴ラマンスペクトルの測定に成功した。フラビン由来のラマンスペクトルの帰属のためには還元型

の測定が不可欠であるが、完全還元は容易ではない。そこで NADH 還元酵素系を共存させて完全還元型を調製する条件を確立し、フラビンスペクトルの帰属に成功した。分子量 100 万もある、ウシ心筋 NADH ユビキノ還元酵素の FMN の共鳴ラマンスペクトルをこれまでに報告されているフラビタンパク質のどれよりも高精度で測定することに成功し、X 線構造を参照して活性酸素防御機構を演繹した。

#### (3) F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> 合成酵素

本酵素の 2 次元結晶化には大きな進歩があり極低温 2 次元電子線構造解析が可能な 2 次元結晶化条件がほぼ確立された。これはサブユニットの欠落のない本酵素の結晶化の最初の例として重要な成果であると考えられる。

#### (4) 相互作用解析

チトクロム c-チトクロム酸化酵素複合体の 2 次元結晶化条件の探索に長足の進歩があり、極低温電子顕微鏡解析を開始した。また、チトクロム c/チトクロム酸化酵素複合体の 2 次元結晶化条件の詳細な検討に基づいて、チトクロム c 結合がチトクロム酸化酵素の膜貫通領域の立体構造を変化させること示した。さらにチトクロム c-チトクロム酸化酵素複合体間相互作用の NMR 解析によりチトクロム c のチトクロム酸化酵素に対する親和性は酸化還元により大きくは変化しないことにより電子伝達が制御されていることを明らかにした。

#### 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 13 件)

1. M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, M. Moriyama, T. Ogura, K. Kihira, S. Yoshikawa, Resonance Raman Spectral properties of FMN of bovine Heart NADH:ubiquinone Oxidoreductase Suggesting a Mechanism for the Prevention of spontaneous Production of reactive Oxygen Species, *Biochemistry* 52, 98-104 (2013)
2. Tomoko Ohnishi, S. Tsuyoshi Ohnishi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Ralph T. Weber "EPR detection of two protein-associated ubiquinone components (SQNf and SQNs) in the membrane in situ and in proteoliposomes of isolated bovine heart complex I" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 1803-1809, 2012.
3. Two tyrosyl radicals stabilize high oxidation states in cytochrome c

- oxidase for efficient energy conservation and proton translocation, Michelle A. Yu, Tsuyoshi Egawa, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Victor Guallar, Syun-Ru Yeh, Denis L. Rousseau, Gary J. Gerfen, *Journal of the American Chemical Society* 134, 4753-4761 (2012). 査読有。
4. An intermediate conformational state during ligand binding to cytochrome *c* oxidase detected by time-resolved resonance Raman analyses of heme peripheral groups. Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura *Chemistry Letters* 41, 178-180 (2012). 査読有。
  5. Reaction mechanism of Mammalian mitochondrial cytochrome C oxidase. Shinya Yoshikawa, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh *Advances in experimental medicine and biology*, 748, 215-236 (2012). 査読有。
  6. Distinguishing between  $\text{Cl}^-$  and  $\text{O}_2^{2-}$  as the bridging element between  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  in resting-oxidized cytochrome *c* oxidase. Michihiro Suga, Naomine Yano, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh, Tomoko Maeda, Eiki Yamashita, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa *Acta crystallographica. Section D*, 67, 742-744 (2011). 査読有。
  7. NMR basis for interprotein electron transfer gating between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. Koichi Sakamoto, Masakatsu Kamiya, Mizue Imai, Kyoko Shinzawa-Itoh, Takeshi Uchida, Keiichi Kawano, Shinya Yoshikawa, Koichiro Ishimori, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12271-12276 (2011) 査読有。
  8. The  $\text{O}_2$  reduction and proton pumping gate mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. Shinya Yoshikawa, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh *Biochimica et biophysica acta* 1807, 1279-1286 (2011). 査読有。
  9. Proton-pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase. Shinya Yoshikawa, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh, *Annual Review of Biophysics* 40, 205-223 (2011). 査読有
  10. Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable  $\text{O}_2$  reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate. Kazumasa Muramoto, Kazuhiro Ohta, Kyoko Shinzawa-Itoh, Katsumasa Kanda, Maki Taniguchi, Hiroyuki Nabekura, Eiki Yamashita, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7740-7745 (2010). 査読有。
  11. Cell-free synthesis of cytochrome *c* oxidase, a multicomponent membrane protein. Yukie Katayama, Kunitoshi Shimokata, Makoto Suematsu, Takashi Ogura, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, Hideo Shimada *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42, 235-240 (2010). 査読有。
  12. A resonance Raman band assignable to the 0-0 stretching mode in the resting oxidized state of bovine heart cytochrome *c* oxidase. Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura *Journal of bioenergetics and biomembranes* 42, 241-243 (2010). 査読有。
  13. X-ray structure of the NO-bound CuB in bovine cytochrome *c* oxidase. Kazuhiro Ohta, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh, Eiki Yamashita, Shinya Yoshikawa, Tomitake Tsukihara *Acta Crystallographica section F* F66, 251-253 (2010). 査読有。
- [学会発表] (計 66 件)
1. Nanosecond time-resolved infrared basis for a bulge of the transmembrane helix between hemes *a* and *a*<sub>3</sub> to facilitate highly efficient proton pumping by bovine heart cytochrome *c* oxidase. Shinya Yoshikawa, Minoru Kubo, Satoru Nakashima, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura, Masao Mochizuki JiYoung Kang, Masaru Tateno, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh *Invited Lecture, European Bioenergetics Conference 2012*, September 15<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> Freiburg, Germany (2012)
  2. Structural studies on bovine heart cytochrome *c* oxidase. Shinya Yoshikawa, Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh, Masao Mochizuki *Biochimica et biophysica acta*, 1817, 579-589 (2012). 査読有。
  3. Reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. Shinya Yoshikawa *Invited Lecture, SBMPs (Structural Biology of Membrane Proteins) 4<sup>th</sup> Annual Meeting*, Maratea, Italy May 30<sup>th</sup>-June 2<sup>nd</sup> (2012)
  4. The  $\text{O}_2$  Reduction and Proton Pumping

Mechanism Gate Mechanism of Bovine Heart Cytochrome c oxidase. Shinya Yoshikawa Invited Lecture *Workshop on Allosteric cooperativity in soluble, membrane bound hemoproteins and related membrane system* Bari Italy May 29th-June 1st (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 信也 (YOSHIKAWA SHINYA)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号：4068119

(3) 連携研究者

小倉 尚志 (OGURA TAKASHI)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号：70183770  
島田 秀夫 (SHIMADA HIDEO)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号：80095611  
宮澤 淳夫 (MIYAZAWA OTSUO)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号：60247252  
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  
神谷 克政 (KAMIYA KATSUMASA)  
筑波大学・大学院数理物質系・助教  
研究者番号：60436243